



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Dissertação de mestrado**

TACILENE LUZIA DA SILVA

ATIVIDADE SINÉRGICA DO TIMOL E AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE À  
*Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE E SEUS EFEITOS SOBRE A  
BIOSSÍNTESE DE BIOFILME E PIOCIANINA.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

RECIFE-PE

2015

TACILENE LUZIA DA SILVA

ATIVIDADE SINÉRGICA DO TIMOL E AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE À  
*Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE E SEUS EFEITOS SOBRE A  
BIOSSÍNTESE DE BIOFILME E PIOCIANINA.

Dissertação apresentada ao programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal de Pernambuco, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

RECIFE-PE

2015

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

S586a Silva, Tacilene Luzia da.  
Atividade sinérgica do timol e agentes antimicrobianos frente à *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e seus efeitos sobre a biossíntese de biofilme e piocianina / Tacilene Luzia da Silva. – Recife: O autor, 2015.  
67 f.: il. ; tab.; 30 cm.

Orientadora: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.  
Inclui referências.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Timol. 3. Sinergismo. 4. Biofilme. 5. Piocianina. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-123)

TACILENE LUZIA DA SILVA

**Atividade sinérgica do timol e agentes antimicrobianos frente à *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e seus efeitos sobre a biossíntese de biofilme e piocianina**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 13/02/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Presidente e Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Joás Lucas da Silva (Examinador externo)

Universidade Federal de Pernambuco

A falsa ciência cria os ateus, a verdadeira,  
faz o homem prostrar-se diante da divindade.

*Voltaire*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que em sua infinita bondade me concedeu saúde e disposição, que me permitiram realizar este trabalho;

A minha mãe e familiares pelo incentivo e carinho em todos os momentos;

A professora Eulália Ximenes pela orientação, atenção e compromisso indispensável ao andamento e conclusão deste trabalho.

A Klewdma pelo companheirismo e por compartilhar todos os momentos fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa;

A Andreson, Weldja e Edna pelo apoio e atenção ao longo deste curso;

A Simone, Amanda, Leonardo, Fábio e Renata por compartilharem comigo seus conhecimentos;

A todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial a Nerilim, pela atenção e competência na resolução dos assuntos relacionados ao curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo financiamento.

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa, oportunista e ubíqua, frequentemente associada a infecções graves em pacientes imunocomprometidos. Em razão do aumento de resistência dessa bactéria aos múltiplos antimicrobianos, surgem à preocupação e a procura por novas alternativas terapêuticas, com as substâncias bioativas de origem natural representando uma importante fonte para obtenção desses medicamentos. O objetivo do presente estudo foi determinar a atividade sinérgica do timol e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e avaliar os efeitos dessa interação sobre a biossíntese de biofilme e de piocianina. Para isso, numa primeira etapa foi determinada a concentração inibitória e bactericida mínima do timol e de antimicrobianos (Polimixina B, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, cefepima, ciprofloxacino e meropenem) frente a dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo da interação entre o timol e os agentes antimicrobianos foi realizado pelo método do tabuleiro de xadrez. Os critérios utilizados para avaliar a atividade sinérgica foram definidos pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC índice). A partir dos melhores valores do FIC índice das associações timol/antimicrobiano foram avaliadas a atividade sobre a produção de biofilme e piocianina. Três cepas (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16) apresentaram um perfil de resistência ao meropenem e cefepima e um efeito sinérgico foi observado entre o timol e meropenem ou cefepima sobre essas cepas. A associação timol/cefepima inibiu a biossíntese do biofilme em até 99,76%, e a associação timol/meropenem mostrou ser mais eficaz na inibição da piocianina cujos valores foram de até 84,33%. O timol associado ao meropenem ou cefepima, age sinergicamente, inibindo cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e interferindo na biossíntese de biofilme e piocianina.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*. Timol. Sinergismo. Biofilme. Piocianina.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram negative bacteria, opportunistic and ubiquitous, often associated with severe infections in immunocompromised patients. Due to the increased resistance of the bacteria to multiple antibiotics, there are the concerns and the search for new therapeutic alternatives, with the bioactive substances of natural origin represents an important source for obtaining these drugs. The aim of this study was to determine the synergistic activity of thymol and antimicrobials agents multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains and evaluate the effects of this interaction on the biofilm biosynthesis and pyocyanin. For this, a first step was determined and the minimum inhibitory concentration of thymol and bactericidal antibiotics (polymyxin B, ceftazidime, piperacillin / tazobactam, cefepime, ciprofloxacin and meropenem) compared to ten strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The study of the interaction between the thymol and antimicrobial agents was carried out by the checkerboard method. The criteria used to evaluate the synergistic activity were defined by the Index of Fractional Inhibitory Concentration (FIC index). From the best FIC index values of associations thymol / antimicrobial activity were evaluated on the production of biofilm and pyocyanin. Three strains (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16) showed an meropenem resistance profile and cefepime and a synergistic effect was observed between the thymol and meropenem or cefepime on these strains. The thymol / cefepime combination inhibited biofilm biosynthesis up to 99.76%, and thymol association / meropenem was more effective in inhibiting pyocyanin with values of up to 84.33%. The thymol associated with meropenem or cefepime, acts synergistically by inhibiting multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains and interfering in the biosynthesis of biofilm and pyocyanin.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Thymol. Synergism. Biofilm. Pyocyanin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BGN-NF - Bactérias Gram negativas não fermentadoras
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CMB - Concentração Bactericida Mínima
- EPS - Substâncias Poliméricas Extracelulares
- ESBL -  $\beta$  – Lactamase de amplo espectro
- FC - Fibrose Cística
- FIC - Concentração Inibitória Fracionada
- FICI - Índice de Concentração Inibitória Fracionária
- IPM - Imipenem
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LFBM - Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos microorganismos
- MER - Meropenem
- M $\beta$ L - Metallo  $\beta$  – Lactamases
- PAMP - Padrão molecular associada a patogénicos
- PBPs - Penicilin, Binding, Proteins
- PCA – Ácido carboxílico Fenazino
- pN - Força normal
- ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- RND - Resistência Nodulação Divisão
- TLR5 – Toll Like Receptor 5
- T4P – Pili Tipo 4 Polar
- UFC - Unidade Formadora de Colônias
- UTI - Unidade de Terapia Intensiva
- VIM - Verona Imipenemase

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Composição do alginato: (a) cadeias de resíduos de ácido manurônicos; (b) 23  
cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos: cadeias de resíduos de ácido manurônicos e  
cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos alternados.
- Figura 2- Esquema representativo do ciclo de desenvolvimento de biofilmes. 24
- Figura 3- Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são classificados pela semelhança estrutural, 28  
adicionados de radicais que fornecem estabilidade a droga.
- Figura 4- Estrutura química do timol 32
- Figura 5- Isoblograma mostrando o efeito da associação entre fármacos (A e B): (M'') 34  
antagonismo, (A'') adição e (S'') sinergismo
- Figura 6- Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação timol/cefepima frente 43  
à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM16
- Figura 7- Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação timol/cefepima frente 43  
à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 01
- Figura 8- Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação timol/meropenem 44  
frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 01

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, origem do isolamento e fenótipo de resistência. 35
- Tabela 2. Concentração inibitória e bactericida mínima do timol e agentes antimicrobianos frente à de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. 41
- Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do timol associado ao meropenem ou cefepima, Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) frente a cepas de *P. aeruginosa* multirresistente. 42
- Tabela 4. Percentual de inibição na formação do biofilme em cultura de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. 45
- Tabela 5. Percentual de inibição na produção de piocianina em cultura de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. 46

## SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Revisão da literatura	17
3.1 Características gerais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.2 Patogenia	18
3.3 Fatores de virulência	19
3.3.1 Adesinas	19
3.3.2 Pili	19
3.3.3 Flagelos	20
3.3.4 Lipopolissacarídeo	20
3.3.5 Piocianina	21
3.3.6 Alginato	22
3.3.7 Biofilme	23
3.4 Mecanismos de resistência	25
3.4.1 Bombas de efluxo	25
3.4.2 Bombas de efluxo Mexab- Oprm	25
3.4.3 Bombas de efluxo Mexcd – Oprj	26
3.4.4 Bombas de efluxo Mexy – Oprm	26
3.4.5 Bombas de efluxo Mexy – Oprn	26
3.4.6 Perda da porina da membrana externa	27
3.4.7 $\beta$ – lactamases e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.5 Antimicrobianos	29
3.6 Mecanismos de ação	30
3.6.1 $\beta$ – Lactâmicos	30
3.6.2 Fluoroquinolonas	30
3.6.3 Polimixinas	31
3.7 Terpeno	31
3.7.1 Timol	31

3.8 Sinergismo	33
4. Materiais e métodos	34
4.1 Micro organismo	34
4.2 Cultura, manutenção e padronização do inoculo	36
4.3 Agente antimicrobiano e timol	36
4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	36
4.5 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	37
4.6 Interação entre timol e agentes antimicrobianos	37
4.7 Interação entre timol e agentes antimicrobianos Biossíntese e inibição do biofilme	38
4.8 Biossíntese e inibição da piocianina	39
4.9 Análise estatística	40
5. Resultado	40
5.1 Determinação da atividade antimicrobiana	40
5.2 Interação entre o timol e agentes antimicrobianos	41
5.3 Biossíntese e inibição na formação do biofilme	45
5.4 Biossíntese e inibição de piocianina	46
6. Discussão	47
7. Conclusões	52
Referências	53

## 1. INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa não fermentadora de glicose (BGN-NF), oportunista e ubíqua podendo ser isolada do solo, da água, das plantas e dos animais. Em humanos comporta-se como patógeno oportunista, permanecendo em tecidos quando há quebra de barreiras naturais ou perda da imunidade, embora possa em algumas ocasiões, fazer parte da flora normal de indivíduos sadios (Stehling et al, 2010).

Frequentemente encontrado em ambientes hospitalares, *P. aeruginosa*, afetam principalmente pacientes submetidos a transplantes, neutropênicos, instrumentalizados e internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) Estando também associada a infecções pulmonares crônicas, eventualmente fatais em pacientes com fibrose cística (FC) (Luna et al, 2013).

Essa espécie é nutricionalmente versátil, sendo capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e de nitrogênio, podendo, por isso, crescer em superfícies úmidas tornando-se de difícil erradicação de materiais inertes, como equipamentos cirúrgicos, dispositivos intravasculares e de suporte respiratório. Sua capacidade de formação de biofilmes é a principal característica que permite com que esta bactéria resista a esforços de descontaminação, permitindo mecanismos multifatoriais de tolerância (difusão restrita de moléculas, atividade fisiológica diferencial e indução de mecanismos genéticos), podendo resistir aos tratamentos com antibióticos, biocidas e às respostas imunes do hospedeiro (Harmsen et al, 2010).

Outro fator importante nas infecções por essa espécie é a biossíntese de piocianina (PCN), um composto redox ativo capaz de aceitar e doar elétrons. Essa natureza redox-ativa da PCN é responsável pela maior parte dos efeitos descritos em pacientes colonizadas por *P. aeruginosa*, principalmente em doenças pulmonares obstrutivas crônicas e fibrose cística (FC) (Rada, 2009).

A versatilidade patológica e capacidade adaptativa dessas bactérias podem ser explicadas por um genoma extenso e complexo. São 5570 orf (open reading frames), um dos maiores do mundo procariótico, com 10% dos genes direcionado à biossíntese de proteínas relacionadas à patogenicidade (Mesaros et al, 2007).

Além disso, o nível elevado de resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, tem limitado o tratamento das infecções causadas por essa bactéria a poucos grupos de antimicrobianos incluindo os  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, carbapenêmicos e polimixina (Morita et al, 2014). Em razão disso surgem à preocupação e a procura por novas alternativas terapêuticas, com as plantas medicinais representando uma importante fonte para obtenção de medicamentos (Mulyaningsih, 2011).

Os vegetais superiores produzem moléculas com propriedades antibióticas os quais possuem uma estrutura química diferente dos antibióticos derivados de micro-organismos. Podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura das membranas dos micro-organismos (Michelin, 2005). Essas substâncias garantem a defesa das plantas contra predação e mantém a sua integridade estrutural (Schultes, 1978), elas constituem os produtos do metabolismo secundário. Os principais metabólitos envolvidos com atividade antimicrobiana são os terpenos, esteroides, flavonoides e taninos (Kuorwel, 2011; Greay, 2011). Os terpenos têm a capacidade para inibir ou retardar o crescimento de bactérias, fungos e protozoários (Nazzaro, 2013).

Os terpenos são formados pela condensação de unidades de isopreno (C5) através da via de acetato-mevalonato e compartilham a sua origem com os ácidos graxos. Eles divergem destes últimos por apresentarem ramificações e estrutura cíclica (Simões et al, 2001). Os terpenos mais comumente encontrados são monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (Bakkali *et al*, 2008). O timol é um monoterpene (Gurbuz et al, 2013), cuja nomenclatura química é 5-metil-2-(1-metil etil)-fenol possui fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O$  e peso molecular de 150,22 g/mol (Manuel et al, 2009).

Essa substância apresenta importante atividade antimicrobiana, no entanto seu modo de ação não é totalmente conhecido, mas acredita-se envolver danos estruturais e funcionais na membrana citoplasmática (Sikkema *et al*, 1995), ruptura da membrana ultraperiférica e interior, libertação de lipopolissacarídeo (LPS) e ruptura da membrana externa (Helander *et al*, 1998; Shapira, Mimran, 2007). Além de interação com proteínas de membrana e alvos intracelulares (Di Pasqua, 2010).

Os monoterpenos quando combinados entre si ou com antibióticos, podem atuar como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana frente a determinadas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz (Simões et al, 2009).

Favorecendo a redução do aparecimento de resistência, além de minimizar os efeitos tóxicos do tratamento com agentes antimicrobianos (Chanda, 2011).

Diante disso, neste estudo foi realizada uma avaliação da atividade antimicrobiana do timol e da sua associação com antimicrobianos convencionais frente à *Pseudomonas aeruginosa* e sua influencia na biossíntese de piocianina e biofilme.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre timol e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e sua atividade sobre a biossíntese de biofilme e piocianina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar a concentração inibitória (CIM) e bactericida (CMB) mínima do timol, meropenem, ciprofloxacino, ceftazidma pentaidratada, cloridrato de cefepima, piperacilina - sódica + tazobactan - sódico, sulfato de polimixina B frente a dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinar o índice da concentração inibitória fracionada (FICI) do timol e de agentes antimicrobianos.

Avaliar a formação de biofilme e da piocianina pelas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinar os percentuais de inibição de biofilme e piocianina após contato com associações de timol e antimicrobianos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Descrita pela primeira vez por Schroeter em 1972, *Pseudomonas aeruginosa* pertence à ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae e ao gênero *Pseudomonas* (Ozen *et al*, 2013). Caracteriza-se como bacilo Gram negativo, aeróbio estrito, não formador de esporos, podendo ser encontrado isolado, aos pares ou em pequenas cadeias, apresentam mobilidade através da presença de flagelo polar monotríquio (Staradumskyte, 2014).

Essa espécie faz parte de um grupo de micro-organismos bastante heterogênea e largamente distribuída na natureza, que apresentam metabolismo bastante versátil. Comumente habita o solo, água, vegetal e colonizam regiões úmidas da pele, incluindo as axilas, regiões anogenital, e ouvidos externos (Barankin, 2012). As mínimas necessidades nutricionais contribuem para seu sucesso ecológico e para seu papel como agente oportunista (Perez *et al*, 2011).

No processo respiratório, utilizam o oxigênio como o aceptor final de elétrons. No entanto, em casos estritos, o nitrato pode ser usado como aceptor final alternativo, permitindo o crescimento em condições de anaerobiose. O catabolismo da glicose e outros monossacarídeos ocorrem pela via de Entner-Doudoroff (Daddaoua *et al*, 2009). Para a classificação de *P. aeruginosa* devem ser consideradas algumas características metabólicas. Essa espécie é não fermentadora de carboidratos e produtora de citocromo-oxidase, arginina dehidrolase e ornitina descarboxilase. Além disso, produz pigmentos fluorescentes, como a piocianina e a pioverdina, o que facilita sua identificação (Arai, 2011).

### 3.2 PATOGENIA

A patogenia da infecção bacteriana, de modo geral, abrange o início do processo infeccioso e os mecanismos que levam ao aparecimento de sinais e sintomas da doença. *P. aeruginosa* pode causar infecções graves em pacientes com o sistema imunológico comprometido. Nesses casos, essas bactérias costumam ser invasivas e citotóxicas, frequentemente resultando em dano tecidual, disseminação sistêmica, septicemia e morte. A aderência e colonização das células epiteliais do hospedeiro são promovidas por fímbrias ou Pili que se estendem a partir da superfície celular da bactéria (Jawetz, 2010).

Para invasividade contribuem as enzimas e toxinas locais, dentre estas, podem ser citadas as elastases, protease alcalina e fosfolipase C. A produção de exotoxina A por *P. aeruginosa* é responsável pela inibição da síntese protéica em células eucarióticas e apresenta potentes efeitos locais e sistêmicos, incluindo necrose de tecidos moles e choque séptico (Papoff et al, 2012; Okuda et al, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* é conhecida por causar infecções agudas caracterizadas pela produção de toxinas e infecções crônicas pela produção de espessa camada de biofilme. Sua patogênese está diretamente relacionada à condição do hospedeiro, afetando principalmente pacientes queimados, com fibrose cística e internados em UTI cujo sistema imunológico está debilitado (Alasil et al, 2015).

Infecções causadas por *P. aeruginosa* são difíceis de tratar uma vez que estes microorganismos possuem altos níveis de resistência a vários antimicrobianos, e expressam diversos fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento de infecções persistentes (Strateva et al, 2009).

### 3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

#### 3.3.1 Adesinas

A adesão às células do hospedeiro é crítica para o estabelecimento da infecção. Quatro componentes estruturais de superfície de *P. aeruginosa* facilitam a adesão: (1) pili; (2) flagelos; (3) lipopolissacarídeo; (4) alginato (Bucior, 2012).

#### 3.3.2 Pili

As bactérias Gram negativas são dotadas de pili, apêndices semelhantes a pêlos que se estendem a partir da superfície da célula bacteriana, atuando como adesinas, e ajudam a mediar a aderência desta com a superfície das células hospedeiras (Thanassi et al, 2012).

Para Harmsen et al, 2010, as infecções graves causadas por *P. aeruginosa* decorrem em parte, da capacidade que essas bactérias possuem de colonizar superfície celular e objetos inanimados, inclusive dispositivos médicos de longa permanência. Nessa espécie esse processo é mediado pelo pili tipo IV polar (T4P). O T4P são filamentos fortes, flexíveis, com a partir de 15 kDa, constituídos por monômeros de pilina, extremamente finos (~ 60-80 Å), e longos (>1 micrometro), que suportam força > 100 pN (força normal), responsáveis pela adesão, motilidade, formação de microcolônias e biofilmes (Heiniger et al, 2010).

O primeiro passo para o estabelecimento de uma infecção por *P. aeruginosa*, é a adesão às células hospedeiras suscetíveis através do T4P (Giltner, 2010) essa aderência é mediada pela região C-terminal da subunidade estrutural do pili (Giltner, 2011).

O receptor celular para o pili é o gangliosídeo GM1 quando desprovido de ácido siálico, *P. aeruginosa* possui a capacidade de removê-lo através da sialidase previamente produzida pela bactéria (Pier, 2005).

O pili apresenta ainda, grande importância na colonização de superfícies inanimadas, inclusive de dispositivos intravasculares e de suporte respiratório. São encontrados na fase inicial ou aguda da infecção, mas são frequentemente perdidos devido a mutações durante infecções crônicas (Simões, 2010).

### 3.3.3 Flagelos

*Pseudomonas aeruginosa* apresentam mobilidade devido à presença de flagelos polares monotríquios. Os flagelos são apêndices piliformes compostos por proteínas com 12 a 30 nm de diâmetro. A mobilidade apresentada por essas bactérias é essencial para sua fixação e colonização em reservatórios ambientais, bem como em tecidos hospedeiros (Murray & Kazmierczak, 2008).

A formação e arquitetura do biofilme por *P. aeruginosa* está relacionada à motilidade mediada por flagelos, além das condições de cultura. Por conseguinte, a contribuição dos flagelos na formação de biofilmes não é clara, mas depende de vários fatores, incluindo as condições de cultura, o material de superfície, idade do biofilme e espécies bacterianas (Houry, 2009).

Esses apêndices são altamente imunogênicos e seu reconhecimento por glicolípídeos epiteliais é um potente estímulo para a produção de IL-8, uma citocina envolvida no recrutamento e ativação de células polimorfonucleares e ativação de macrófagos, além do que, a flagelina serve como um padrão molecular associada a agentes patogênicos (PAMP), ativando TLR5 (Receptores toll like) e induzindo imunidade inata no pulmão, estimulando uma resposta inflamatória protetora que contribui para a eliminação do patógeno (Campodónico et al, 2010).

### 3.3.4 Lipopolissacarídeo (LPS)

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é constituída por proteínas, fosfolípídeos e lipoproteínas, mas o componente principal são os lipopolissacarídeos (LPS ou endotoxina). O LPS é sintetizado na membrana citoplasmática e transportado para superfície celular da bactéria (Delucia et al, 2011).

O LPS é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, sendo considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas e infecções sistêmicas causadas por bactérias Gram-negativas (King et al, 2009).

As moléculas do LPS estão ligadas de forma não covalente por cátions divalentes, o que torna a membrana estabilizada e possibilita a formação de uma barreira contra moléculas hidrofóbicas. O LPS é liberado apenas quando a membrana é lisada e é constituído por três regiões: uma porção chamada lípideo A, uma região polissacarídica O-específica (antígeno O) e uma região polissacarídica conservada (core) (Chang et al, 2010).

O lípideo A é formado por duas moléculas de glicosamina, cada uma com três ácidos graxos complexados a um fosfato ou pirofosfato e está fixada na membrana externa e é responsável por ancorar toda estrutura do LPS à membrana externa da bactéria e a ele está associada toda reação imunológica (Maeshima, Fernandez, 2013).

À essa porção do LPS pode ser atribuído diversas atividades biológicas como: pirogenicidade, toxicidade, leucopenia seguida de leucocitose, ativação do complemento, queda de pressão sanguínea, agregação plaquetária, indução do fator plasminogênio, dentre outros (Peleg, Hooper, 2010).

O antígeno O é considerado o marcador mais estável para *P. aeruginosa*. A especificidade do polissacarídeo O está relacionada à composição das cadeias projetadas para o exterior da célula. Existem pelo menos 17 tipos de antígeno O, todos termoestáveis (Palleroni, 2009).

A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circundam a célula, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos. O LPS é capaz de ativar principalmente a resposta imunológica inata (inespecífica) com a participação dos macrófagos. Atua também na resposta imunológica adquirida (ou adaptativa), referente a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos (Mayer et al, 2011).

### 3.3.5 Piocianina

Piocianina (PCN) é um metabólito secundário, de coloração azul, ativo nas reações de oxido-redução, pertencente a um membro de uma grande família de compostos heterocíclicos conhecidos como fenazinas. Esses compostos são produzidos na fase estacionária de crescimento das *Pseudomonas aeruginosa* e são biologicamente ativos na competitividade microbiana e na virulência em hospedeiros humanos e animais (Sudhakar et al, 2013).

A biossíntese da PCN envolve dois operons homólogos contendo sete genes, *ephzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2*, estes codificam proteínas que catalisam a síntese do ácido fenazino-1-carboxílico (PCA) (Mavrod, 2001), a partir do ácido corismico. Em *P. aeruginosa* a conversão de PCA em piocianina são mediadas por N-metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina, PhzM, e a hidroxilase dependente da flavina, PhzS (Pierson, 2010).

Piocianina é um composto capaz de aceitar e doar elétrons. Em condições aeróbicas, o principal receptor de elétrons é o oxigênio molecular. Na sua forma reduzida PCN é incolor, ao doar um elétron para o O<sub>2</sub> criando assim ânion superóxido, adquire coloração azul (Rada, 2010). Em baixas condições de oxigênio PCN aceita principalmente elétrons do NADH gerados na oxidação de fontes de carbono. Assim, ajuda *P. aeruginosa* a sobreviver em baixas condições de oxigênio, aceitando e transportando elétrons produzidos na respiração de distância da bactéria a receptores encontrados em locais remotos (Koley et al, 2011).

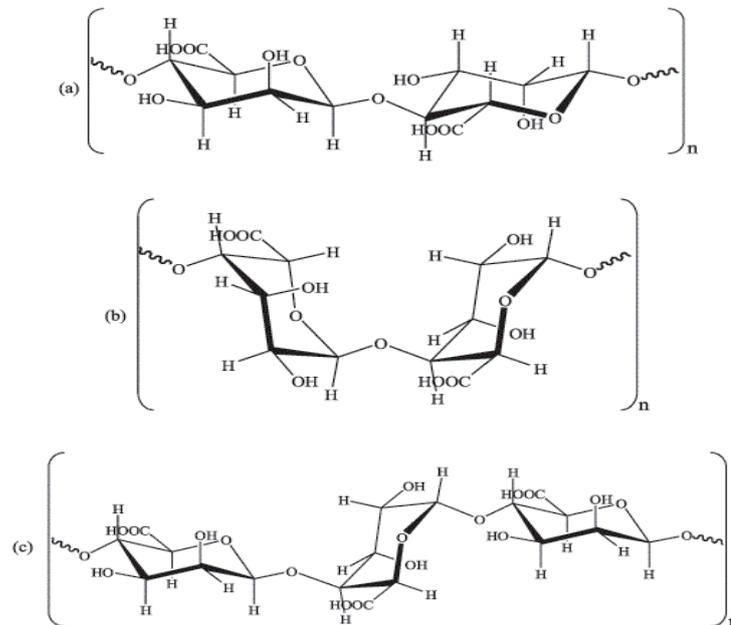
Essa natureza redox-ativa da PCN é responsável pela maior parte dos efeitos descritos em pacientes colonizadas por *P. aeruginosa*. Principalmente na doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose cística (Rada, 2010).

Nessas infecções as células epiteliais são as primeiras a serem expostas a PCN, que apresenta a capacidade de atravessar facilmente membranas celulares e oxidar diretamente pools intracelulares de NAD (P) H e produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que expõem a célula hospedeira ao estresse oxidativo (Rada, 2009).

### 3.3.6 Alginato

*Pseudomonas aeruginosa* é produtora de grandes quantidades de um mucopolissacarídeo, o alginato, responsável pela formação de uma matriz polimérica na superfície da bactéria, chamado biofilme. A produção do alginato permite a manutenção da arquitetura do biofilme, fornecendo resistência física (Franklin et al, 2011).

**Figura 1** – Composição do alginato: (a) cadeias de resíduos de ácido manurônicos; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos: cadeias de resíduos de ácido manurônicos e cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos alternados (Cruz et al, 2008).



A estrutura do ácido alginico (alginatos) consiste de cadeias lineares duos de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 $\rightarrow$ 4) e resíduos de seu epímero, o ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arranados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), ligados de forma que a seqüência destes resíduos na molécula seja alternada (Boyd & Chakrabarty, 1995).

### 3.3.7 Biofilmes

Os biofilmes são comunidades bacterianas multicelulares encapsulados em uma matriz extracelular produzida pelas próprias bactérias. Essa matriz é composta por polissacárideos, proteínas e ácidos nucleicos que medeiam à relação célula/célula e as interações da célula a superfície (Flemming & Wingender, 2010). Essas associações entre os micro-organismos constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (Sharma et al, 2013).

Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, micro-organismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS, Extracellular Polymeric Substances), partículas retidas (Barbara et al, 2009).

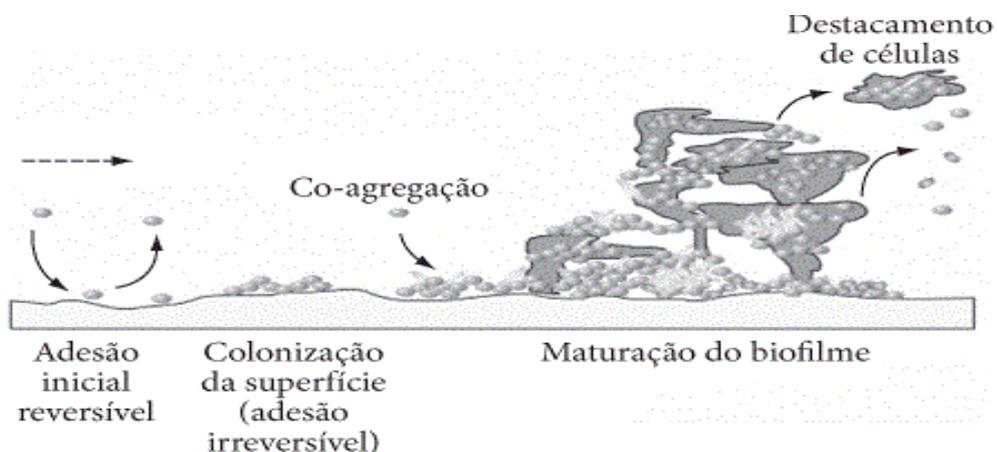
A água é a parte mais significativa da massa total do biofilme, variando entre 70 a 97% (Adewoye et al, 2002). Os micro-organismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume total (menos de 10%), entretanto estes micro-organismo excretam as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca (Pereira, 2001). Na composição do biofilme podemos encontrar ainda, proteínas, lipídeos, DNA, RNA e íons, aderidos a uma superfície sólida (Capelletti, 2006).

A primeira etapa da formação de biofilmes é denominada adesão e é realizada por colonizadores primários. É fundamentalmente controlada por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos micro-organismos e as macromoléculas do filme condicionador, formados a partir dos resíduos do ambiente. Segundo Clonts (2008), a formação e acumulação de biofilme depende de fatores físicos e biológicos.

A formação do biofilme envolve basicamente três etapas:

- 1) Na fase inicial, respondendo a sinais ambientais, as células aderem a uma superfície sólida por meio de adesinas, flagelos e pili;
- 2) Na fase de desenvolvimento, as células sofrem alterações nos seus fenótipos, reprimindo a expressão dos flagelos e pili e iniciam a formação da matriz exopolissacárida do biofilme, passando a ficar “irreversivelmente” aderidas à superfície;
- 3) Quando o biofilme atinge o estado maduro, a massa bacteriana é liberada e os microrganismos desprendidos poderão colonizar novos ambientes.

**Figura 2** – Esquema representativo do ciclo de desenvolvimento de biofilmes (Jenkinson, Lappin – Scott, 2001).



A existência do biofilme confere às células uma série de vantagens seletivas, tais como: a adesão à superfícies, proteção contra variações bruscas no ambiente, aumento da variabilidade antigênica, retenção de íons, nutrientes, proteção mecânica e resistência aos biocidas e detergentes. O biofilme permite à *P. aeruginosa* colonizar cateteres vasculares, dispositivos ortopédicos, fômites, aparelhos de suporte respiratórios dentre outros, favorecendo assim, o estabelecimento de diversos tipos de infecções (Kaplan, 2010).

### 3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *Pseudomonas aeruginosa*

#### 3.4.1 Bombas de efluxo

Bombas de efluxo são proteínas localizadas na membrana citoplasmática bacteriana que promovem o efluxo de substâncias tóxicas do meio intracelular, através de bombeamento ativo dependente de energia (Bambeke, 2000).

Uma análise no genoma de *P. aeruginosa* revelou que o sistema de efluxo Resistência Nodulação Divisão (RND) é predominante nessa espécie (Askoura et al, 2011) e contém doze genes estruturais para os sistemas de efluxo RND, dos quais quatro são clinicamente importantes: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN (Kumar, 2011).

A família RND, é composta basicamente por três componentes: O primeiro deles é uma proteína inserida na membrana citoplasmática e que desempenha a função de bomba; o segundo está localizada na membrana externa e forma o canal extrusivo e a terceira é uma proteína de fusão localizada no periplasma que une os outros dois componentes (Bador et al, 2012).

#### 3.4.2 Bombas de efluxo MexAB–OprM

Esse sistema é expresso constitutivamente em *P. aeruginosa*, sendo mais comum na determinação da resistência intrínseca e adquirida dessa espécie. Sua expressão é regulada por mexR, constituído por 147 resíduos de aminoácidos (Nehme et al, 2004), que regulam negativamente a expressão MexAB-OprM, a mutação compromete as funções de regulação resultando em bombas de efluxo superexpressas, podendo conferir a bactéria resistência a múltiplas drogas (Minagawa et al, 2012).

O sistema consiste em três subunidades, MexA consiste numa proteína ligadora; MexB a bomba e OprM funciona como o canal de saída das drogas . Como resultado, os antibióticos são aprisionados por MexB e transferido para OprM e extrudida por MexA (Murakami, 2006).

Esse sistema quando superexpresso confere a *P. aeruginosa* resistência a quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, novobiocina, trimetoprim, sulfonamidas carbapenêmicos (com exceção ao imipenem) (Morita et al, 2013) e também a outros compostos como a monoterpenos  $\alpha$ -terpineol e os álcoois relacionados (Shipp et al, 2008).

#### 3.4.3 Bomba de efluxo MexCD-OprJ

O sistema MexCD – Oprj, foi originalmente identificado como um determinante de resistência à fluoroquinolona, atualmente contribui para a resistência adquirida de *P. aeruginosa* a diversos antimicrobianos clinicamente relevantes incluindo,  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetoprim e macrolídeos (Neves et al, 2011).

#### 3.4.4 Bomba de efluxo MexXY-OprM

Neste sistema o operon *mexXY* é induzido por exposição aos antimicrobianos, esta bomba de efluxo é ativada apenas para antimicrobianos, cujo mecanismo de ação é a inibição da síntese proteica (Kadhom, Al jubori, 2013).

#### 3.4.5 Bomba de efluxo Mex EF-OprN

Esta bomba de efluxo é codificada pelo operon *mexEF-oprN*, sua superexpressão dá origem a resistência ao cloranfenicol, fluoroquinolonas, trimetoprim e triclosan (Lamarche, Dazel, 2011).

### 3.4.6 Perda da porina da membrana externa

A membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, constitui uma barreira semipermeável à captação de antibióticos e substratos moleculares. Fármacos hidrofílicos, como os  $\beta$ -lactâmicos, utilizam as porinas para ter acesso ao interior da célula, enquanto que os macrólídeos e outros fármacos hidrófobos se difundem através da bicamada lipídica (Li et al, 2012).

Diferentes porinas podem ser encontradas na membrana externa de *P. aeruginosa*, mas a OprF é uma porina inespecífica encontrada em maior quantidade. Ela permite a difusão não específica de espécies iônicas e nutrientes polares, incluindo polissacarídeos de peso molecular abaixo de 1519 Da. No entanto, apresenta-se ineficiente na difusão de antimicrobianos, o que se deve a heterogeneidade na formação de seu canal e a sua estrutura molecular (Naenna et al, 2010).

A porina OprD, também encontrada em *P. aeruginosa* é utilizada para permitir a passagem de aminoácidos de caráter alcalino e pequenos peptídeos os quais partilham uma semelhança estrutural com as moléculas de carbapenêmicos, essa porina é especializada na difusão de aminoácidos carregados positivamente, tais como lisina. Mutações que inativaram OprD foram documentadas e foi observada resistência ao imipenem e em menor grau ao meropenem e doripenem (Louie et al, 2010).

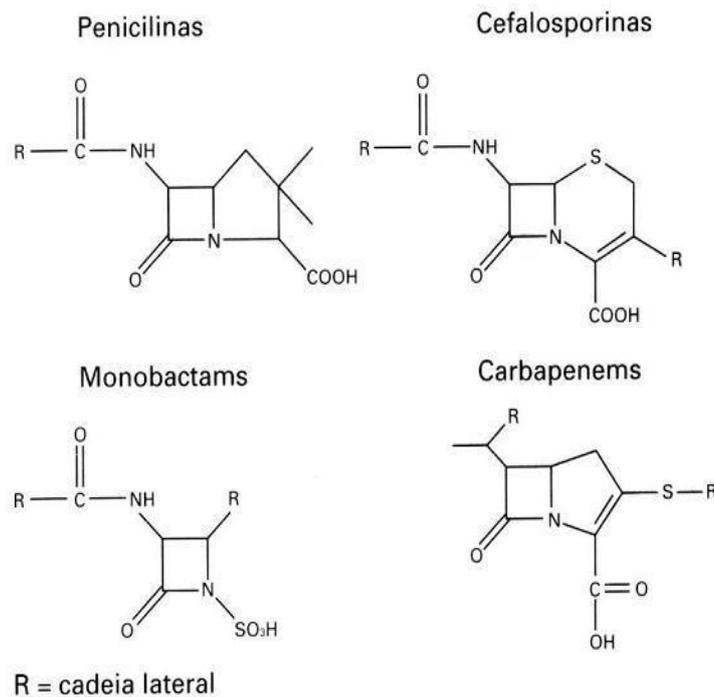
A redução na permeabilidade da membrana, causada pela perda desta porina não causa níveis expressivos de resistência em *P. aeruginosa*. No entanto, a convergência com outros mecanismos como a superexpressão de sistemas de efluxo é conhecido por ampliar o fenótipo de resistência desse micro-organismo (Denyer, Maillard, 2002).

### 3.4.7 $\beta$ -lactamases e *Pseudomonas aeruginosa*

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporina, carbapenêmicos, penicilinas e monobactâmicos), constituem uma classe de antimicrobianos com maior número de compostos prescritos, cujo mecanismo de ação é a inibição da parede celular (Sauvage et al, 2008).

Uma das causas de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é a produção de  $\beta$ -lactamases que são codificadas em cromossomos ou em plasmídeos extra cromossômicos. Essas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, formando um derivado sem atividade terapêutica (Zafer *et al*, 2014) e são comumente classificadas de acordo com Ambler (1980) e Bush-Jacoby Medeiros (1995). A classificação de Ambler agrupa as  $\beta$ -lactamases em quatro classes A, B, C e D de acordo com a homologia entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos (Ambler, 1980). A segunda classificação divide as  $\beta$ -lactamases em 4 grupos funcionais 1,2,3,4 e classificam as enzimas de acordo com suas características bioquímicas, imunológicas e enzimáticas.

**Figura 3** – Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Blanca, 2003).



Os antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, com atividade bactericida sobre *P. aeruginosa* multirresistentes. Estes antimicrobianos são empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares (Poirel *et al*, 2000; Rupp *et al* 2003 ).

No entanto, em 1994, houve o primeiro registro de bactérias resistentes aos carbapenêmicos. Essas bactérias produzem uma enzima denominada metallo- $\beta$ -lactamases

(M $\beta$ L) que causam a hidrólise da ligação C-N do anel  $\beta$ -lactâmico catalizada através de íons zinco ou outros cátions divalentes (Walsh et al, 2005).

Estas enzimas são numerosas e capazes de hidrolisar e inativar uma série de antibióticos beta-lactâmicos. Além de contribuir para a resistência a muitas outras classes de antibióticos, resultando na limitação de opções terapêuticas. Fármacos considerados inadequados devido à sua alta toxicidade, como, as polimixinas B são último recurso dos clínicos (Melletis et al, 2012).

### 3.5 ANTIMICROBIANOS

*Pseudomonas aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos e pode adquirir mecanismos de resistência adicionais devido a eventos de mutação ou a aquisição de elementos genéticos móveis (Meletis et al, 2012).

Devido à multirresistência, há um número limitado de agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por esta bactéria, incluindo neste grupo as cefalosporinas principalmente (ceftazidime e cefepima), fluoroquinolonas, monobactâmicos (aztreonam), carbapenêmicos e polimixinas (Solh, Alhajhusain, 2009).

As cefalosporinas de quarta geração são um dos poucos agentes eficazes sobre *P. aeruginosa*. No entanto, o aumento de isolados resistentes a essa classe tem sido relatada (Akhavue et al, 2012).

Os carbapenêmicos, fármacos de amplo espectro, com atividade bactericida no tratamento de infecções provocadas por *P. aeruginosa* multirresistentes, são considerados fármacos de escolha em casos de infecções nosocomiais causadas por bactérias Gram-negativas. O doripenem é outro carbapenemico com potente atividade *in vitro* contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É estável contra muitas  $\beta$ -lactamase, exceto para as da metalo- $\beta$ -lactamase (Neves et al, 2011).

Existe um constante surgimento e propagação de *P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolonas. Devido a sua ineficácia frente a infecções causadas por bactérias multirresistentes, seu uso esta em declínio (Pakyz et al, 2012).

A ausência de novas classes de antibióticos levou ao ressurgimento de antibióticos como último recurso no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes. A maior parte da reintrodução de antibióticos durante a última década tem se concentrado em Polimixina especificamente em colistina. Cujo benefício no tratamento de infecções graves causadas por *P. aeruginosa* ultrapassou os sérios riscos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Neiva et al, 2014).

### 3.6 MECANISMO DE AÇÃO

#### 3.6.1 $\beta$ lactamicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos impedem a formação das pontes do peptidoglicano, inibindo sua síntese. Este componente da parede bacteriana é constituído por cadeias de unidades repetitivas, compreendendo moléculas alternadas de N-acetilglucosamina e de ácido N-acetilmurâmico.

As cadeias lineares, por sua vez, são ligadas por filamentos laterais de aminoácidos que promovem a união entre os ácidos N-acetilmurâmicos. Existem quatro aminoácidos L e D alternados, sendo os mais comuns: L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico, D-glutamina e L-lisina ou ácido diaminopimélico (DAP). A ligação interpeptídica localiza-se entre o grupoamina do DAP e o grupo carboxilo da D-alanina. Essa ligação resulta na eliminação do terminal D-alanina e é denominada de transpeptidação. As transpeptidases ou PBPs atuam com o acil-D-alanil-D-alanina, originando um complexo enzima-acil-D-alanil e promovendo a eliminação do terminal D-alanin. Os  $\beta$ -lactâmicos atuam como análogos do referido desse complexo. Quando ligados entre si formam um complexo inibindo a síntese das ligações interpeptídicas do peptidoglicano crescente podendo causar alise da célula (Murray *et al*, 2005).

#### 3.6.2 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são antibióticos que bloqueiam a síntese de ácidos nucleicos através da inibição de enzimas topoisomerase tipo II em bactérias Gram-negativas e tipo IV em bactérias gram-positivas. Essas enzimas são necessárias para a replicação, recombinação e reparação DNA de bactérias. contra bactérias gram negativa a fluoroquinolona mais potente é a ciprofloxacina (Contreras et al, 2011).

### 3.6.3 Polimixina

São antibióticos anfipáticos que atuam primariamente nas membranas externa e citoplasmática, com ação semelhante a detergentes catiônicos simples. Ligam-se a componentes do envelope celular como fosfolipídeos e lipopolisacárides (LPS), deslocando competitivamente os íons Ca e Mg que agem como estabilizadores da membrana provocando ruptura da mesma, ocasionando perda do conteúdo celular e morte da bactéria (Mendes, Burdmann, 2009).

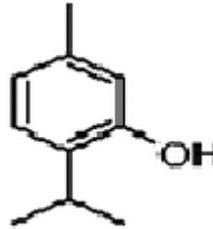
## 3.7 TERPENOS

Os terpenos são os hidrocarbonetos produzidos a partir de combinação de várias unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), sintetizadas no citoplasma de células de planta, pela via do ácido mevalônico a partir de acetil-CoA. Estes metabólitos secundários apresentam um esqueleto de hidrocarboneto que podem ser reorganizados em estruturas cíclicas por ciclases, formando assim estruturas monocíclicas ou bicíclicas (Caballero et al, 2003). Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno presente na molécula como: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpeno ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpenos ( $C_{30}H_{40}$ ) (PASSOS et al, 2009).

### 3.7.1 TIMOL

O timol é um monoterpeno fenólico, biossintetizado principalmente por plantas superiores a partir do  $\gamma$ -terpineno e *p*-cimeno (Baser E Demirci, 2007), cuja nomenclatura química é 2-propil-5metil-fenol com fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O$  e peso molecular de 150,22 g/mol. Esse composto apresenta-se na forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos e odor aromático, característico do tomilho. Seu ponto de fusão é 52°C e ebulição 233°C (Manuel et al, 2009).

**Figura 4.** Estrutura química do timol (Mastelic 2008).



Em 1992, o timol foi avaliado pelo Comitê de Especialistas em Substâncias aromatizantes do Conselho Europeu e desde então é permitida sua adição em alimentos até um nível de 50 mg/kg e de 10 mg/kg em bebidas. O timol também tem sido utilizado na medicina humana para o tratamento tópico de infecções da pele e tecidos moles na forma de pomadas e cremes e no cuidado com os dentes na forma de enxaguatórios bucais (Carmona, 2002).

Esse composto apresenta importante atividade antimicrobiana, no entanto seu mecanismo de ação não está totalmente conhecido. Mas acredita-se de uma forma geral que o timol cause danos estruturais e funcionais na membrana citoplasmática (Sikkema et al, 1995) e liberação de LPS (Helander et al, 1998 ; Shapira, Mimran, 2007). Além de interação com proteínas de membrana e alvos intracelulares. Podendo afetar processos de geração de energia reduzindo a capacidade de recuperação das células (Di Pasqua, 2010).

A anfipaticidade dos compostos fenólicos pode explicar as suas interações com biomembranas e, portanto, a atividade antimicrobiana. A parte hidrófila da molécula interage com a parte polar da membrana, enquanto que o anel de benzeno hidrofóbico e as cadeias laterais alifáticas estão inseridos na parte hidrofóbica da membrana bacteriana. O envolvimento do grupo hidroxila na formação de pontes de hidrogênio e a acidez desse composto fenólico podem justificar sua atividade antimicrobiana (Braga et al, 2011).

### 3.8 SINERGISMO

Sinergia entre fármacos envolve a combinação e a interação de dois ou mais agentes. Atualmente a terapia médica moderna começa a reconhecer o conceito de sinergia e usa-la no tratamento de diversas doenças complexas como o câncer, doenças reumáticas, doenças cardiovasculares (Merzenich, 2014) e também tem sido uma estratégia para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (Lee et al, 2010, An et al, 2011 e Celenza et al, 2012). Os principais objetivos da associação são alcançar a redução da dose e toxicidade, aumentar a eficácia do tratamento e minimizar ou retardar a indução de resistência aos medicamentos (Chou, 2006).

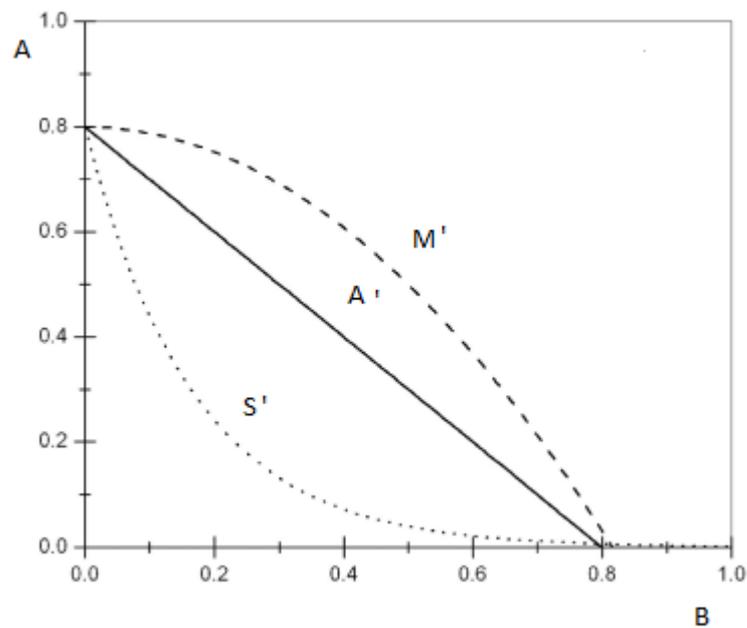
As interações entre fármacos podem acontecer de várias maneiras e atuarem de forma sinérgica, aditiva ou antagônica. Sendo o efeito sinérgico definido pelo aumento da atividade na associação, que está acima das potências e eficácias individuais, efeito aditivo quando a combinação é correspondente com as potências individuais da droga e antagonismo quando a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença do outro (Feala, 2010).

A avaliação dessas interações pode ser realizada através do método de isoblograma. Esta é uma expressão gráfica, desenvolvida e introduzida por Loewe (1927) que utiliza a relação dose-efeito de cada fármaco isolado e permite a compreensão da real natureza dessas interações, independentemente do seu mecanismo de ação ou da natureza das relações dose-resposta (Roks, 1999; Deckers, 2000). Essa análise distingue os três tipos mais importantes de interação: sinérgica, aditiva e antagônica (Figura 5).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes tornaram-se um problema de saúde pública, que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, internados em UTIs. Diante disso há um crescente interesse por novas alternativas que possibilitem diminuir o impacto dessas infecções na morbimortalidade desses pacientes. De maneira geral os esquemas de associação entre fármacos tem se mostrado uma importante ferramenta no tratamento dos indivíduos acometidos por bactérias multirresistentes (Chanda, 2011) e nas infecções por *Pseudomonas aeruginosa* tem sido recomendado principalmente à combinação de antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeo ou fluoroquinolonas (Dundar, 2010). Supõe-se que as combinações que abordam vários alvos simultaneamente são mais eficazes e menos propensos a induzir resistência bacteriana (Merzenich, 2009).

A utilização de combinação com constituintes de origem natural com drogas sintéticas é um novo conceito que vem sendo estudado, e que possivelmente contribuem no transporte de fármacos aumentando sua biodisponibilidade, favorece a superação dos mecanismos de resistência bacteriana e provoca menos efeitos adversos. No entanto, a utilização dessa abordagem é tecnicamente exigente e metodicamente complexa, mas abre perspectivas para a medicina futura (Merzenich, 2014).

**Figura 5.** Isoblograma mostrando o efeito da associação entre fármacos (A e B): (M'') antagonismo, (A'') adição e (S'') sinergismo (Biavatti, 2009)



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, que foram identificadas e mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismo do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco. Oito delas foram isoladas de pacientes hospitalizados e possuem o fenótipo de resistência (Tabela 1) a

diversos agentes antimicrobianos (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 16, LFBM 17, LFBM 18). Uma cepa isolada de água potável, *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 19 e um padrão da American Type Culture Collection *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9028 (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* origem do isolamento e fenótipo de resistência.

<i>P. aeruginosa</i>	Origem	Resistência
LFBM 01	Sangue	GAT; GEN; CFO; CTX
LFBM 02	Secreção hepática	GEN; AMI; CFL; CFO
LFBM 05	Sangue	CLO; ATM; SZT; AMP+ SAM
LFBM 06	Secreção	GEN; CFL; CFO; CTX
LFBM 15	Secreção traqueal	AMI; GAT; LEV; IMP
LFBM 16	Sangue	CFO; CTX; CLO; IMP
LFBM 17	Secreção ferida	SZT; ATM; TOB; IMP
LFBM 18	Sangue	STZ; IMP; LEV; TOB
LFBM 19	ÁGUA	AMI;IMP;CFZ;LEV
ATCC 9027	ATCC	CEPA DE REFERÊNCIA

LFBM – laboratório de fisiologia e bioquímica dos micro organismos; ATCC – American Type Culture Collection; GEN – Gentamicina; GAT – Gatifloxacina; CTX – cefotaxina; AMI – Amicacina; CFL – Cefalexina; ATM – Aztreonam; AMP – ampicilina; SAM – sulbactan; LEV – Levofloxacina; IMP – imipenem; TOB – tobramicina; CFZ – Cefazolina; SZT – sulfisoxazole; CFO – cefoxitina; CLO – cloranfenicol.

#### 4.2 CULTURA, MANUTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram mantidas sob óleo mineral. Para a reativação, estas culturas foram transferidas para tubos contendo caldo Mueller-Hinton e incubadas a 37° C por 18 horas. Em seguida estas suspensões foram diluídas e sua turbidez comparada ao tubo 0,5 Mac Farland, o que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC/mL e realizada uma diluição ao décimo de forma a padronizá-la em 10<sup>7</sup> UFC/mL.

#### 4.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS E TIMOL

Os agentes antimicrobianos selecionados para este estudo foram: Meropenem (Antibióticos ABL LTDA), Ciprofloxacino (Eurofarma), Cloridrato de cefepima (Biochimico LTDA), Piperacilina sódica + Tazobactan sódico (Cellofarma LTDA), Sulfato de polimixina B (Quimica Haller), Ceftazidima pentaidratada (Nova Farma LTDA).

O critério de resistência foi definido para cada agente antimicrobiano com base no que preconiza o CLSI 2013: meropenem (CMI ≥ 8); ciprofloxacino (CMI ≥ 4), cloridrato de cefepima (CMI ≥ 32); Piperacilina sódica + Tazobactan sódico (CMI ≥ 128/4); sulfato de polimixina B (CMI ≥ 8); ceftazidima pentaidratada (CMI ≥ 32).

O timol (Merck<sup>®</sup>) foi pesado analiticamente e solubilizado em um sistema composto por etanol/tween 80/ água destilada (1,5/0,5/3,5) de forma a obter uma solução padronizada em 5120 µg/mL. Todas as soluções estoque foram esterilizadas por filtração sob membrana Milipore<sup>®</sup> de 0,22 µm de porosidade. Uma avaliação antimicrobiana do sistema etanol/ Tween 80/ água, foi incluído para assegurar que este sistema não possui atividade intrínseca sobre as cepas *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CIM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em placa de 96 poços preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013), com algumas modificações. Para isso, 200µL da solução do agente antimicrobiano a ser avaliado foram dispensados nos poços de 1 a 12 da linha A de modo a obter concentrações que variaram de 0,125 a 2048 µL . Os demais poços foram pipetados com 100 µL de caldo Mueller- Hinton.

Uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para linha B e o procedimento foi repetido até a linha H. Posteriormente, um volume de 5µL ( $10^5$  UFC/mL), das culturas padronizadas de *P. aeruginosa* foi inoculado em todos os poços. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas. A inibição do crescimento foi indicada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina a 0,02% a cada um dos poços da placa de microdiluição e após incubação por uma hora em estufa bacteriológica a 37°C. A presença de uma coloração rosa nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório, enquanto a presença de coloração azul foi considerada como prova positiva da atividade antimicrobiana. A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano expresso em micrograma/mililitro capaz de impedir o crescimento da bactéria.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi realizada pelo método descrito por Lorian, 1986. Após a determinação da CIM, os poços onde não foram visualizado crescimento foram homogeneizados, e 0,01 mL do meio foram semeados em placa de Petri contendo o ágar Cetrimida. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. A CBM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inviabilizar 99,9 % do inóculo.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO SINERGISMO ENTRE O TIMOL E AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para o estudo da associação entre timol e os agentes antimicrobianos foi utilizado o método de *checkerboard* (Lorian, 1986).

A partir dos valores obtidos na determinação da CIM, foram preparadas soluções em caldo Muller Hinton, de forma a obter concentrações sub-inibitórias que variaram de 0,5 x CIM a 0,003 x CIM para o timol e de 0,5 x CIM a 0,0001 x CIM para os agentes antimicrobianos. Das diluições dos antimicrobianos, 100 µL foram depositados na orientação vertical. Na orientação horizontal foram depositados 100 µL das diluições do

timol. Cada poço foi inoculado com 5µL da suspensão bacteriana padronizada de forma a obter uma concentração final de  $10^4$  UFC/poço.

O critério de interpretação foi determinada após o cálculo do índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC index) obtido pela seguinte equação: (CIM do antimicrobiano associado ao timol/ CIM antimicrobiano) + (CIM do timol associado ao antimicrobiano/ CIM do timol). Os resultados foram também apresentados sob a forma de isobogramas. Valores de  $FICI \leq 0,5$  foram interpretados como sinergismo total e  $0,5 < FICI \leq 0,75$  sinergismo parcial. Efeito indiferente quando os valores foram de  $0,75 < FICI \leq 2$  e efeito antagônico quando  $FICI > 2$  (An et al, 2011).

As associações mais eficazes foram utilizadas para as etapas seguintes deste trabalho.

#### 4.7 BIOSÍNTESE E INIBIÇÃO DE BIOFILME

Para biossíntese do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado o meio Luria Bertani suplementado glicose e casaminoácidos a 0,4% . Um inóculo padronizado neste meio foi obtido da mesma forma como descrito no item 4.2. Este inóculo foi diluído a 1:100 e a partir deste, alíquotas de 100 µL foram retiradas e distribuídas em todos os poços das placas de microdiluição. Estas placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após esse período as culturas foram descartadas e as células bacterinas aderidas ao *poliestireno*, lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e coradas com 125 µL uma solução de cristal violeta a 0,1%. Estas placas foram postas em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida este corante foi também descartado e os poços lavados quatro vezes com água destilada esterilizada e secos. Para revelação do biofilme foram adicionados 125 µL de ácido acético glacial a 30%. Este volume de 125 µL foi transferido para outra microplaca e a leitura realizada na leitora de microplacas Biotek® ELx800 em comprimento de onda 550nm, usando o ácido acético glacial a 30% como padrão negativo da formação de biofilme (O'Toolle et al, 2011).

Para avaliação da inibição do biofilme, foram preparadas soluções dos antimicrobianos e do timol com base nos resultados do menor FICI de cada associação. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram postas em contato com as associações meropenem/timol e cefepime/timol em suas concentrações sub-inibitórias e iguais àquelas da CIM individual obtidas na associação. Assim em cada poço foram distribuídos 50 µL do

antimicrobiano + 50 µL do timol. Em seguida foram acrescentados 100 µL do inóculo de forma a obter  $10^4$  UFC/poço. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após este período foi realizado o mesmo procedimento acima descrito para quantificação do biofilme.

#### 4.8 BIOSÍNTESE E INIBIÇÃO DE PIOCIANINA

O meio líquido descrito por KING *et al* (1954), foi utilizado para potencializar a biossíntese de piocianina, cuja formulação consiste em g/L: Peptona bacteriológica 20,0; cloreto de magnésio 1,4; sulfato de potássio 10,0; glicerol 10,0. O pH deste meio foi ajustado para  $7,0 \pm 0,2$ .

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram inoculadas neste meio e incubadas a 37° C por 18 horas. A partir destas culturas os inóculos foram padronizados como descrito no item 4.2. e em seguida diluídas (1:10) no mesmo meio e incubadas a 37° C por 72 horas tempo suficiente para a biossíntese da piocianina. Em seguida, estas culturas foram centrifugadas e do sobrenadante, 5mL transferido para um tubo contendo 5mL de clorofórmio. Esta mistura foi vigorosamente homogeneizada em vortex por 30 segundos. A fase orgânica foi recolhida e acidificada com 1mL de ácido clorídrico a 0,2N, homogeneizada por 30 segundos e centrifugada por 15 minutos. A fase acidificada foi neutralizada através de uma titulação com uma solução de NaOH a 1 N até o aparecimento de uma coloração azul.

A leitura foi realizada no espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 num comprimento de onda de 690nm.

Para quantificar a inibição da piocianina, culturas de *Pseudomonas aeruginosa* foram postas em contato com as associações timol / meropenem e timol /cefepime em suas concentrações sub-inibitórias e iguais àquelas da CIM individual da associação. Desta forma o tubo continha 9,0 mL de caldo bacto peptona, 0,25 mL do agente antimicrobiano (meropenem ou cloridrato de cefepime), 0,25 mL de timol e 0,5 do inóculo. Estas culturas foram incubadas a 37° C por 72 horas. Após este período foi realizado o mesmo procedimento acima descrito para quantificação de piocianina.

A curva de calibração para análise dos resultados obtidos, foi realizada com uma solução padrão de CuSO<sub>4</sub>, obtida da seguinte forma: 50 ml de água destilada; 0.4994g de

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O e 0,6 g de tartarato de amônio foram dissolvidos, e uma solução de NaOH 0,08 M foi adicionado a fim de ajustar para um volume final de 100 ml (Kurachi , 1958).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do teste t – Student, usando o Graphpad Prism 5.0 para Windows, Graphpad Software (San Diego, califórnia) e  $p < 0,05$  foi usado como nível de significância

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os valores obtidos de CIM/CBM do timol e do sulfato de polimixina B, ceftazidima, piperacilina-sódica + tazobactam-sódico, cefepima, ciprofloxacino e meropenem estão apresentados na tabela 2.

O timol apresentou uma CIM de 640 µg/mL para as cepas avaliadas, com exceção a ATCC 9027, no qual a CIM foi de 320 µg/mL.

Todas as cepas de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade para o sulfato de polimixina B. A associação piperacilina-sódica + tazobactam-sódico foi eficaz para todas as cepas exceto para a LFBM 18 cuja CIM foi 128µg/mL.

Neste trabalho foram avaliadas duas cefalosporinas, uma de terceira geração, ceftazidima e outra de quarta geração, cefepima. Esta última mostrou ser eficaz frente a cinco cepas (LFBM 05, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 17 e LFBM 18).

Seis cepas de *P. aeruginosa* (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 16 e LFBM 18) foram resistentes ao ciprofloxacino cujos valores de CIM foram iguais a 16 µg/mL.

As cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 16 e LFBM 18 se mostraram resistentes ao meropenem cuja CIM variou de 16 a 256 µg/mL. Estes valores

foram de 2 a 32 vezes superiores aos definidos pelo CLSI, 2013 para caracterizar um microrganismo como resistente a este carbapenêmico.

Quatro cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, LFBM 18 apresentaram um perfil de resistência a meropenem e a cefepima e por essa razão foram escolhidas para as etapas posteriores deste trabalho.

Tabela 2. Concentração inibitória e bactericida mínima do timol e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	CIM/CBM( $\mu\text{g/mL}$ )						TIMOL
	PB	CAZ	PTZ	COM	CIP	MER	
ATCC 9027	0,250/0,5	16/ 32	16/64	16/32	0,125/1	0,125/0,50	320
LFBM 01	0,5/1	32/128	32/128	512/2048	16/128	256/512	640
LFBM 02	0,5/1	16/64	16/128	128/1024	16/128	128/256	640
LFBM 05	0,5/1	8/ 32	16/128	16/128	0,125/0,5	0,25/0,50	640
LFBM 06	0,5/1	4/ 32	16/128	16/128	16/32	32/256	640
LFBM 15	0,5/1	8/64	32/256	16/128	16/32	16/64	640
LFBM 16	0,5/1	32/128	32/256	128/256	16/32	16/128	640
LFBM 17	0,250/0,5	4/16	64/512	16/32	0,25/2	4/32	640
LFBM 18	0,5/1	8/ 32	128/512	64/512	16/64	32/256	640
LFBM 19	0,5/1	4/8	16/64	16/128	0,25/2	2/16	640

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bíoquímica de Micro organismos; PB – Polimixina B; CAZ – ceftazidma; PTZ – piperacilina – tazobactam; COM – cefepima; CIP – ciprofloxacino; MER – meropenem.

## 5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE O TIMOL E AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os resultados obtidos para CIM, FIC índice e percentual de redução da CIM para associação do timol e meropenem e a cefepima estão apresentados na tabela 3.

A atividade sinérgica dessas duas associações, utilizadas em concentrações sub-inibitória ( $\leq 0,5 \times \text{CIM}$ ), foi demonstrada pelos valores do FICI  $\leq 0.5$ .

A associação do timol com os antimicrobianos aumentou o índice bactericida destes últimos cujos percentuais de redução da CIM variou de 75 a 99,56 % e 50 a 99,5% para meropenem e a cefepima respectivamente.

Os valores da CIM do meropenem foram reduzidos de 256 para 64  $\mu\text{g/mL}$  frente a LFBM 01, de 16 para 0,07  $\mu\text{g/mL}$  para a LFBM 16, quando esse carbapenêmico foi associado ao timol.

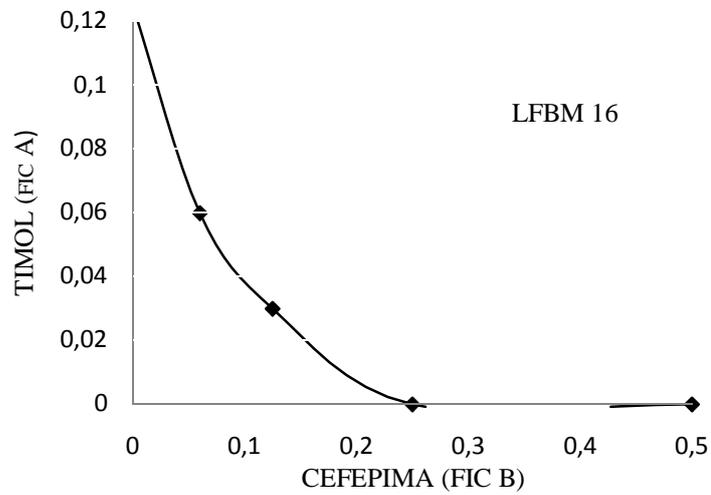
A cefepima em associação com o timol reduziu os valores da CIM de, 128 para 0,06 para a LFBM 02, e de 128 para 16 em LFBM 16 e de 64 para 32 em LFBM 18, de 512 para 32  $\mu\text{g/mL}$  LFBM 01. Esta última revelou o melhor FICI 0.1. Esses resultados estão apresentados nas figuras 5 a 7.

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do timol associado ao meropenem ou cefepima, Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

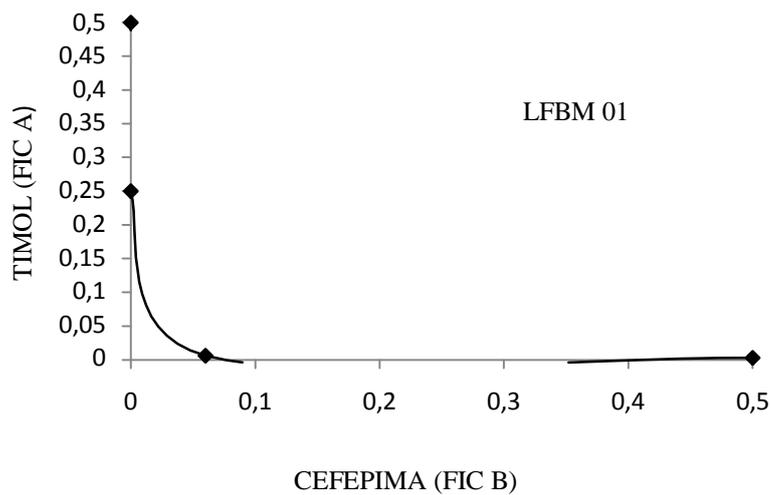
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Associação	CIM individual da associação ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de redução da CIM	FIC Individual	FICI
LFBM 01	timol/mero	80/64	87,5/75,0	0,015/0,025	0,37
	timol/cef	40/32	93,7/93,7	0,006/0,06	0,12
LFBM 02	timol/mero	160/0,06	75,0/99,9	0,25/0	0,25
	timol/cef	320/0,06	50,0/99,9	0,5/0	0,50
LFBM 16	timol/mero	160/0,07	75,0/99,9	0,25/0	0,25
	timol/cef	20/16	96,8/87,5	0,03/0,125	0,15

CIM: Concentração Inibitória Mínima; LFBM - Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro organismos; FIC - Concentração Inibitória Fracionada; FICI – índice da concentração inibitória fracionaria; Cef – Cefepima; Mero – Meropenem.

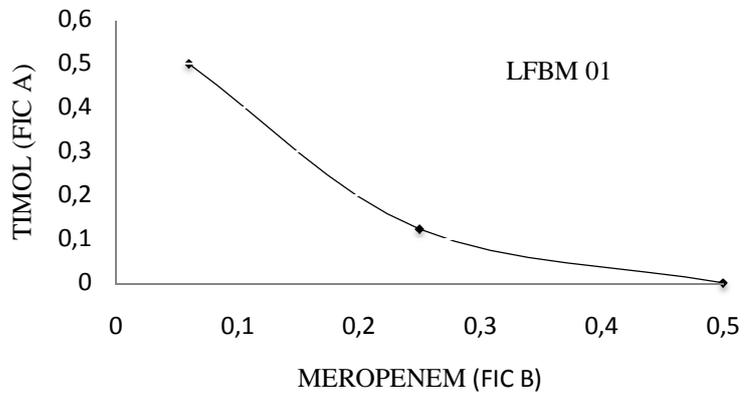
**Figura 6.** Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação timol/cefepima frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM16.



**Figura 7.** Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação timol/clordidrato de cefepima frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 01.



**Figura 8.** Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação timol/meropenem frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 01



### 5.3 BIOSÍNTESE E INIBIÇÃO NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os resultados expressos em percentual de redução da formação do biofilme frente a cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16 estão apresentados na tabela 4. Nesta etapa foram utilizados FIC índice que variaram de 0,12 a 0,5 para timol/cefepima e de 0,37 a 0,25 para timol/meropenem.

Tabela 4: Percentual de inibição na formação do biofilme em cultura de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	% de redução na formação do biofilme			
	timol/meropenem		timol/cefepima	
	CIM Associação ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{X} \pm \delta$	CIM Associação ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{X} \pm \delta$
LFBM 01	80/64	20,33 $\pm$ 1,4	40/32	87,98 $\pm$ 1,6*
LFBM 02	160/0,06	94,37 $\pm$ 0,2	320/0,06	94,42 $\pm$ 0,2
LFBM 16	160/0,07	72,77 $\pm$ 0,7	20/16	99,76 $\pm$ 0,3*

$\bar{X} \pm \delta$  = média e desvio padrão; CIM = Concentração Inibitória Mínima.\*diferença significativa entre as associações com o timol quando comparadas entre si ( $p < 0,05$ ).

As associações foram capazes de reduzir a formação de biofilme e estes valores variaram de 20,33 a 99,76 %.

A associação timol/cefepima se mostrou mais eficaz frente à cepa LFBM 01 e LFBM 16 em relação à associação timol/meropenem. Estes resultados foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

A cepa LFBM 02 apresentou valores de redução da formação de biofilme aproximados para as duas associações avaliadas, estes resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

Para LFBM 16 a associação timol/cefepima se mostrou mais eficaz na redução da formação do biofilme em comparação a associação timol/meropenem. Esta diferença foi estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

A cepa que apresentou o maior percentual de redução na formação de biofilme foi a LFBM 16 na associação timol/cefepima, sendo observada uma redução de praticamente 100%.

#### 5.4 BIOSÍNTESE E INIBIÇÃO DE PIOCIANINA

Os resultados expressos em percentual de redução na produção de piocianina pelas cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16 podem ser visualizados na tabela 5. Foram utilizados os valores de FIC índice que variaram de 0,12 a 0,5 para timol/cefepima e de 0,37 a 0,25 para timol/meropenem.

Tabela 5: Percentual de inibição na produção de piocianina em cultura de *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	% de redução na produção de piocianina			
	timol/meropenem		timol/cefepima	
	CMI Associação ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{X} \pm \delta$	CMI Associação ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{X} \pm \delta$
LFBM 01	80/64	$66,82 \pm 3,34$	40/32	$58,36 \pm 3,8$
LFBM 02	160/0,06	$73,76 \pm 0,78$	320/0,06	$75,58 \pm 0,67$
LFBM 16	160/0,07	$84,63 \pm 0,76$	20/16	$72,23 \pm 0,70^*$

$\bar{X} \pm \delta$  = média e desvio padrão; CIM = Concentração Inibitória Mínima. \*diferença significativa entre as associações com timol quando comparadas entre si.  $p < 0,05$ .

O percentual de redução na produção de piocianina por LFBM 01 foram próximos para as duas associações, estes resultados não apresentaram diferenças significativas

( $p < 0,05$ ). Para LFBM 02 também não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para as duas associações avaliadas.

A associação timol/meropenem se mostrou mais eficaz na redução da produção de piocianina por LFBM 16 em relação à associação timol/cefepima, essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Esta cepa foi a que apresentou o maior percentual de redução na produção de piocianina na associação timol/meropenem em relação às demais, esta redução foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes de infecções nosocomiais, podendo causar infecções graves em pacientes que apresentam quebras nas barreiras físicas e imunossupressão e está associada a um difícil prognóstico com elevados índices de morbidade e mortalidade (Neves, 2011). A terapia antipseudomonas é limitada ao uso das cefalosporinas, fluoroquinolonas, monobactâmicos e carbapenêmicos. No entanto, o aparecimento de cepas resistentes a esses grupos tem muitas vezes restringido o tratamento às polimixinas, cujo benefício no tratamento de infecções graves ultrapassou os sérios riscos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Neiva et al, 2014).

Diante disso, esquemas de associação entre fármacos tem sido uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes (Lee et al, 2010 , An et al, 2011 e Celenza et al., 2012 ) e se mostrado uma importante ferramenta para expandir o espectro antimicrobiano, evitar o surgimento de mutantes resistentes e minimizar os efeitos tóxicos da droga (Chanda, 2011). Nas infecções por *Pseudomonas aeruginosa* tem sido recomendado principalmente à combinação dos antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeo ou fluoroquinolonas (Dundar, 2010).

A sinergia entre antimicrobianos convencionais e moléculas de origem natural é uma nova abordagem que vem sendo estudada com resultados relevantes. Dentre essas moléculas, a sinergia com monoterpenos pode ser explicada pela modificação do seu alvo biológico que é a membrana celular, isso aumenta a absorção de antibióticos pela célula

bacteriana podendo resultar na morte da mesma (Palaniappan e Holley de 2010, Ulrich-Merzenich et al., 2010).

Neste trabalho foi observada atividade antimicrobiana do timol frente a cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*. Entretanto esta atividade se mostrou inferior quando comparada àquela obtida para os antimicrobianos avaliados.

Veras et al, 2014 avaliou a atividade do timol frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo valores de 512 µg/mL, caracterizando uma atividade moderada, esses resultados corrobora aos nossos.

Helander et al, 1998; Shapira, Mimran, 2007 observaram a atividade do timol sobre bactérias Gram negativas e concluíram que este terpeno além de desestruturar o LPS o liberava da parede celular desestabilizando-a. Estes autores verificaram que o timol interage com as proteínas da membrana bacteriana e várias enzimas desnaturando-as.

Burt, 2004 em seu estudo de revisão sobre a atividade de óleos essenciais, em especial, sobre monoterpenos atribuiu a atividade antimicrobiana do timol a mudanças na estrutura física da célula bacteriana devido ao seu efeito sobre a membrana, alterando a permeabilidade da mesma.

No entanto, a maior parte dessas moléculas apresenta atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas sozinhas (Simões, 2009).

Nesse estudo a associação entre timol e cefepima, uma cefalosporina de quarta geração, revelou um FICI 0,1 indicando assim, um efeito sinérgico. Esta associação foi capaz de reduzir a CIM inicial desta cefalosporina, que se mostrou ineficaz anteriormente.

A resistência de *P. aeruginosa* a cefepima se deve em parte as propriedades de permeabilidade da membrana externa, esta tem um impacto significativo sobre a resistência desse micro-organismo a antibióticos. Fármacos hidrofílicos, tais como β-lactâmicos, utilizam as porinas para ter acesso ao interior da célula, a perda de porinas específicas podem diminuir a sensibilidade de *P. aeruginosa* a esse agente antimicrobiano (Anne h. Delcour, 2009).

Outro mecanismo freqüente de resistência às cefalosporinas de espectro estendido em *P. aeruginosa* é a desrepressão AMPc β-lactamase cromossômico, mais comum na

resistência a ceftazidime. Enquanto resistência a cefepima está associada principalmente à superexpressão de bombas de efluxo, incluindo as bombas de MexCD-OprJ e MexXY-OprM (Jacoby, 2009).

A cefepima é amplamente utilizada em infecções graves causadas por *P. aeruginosa*, incluindo pneumonias, bacteremias e septicemias, associadas ao aumento no tempo de internação (Bauer, 2013). O resgate da atividade desse antibiótico quando utilizado em associação, como observado neste estudo pode contribuir para a redução das taxas de morbidade, mortalidade e dos custos com cuidados a saúde, ocasionados por essas infecções.

A associação timol/meropenem mostrou um efeito sinérgico, de forma que, a CIM do antimicrobiano foi reduzida drasticamente em relação aquela obtida quando avaliado isoladamente.

Meropenem é atualmente indicado para tratar infecções complicadas, como meningite bacteriana provocadas por *P. aeruginosa*. Perda da atividade desse antibacteriano pode acarretar em aumento de morbidade e mortalidade em pacientes acometidos por essas infecções (Hornik, 2013).

A resistência ao meropenem é geralmente multifatorial, envolvendo aumento da produção de  $\beta$  lactamases, redução de porinas presente na membrana externa (Livmore, 1992; Livmore, 2001, Quale, 2006) e também uma super expressão de diversas proteínas do sistema de efluxo (Masuda, 2000; Srikumar, 2000).

Num estudo realizado por Martínez, 2009 o principal mecanismo associado com resistência ao meropenem por *Pseudomonas aeruginosa* oriundas de isolados clínicos foi à super expressão de bombas de efluxo do tipo MexAB-OprM, MexXY-OprM e MexCD-OprJ, identificadas em 60% dos isolados avaliados.

Danos estruturais e funcionais na membrana externa provocados pelo timol, como afirma Sikkema et al, 1995 podem facilitar a passagem de moléculas como a cefepima ou meropenem, para o interior da bactéria, mesmo sem a presença de porina. As alterações na membrana plasmática sugerem uma possível interrupção da bomba de efluxo, principalmente nos componentes situados na membrana externa, ou seja, a proteína que forma o canal extrusivo e a proteína de fusão localizada no periplasma (Hyldgaard et al, 2009). Isso pode inibir ou diminuir, a expulsão destes antimicrobianos pela célula, permitindo assim, maior atividade (Lister, 2009).

Além dos mecanismos de resistência, *P. aeruginosa* possuem fatores de virulência, um deles é o biofilme responsável pela capacidade que essas bactérias possuem de causar infecções crônicas principalmente em pacientes imunocomprometidos (Hoiby, 2010). Bactérias no interior dos biofilmes são mais resistentes aos antibióticos que as células em seu estado planctônico, vários mecanismos podem ser responsáveis por essa resistência, incluindo a barreira física formada por substância exopoliméricas (Kavanaugh, 2012).

Em razão disso foi inserido neste trabalho, uma avaliação da biossíntese do biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa*, frente às associações de timol/cefepima ou timol/meropenem que tiveram o melhor efeito sinérgico, as associações foram capazes de reduzir significativamente a formação do biofilme.

Segundo Cowan 1999; Nostro 2004 a hidrofiliçidade do timol permite sua difusão através da matriz de polissacarideo, enquanto que as propriedades hidrofóbicas prevalentes deste composto podem levar a interações específicas com a membrana da bacteria, causando a morte da mesma. Kavanaugh, 2012 em seu estudo ressalta a possibilidade da matriz extracelular do biofilme adsorver os agentes antimicrobianos e aumentar a sua concentração local, podendo acarretar na morte da bactéria.

Neste trabalho foram observadas diferenças significativas na inibição do biofilme entre as cepas tratadas com a mesma associação. Segundo Kavanaugh, 2012 diferenças na forma ou estrutura dos biofilmes podem causar variação na susceptibilidade a antimicrobianos. Para Enright et al, 2002 essa susceptibilidade está associada a fase de desenvolvimento do biofilme.

A formação desse fator de virulência por bactérias é reconhecida como um problema em infecções crônicas devido à sua recalcitrância contra a defesa imunológica e esquemas terapêuticos com antimicrobianos (Rybtke et al, 2011). Essas infecções mostram-se recorrentes, após ciclos de terapia (Costerton, 1999), elevando os riscos de morte e os custos com o tratamento. Este fato reforça a necessidade da busca por novas drogas e esquemas terapêuticos contra esse importante fator de virulência.

Piocianina é outro fator de virulência de importância relevante nas infecções causadas por *P. aeruginosa*, devido seus efeitos tóxicos, colocando sistemas celulares sob aumento do estresse oxidativo (Morkunas, 2012). Esse pigmento é detectado principalmente nas vias respiratórias em pacientes com infecções crônicas (Rada, 2013).

Neste trabalho foi observado que as associações timol/meropenem e timol/cefepima reduziram a produção de PCN. Segundo Rada, 2013 a produção de PCN por *P. aeruginosa* alcança o pico máximo em 72 horas. Diante disso, podemos sugerir que a morte da célula ocorre antes que o pigmento seja produzido.

A variedade de efeitos fisiopatológicos nas vias aéreas dos pacientes com infecções pulmonares crônicas infectados por *P. aeruginosa*, tem sido relacionado à presença de altas concentrações de piocianina na expectoração desses pacientes (Mavrodi, 2001). Estudos demonstraram que os mutantes de *P. aeruginosa* deficiente no gene *phnAB*, que não produzem ou produzem níveis reduzidos de PCN, causam menor mortalidade do que a estirpe selvagem de *P. aeruginosa* (Lau, 2004).

## 7. CONCLUSÕES

O timol apresentou atividade antimicrobiana moderada frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas, cuja CIM foi de 640 µg/mL para todas as cepas, com exceção a ATCC 9027 que apresentou CIM de 320 µg/mL.

Todas as cepas se mostraram sensíveis a polimixina B, cinco destas mostraram-se resistentes a cefepima e quatro ao meropenem.

As associações entre o timol/cefepima e timol/meropenem revelaram sinergismo total sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas.

As associações entre timol/cefepima e timol/meropenem foram capazes de reduzir a produção de biofilme e piocianina.

## REFERENCIAS

- Abdelali Daddaoua, Tino Krell, and Juan-Luis Ramos. Regulation of Glucose Metabolism in *Pseudomonas*: The phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. **J Biol Chem.** 7 ; 284 (32) : 21360-8. 2009.
- Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. The repressor MexR the mexAB-OprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: mutations. Caracterização compromising activity. **J Bacteriol**; 184:4308-12. 2002.
- Alasil Saad Musbah, Rahmat Omar, Salmah Ismail, Mohd Yasim Yusof. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by culture extract from novel bacterial species of paenibacillus using a rat Model of Chronic Lung Infection. **International Journal of Bacteriology** Vol. 15. 2015.
- Alejandro M. S. Mayer; Jonathan A. Clifford; Monica Aldulescu; Jeffrey A. Frenkel; Michael A. Holland; Mary L. Hall; Keith B. Glaser; JohnBerry. Cyanobacterial *Microcystis aeruginosa* Lipopolysaccharide Elicits Release of Superoxide Anion, Thromboxane B<sub>2</sub>, Cytokines, Chemokines, and Matrix Metalloproteinase-9 by Rat Microglia. **Toxicol. Sci.** 121 (1): 63-72. 2011.
- Ali A. El Solh; Ahmad Alhajhusain. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J. Antimicrob. Chemother.** Vol. 64, 229-238, 2009.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 16; 289(1036):321-31. 1980.
- An, J. et al. Antibacterial and synergy of aflavononol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine.** v. 18, p. 990–993, 2011.
- Andrea Contreras, Ana R. Durán, Bethelgeuse Sibrian, María V. Méndez. Resistencia a Fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* aislados de tejidos blandos en pacientes con Diabetes Mellitus. **Comunidad y Salud.** vol.9 no.2, 2011.

Angela M. Delucia; David A. Seis; Ruth E. Caughlan; Patricia Gee; Ian Caça; Joseph S. Lam; Charles R. Dean reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and egfr-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas* pyocyanin. **Mucosal Immunol** 4(2): 158–171. 2011.

Arai Hiroyuki. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Microbiol.** 2: 103. 2011.

Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **The Libyan Journal of Medicine;** 6:10.3402. 2011.

Bakkali, F; Averbeck, S.D; Idaomar, M. Biological effects of essential oils- A. **review Food and Chemical Toxicology** 46: 446-475, 2008.

Barbara Vu, Miao Chen., Russell J. Crawford., Elena P. Ivanova Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molecules** 14(7), 2535-2554. 2009.

Bauer,a Jessica E. West,b James M. O'Brien,c Debra A. Goff Extended-Infusion Cefepime Reduces Mortality in Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Volume 57 Number 7 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 2907–2912. 2013.

Biavatti Maique Weber. Synergy: uma sabedoria antiga, um novo paradigma para a farmacoterapia. **Braz. J. Pharm. Sci.** vol.45 no.3 São Paulo July 2009.

Bradford PA., Bratu S, Urban C., Visalli M., Mariano N., Landman D., Rahal JJ., Brooks S., Cebular S., Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. **Clin Infect Dis** 1;39(1):55-60. 2004

Braga, PC; Ricci D. Thymol-induced alterations in *Candida albicans* imaged by atomic force microscopy. **Methods Mol Biol** 736:401-10. 2011.

Boyd A; Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. **J Ind Microbiol.** 15 (3): 162-8. 1995.

Bucior Iwona; Julia F. Pielage; Joanne N. Engel. *Pseudomonas aeruginosa* Pili e Flagelos Mediate Distinct Encadernação e eventos de sinalização na superfície apical e basolateral de Airway Epithelium. **PLoS Pathog.** 8 (4). 2012.

Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Amsterdam: **Academic Press**. 2003.

Carlos Alberto Caldeira Mendes, Emmanuel A Burdmann. Polimixinas: Revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Pp. 229-238.2009.

Carmona, M., Valero, A., Zalacaín, I, Salinas, M. R. Influencia del Thymol en la Puesta de Cría de la Abeja Melífera. **Vida Apícola** 299: 162, 2002.

Carolina S. Passos; Marcelo D. Arbo; Stela M. K. Rates; Gilsane L. von Poser Terpenoids with activity in the Central Nervous System (CNS) **Rev. bras. farmacogn.** vol.19 n.1a. 2009.

Celenza, G., Segatore, B., Setacci, D., Bellio, P., Brisdelli, F., Piovano, M., Garbarino, J.A., Nicoletti, M., Perilli, M., Amicosante, G.S. In vitro antimicrobial activity of pannerin alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Phytomedicine** 19, 596–602. 2012.

Chanda S., Dudhatra S., Kaneria M. Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the family Fabaceae family. **Food and Function** 1:308-315. 2010.

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

Chang SS; Gronenberg LS; Kahne D. Proteins required for lipopolysaccharide assembly in *Escherichia coli* form a transenvelope complex. **Biochemistry** 49:4565–4567. 2010.

Clonts, L. como evitar a formação d biofilmes. **Revista de controle de contaminação**. São Paulo, v. 109, p. 50-56, 2008.

Cornaglia, G. Mezzo secolo di cefalosporine: Le basi razionali di un successo. Le infezioni in medicina v.1, p. 18-23, 2000.

Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999

Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agentes. **Clinical Microbiology Reviews** 12 (4): 564; 1999.

Cristiani, M., D'Arrigo M., Mandalari, G., Castelli F., Sarpietro, M. G., Micieli, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 6300–6308. 2007.

Crispin Humberto, Garcia-Cruz; Ulisses Foggetti; Adriana Navarro da Silva. Bacterial alginate: technological aspects, characteristics and production. **Quím. Nova**. vol.31 n.7, 2008.

Chou TC Bases teóricas, design experimental e simulação computadorizada de sinergismo e antagonismo em estudos de associação de drogas. **Pharmacol Ver**; 68 621 – 81. 2006.

Denyer SP, Maillard JY. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **J Appl Microbiol**. 92 Suppl:35S-45S. 2002.

Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**. 10(5):1040-9. 2010.

Dundar D, Otkun M. In-Vitro Effectiveness of Antibiotic synergistic combinations in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Yonsei Medical Journal**; 51 (1). 2010.

Ehimare Akhabue, BA; Marie Synnestvedt, PhD; Mark G. Weiner, MD; Warren B. Bilker, PhD; Ebbing Lautenbach, MD, MPH. Cefepime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Center for disease control and prevention**. Volume 17, Number 6. 2011.

El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J. Antimicrob. Chemother.** Volume 64 (2): p. 229-238, 2009.

Feala JD, Cortes J, Duxbury PM, Piermarocchi C, McCulloch AD. Systems approaches and algorithms for finding combinatorial therapies. Wiley Interdiscip **Rev Syst Biol Med** 2: 181-193, 2010.

Feldman, M. *et al.* Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary y infection. **Infect Immun.** v. 66, n.1, p.43-51, jan.1998.

Fernández, et al. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. **Antimicrob. Agents Chemother.** 54: 3372–3382. 2010.

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology** 8, 623-633. 2010.

Filomena Nazzaro; Florinda Fratianni; Laura Martino; Raffaele Coppola; Vincenzo De Feo. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals** (Basel); 6 (12): 1451-1474. 2013.

Garima Sharma ; Saloni Rao ; Ankiti Bansal, Shweta Dang, Sanjay Gupta, Reema Gabrani. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**. Volume 42, Issue 1 2013.

Giltner CL, Habash M, Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into the type IV pilus. **J. Mol. Biol** 398:444–61, 2010.

Giltner CL; Rana N, Lunardo MN, Hussain AQ, Burrows LL. Evolutionary and functional diversity of the *Pseudomonas* type IV a pilin island. **Environ Microbiol.** 13:250–64, 2011.

G Meletis; M Exindari., N Vavatsi., D Sofianou., E Diza. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Hippokratia**. 16(4): 303–307. 2012.

George A. Jacoby. AmpC  $\beta$ -lactamases. **Clin Microbiol Rev**. 22 (1): 161-182. 2009.

Greay, SJ & Hammer, KA. Recent developments in the bioactivity of monoand diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, 2011.

Gurbuz, E. Yesilada, B. Demirci, E. Sezik, F. Demirci, K.H.C. Baser. Characterization of volatiles and anti-ulcerogenic effect of Turkish Sweetgum balsam (*Styrax liquidus*), **Journal of Ethnopharmacology** 148, 332-336, 2013.

Harmsen, M. *et al.* An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **Immunology and Medical Microbiology** 59: 253–268, 2010.

Heba Ameen Kadhom; Al-jabiri Sawsan Sajid Al-Jubori. Prevalence of mexxy gene mediated efflux pumps resistance towards aminoglycoside group among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mintage journal of Pharmaceutical & Medical Sciences**. Vol 2 Suppl 1, 2013.

Hirakata, Y., Izumikawa, K., Yamaguchi, T., Takemura, H., Tanaka, H., Yoshida, R., Matsuda, J., Nakano, M., Tomono, K., Maesaki, S., Kaku, M., Yamada, Y.; Kamihira, S.; Kohno, S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple drugresistant gram-negative rods carrying the metallo- $\beta$ - lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother** v.42, n.8, p. 2006-2011, 1998.

H. N. H. Veras., F. F. G. Rodrigues., M. A. Botelho., I. R. A. Menezes., H. D. M. Coutinho, J. G. M. da Costa. Antimicrobial Effect of Lippia sidoides and Thymol on Enterococcus faecalis Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. **The Scientific World Journal** Volume. 14. 2014.

Houry R. Briandet S. Aymerich M. Gohar Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. **Microbiology**. 156(Pt 4):1009-18. 2010.

Hui Li, Yi-Feng Luo, Bryan J. Williams, Timothy S. Blackwell, and Can-Mao Xie Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. **Int J Med Microbiol** 302 (2). 2012.

Hancock, I. Adaptive resistance to the “Last Hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. **Antimicrobial Agents and chemotherapy** vol 54, 2010.

Helander Ilkka M, Hanna-Leena Alakomi., Kyoösti Latva-Kala,† Tiina Mattila-Sandholm, Irene Pol., Eddy. Smid. Leon G. M. Gorris. Atte Von Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria . **J. Agric. Food Chem** 46, 3590-3595. 1998.

JB Kaplan. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **J Dent Res.** 89 (3):205-18. 2010.

Jenkinson, H. F.; Lappin-scott, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 9-10, 2001.

Joana Simões; Pedro Madureira; Fernando M. Nunes; Maria do Rosário Domingues; Manuel Vilanova; Manuel A. Coimbra. Immunostimulatory properties of coffee mannans. **Mol Nutr Food Res.** Volume 53, Issue 8, 1036–1043, 2009.

Josip Mastelić *et al*, Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives. **J. Agric. Food Chem.** 56 (11), pp 3989–3996. 2008.

Julien Bador, Lucie Amoureux, Emmanuel Blanc and Catherine Neuwirth. Innate Aminoglycoside Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* Is Due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump Antimicrob. **Agents Chemother.** 57(1): 603. 2013.

J. W. Costerton, Philip S. Stewart, E. P. Greenberg Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science.** VOL 284. 1999.

King, E. O; M. K. Ward; D. E. Raney. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J. Lab. Clin. Med.** 44:301, 1954.

King, J.D; Kocincova, D; Westman, E.L; Lam JS. Review: lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Innate Immun.**15:261–312. 2009.

Koley D, et al. Discovery of a biofilm electroline using real-time analysis metabolite 3D. **National Academy of Sciences of América.**108.: 19996-20001. 2011.

Kumar A, Schweizer HP. Evidence of MexT-Independent Overexpression of MexEF-OprN Multidrug Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* in Presence of Metabolic Stress. Van Melderen L, ed. **PLoS ONE** 6(10): 2011.

Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, S. W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. **Journal of food science**, v. 76, n. 9, p. R164–77, 2011.

Kurachi, M. This Bulletin, 25, 71 (1951); 26, 163 (1958).

Lamarche MG, Déziel E. MexEF-OprN Efflux Pump Exports the *Pseudomonas* quinolone Signal (PQS) Precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). ed. **PLoS ONE** 6(9), 2011.

Lau, GW; Hassett, DJ; Ran, H; Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Tendencies. Mol. Med.** 10, 599-606, 2004.

Lee, Y.S., Kang, O.H., Choi, J.G., Oh, Y.C., Keum, J.H., Kim, S.B., Jeong, G.S., Kim, Y.C., Shin, D.W., Kwon, D.Y. Synergistic effect to femodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharm.Biol.** 48, 1285–1290 2010.

Lister P. D, D. J. Wolter, and N. D. Hanson, “Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms,” **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 22, no. 4, pp. 582–610, 2009.

Li X. Z, Nikaido H, Poole K. Papel do MexA-MexB-OprM no efluxo de antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Agents Antimicrob Chemother** v. 39 :1948-1953, 1995

Li, X. Z., L. Zhang., R. Srikumar., K. Poole. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42:399–403, 1998.

Loewe S. Die Mischiarnei. **Klin Wochenschr**; 6: 1077 – 85. 1927.

Lorian, Victor. **Antibiotics in Laboratory Medicine. Copyright.** 2ed, 1986.

Louie A, Bied A, Fregeau C, Van Scoy B, Brown D, Liu W, Bush K, Queenan AM, Morrow Khashab M, Kahn JB, Nicholson S, Kulawy R, Drusano GL. Impact of different

carbapenems and regimens of administration on resistance emergence for three isogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains with differing mechanisms of resistance. **Antimicrob Agents Chemother** 54(6): 2638-45. 2010.

Luna Ruth Ann; Laura A. Millecker ; C. Renee Webb ; Sally Mason K; Elaine M. Whaley; Jeffrey R. Starke ; Peter W. Hiatt; James Versalovic. Molecular epidemiological Surveillance of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Pediatric Population of Patients with Cystic Fibrosis and Determination of Risk factors for Infection with the Houston-1 Strain. **J. Clin. Microbiol** 51 (4): 1237-1240. 2013.

Maeshima Nina; Rachel C. Fernandez. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD2 receptor complex. **Front Cell Infect Microbiol**. V. 3; 2013.

Mai M. Zafer; Mohamed H. Al-Agamy; Hadir A. El-Mahallawy; Magdy A. Amin; Mohammed Seif El-Din Ashour. Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cancer Patients. **BioMed Research International**. Vol.14. 2014.

Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Outer proteínas de membrana responsáveis pela resistência a múltiplas drogas em *Pseudomonas aeruginosa*. **agents Antimicrob Chemother** 39, 645-649. 1995.

Mavrodi, DV, Bonsall, RF, Delaney, SM, Soule, MJ, Phillips, G., Thomashow, LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. PAO1. **J. Bacteriol** 183. 6454 - 6465, 2001.

Masuda, N., E. Sakagawa., S. Ohya., N. Gotoh., H. Tsujimoto., T. Nishino. Contribution of the MexX-MexY-OprMefflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* . **Antimicrob. Agents Chemother** 44 : 2242- 2246, 2000.

Meletis G., Tzampaz E., Protonotariou E., Sofianou D. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM and blaKPC genes. **Hippokratia Medical Journal** 2: 139-140. 2010.

Merzenich Ulrich G; D. Panek, H. Zeitler, H. Vetter, H. Wagner Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. **Indian J. Exp. Biol.**, 48, pp. 208–219, 2010.

Merzenich Ulrich G, D. Panekb, H. Zeitlerb, H. Wagnerc, H. Vettera. New perspectives for synergy research with the „omic“-technologies. **Phytomedicine**. v.16, p.495–508, 2009.

Mesaros, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical microbiology infection** 13: 560-578, 2007.

Mike Kalisiak; Jaggi Rao. Answer: Can you identify this condition? **Can Fam Physician**. vol. 58 no. 10. 2012.

Michael J. Franklin, David E. Nivens , Joel T. Weadge , e P. Lynne Howell ·Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. **Front Microbiol.** ; 2: 167. 2011.

Michelin, D.C., Moreschi, P.E., Lima, A.C., Nascimento, G.G.F.; Paganelli, M.O., Chaud, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn** v.15, p. 316-320, 2005.

Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Front Microbiol** v. 4: 422. 2014.

Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**. 4:422. 2013.

Morten Hyldgaard, Tina Mygind., Rikke Louise Meyer: Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. **Front Microbiol**; 3: 12. 2012.

Murakami S, R Nakashima, Yamashita E, Matsumoto T., Yamaguchi A. crystal of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism, **Nature** v. 443 :173-9, 2006.

Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharm Biol**. 49(9): 893-9. 2011.

Murray PR, Drew WL, Kobayashi SG, Thompson JJH. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.79-95, 2000.

Naenna P, Noisumdaeng P, Pongpech P, Tribuddharat C. Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **J. Trop. Med. Public Health** 41:614–624. 2010.

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals** 6(12):1451-1474. 2013.

Nehme Dominic; Xian-Zhi Li; Rachel Elliot; Keith Poole. Assembly of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification and Characterization of Mutations in *mexA* Compromising MexA Multimerization and Interaction with MexB. **J. Bacteriol.** vol. 186 no. 10 2973-2983. 2004.

Neiva *et al.* Nefrotoxicidade da polimixina B estudo experimental em células e implicações para a prática de enfermagem. **Revista Escola de enfermagem**, 48(2): 272 -7. 2014.

Okuda, J; Hayashi, N; Okamoto, M; Sawada, S; Minagawa, S; Yano, Y., *et al.* Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the Intestinal Tract Is Mediated by the Binding of ExoS to an Na,K-ATPase Regulator, FXYD3. **Infect.Immun** 78, 4511-4522. 2010.

Ozen Asli I. & David W. Ussery Setting the *Pseudomonas* Genre: Where do we draw the line Azotobacter? **Ecol Microb** 63 (2): 239-248. 2013.

Palaniappan e Holley de 2010, K. Palaniappan, RA Holley. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, 140 pp. 164-168, 2010.

Papadopoulos CJ; Christine FC; Barbara JC; Riley TV. Role of efluxoMexAB-OprM pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance teatree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components monoterpenes terpinen-4-ol, 1,8-cineole and  $\alpha$ -terpineol. **Appl Environmen Microbiol** 74: 1932-5, 2008.

Papoff, P, Ceccarelli, G., d'Ettorre, G., Cerasaro, C., Caresta, E., Midulla, F. Gut Microbial Translocation in Critically Children and Effects of Supplementation with Pre- and Pro Biotics. **International Journal of Microbiology**. 2012.

Patrícia R. Neves; Elsa M. Mamizuka; Carlos E. Levy; Nilton Lincopan. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.47 n.4. 2011.

Peleg AY., Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. **N. Engl. J. Med**; 362:1804-1813.2010.

Perez Leandro Reus Rodrigues; Ana Lúcia Peixoto de Freitas; Afonso Luís Barth. Nutritional requirement among *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from respiratory clinical specimens at a tertiary hospital from South of Brazil. **Braz J Microbiol** 42 (3): 1061-1064. 2011

Pierson LS; Pierson EA. Metabolism and phenazine function in bacteria.: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied microbiology and biotechnology**; 86.: 1659-167. 2010.

Poirel, L. *et al.* Carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerg Infect Dis** v. 6, n. 1, p. 84-5, 2000.

Rada B, *et al.* A *Pseudomonas* pyocyanin toxina inibe o sistema antimicrobiano à base de oxidase dupla, dado que impõe estresse oxidativo nas células epiteliais das vias aéreas. **Journal of Immunology**. ; 181 .: 4883-4893. 2008.

Rada B, Leto TL. Redox warfare between airway epithelial cells and *Pseudomonas*: dual oxidase versus pyocyanin. **Immunol Res.**; 43(1-3):198-209. 2009.

Rada, B. & Leto, guerra TL. Redox entre as células epiteliais das vias aéreas e *Pseudomonas* .: dupla vs.pyocyanin oxidase. **Immunol Res** . 43, 198-209 2009.

Rahme, L.G.E.J; Stevens, S.F; Wolfort J; Shao, R.G; Tampkins Andf.M Ausubel. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science** 268: 1899-1902, 1995.

Rupp, M. E; Fey, P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Emerg Infect Dis** v. 63, n. 4, p. 353-65, 2003.

Rada Balázs , Paul Gardina, Timothy G. Myers, Thomas L. Leto. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas pyocyanin*. **Mucosal Immunol.** 2010; 4(2): 158–171. 20, 2010.

Ryan W. Heiniger ; Hanne C. Winther-Larsen; Raymond J. Pickles Michael Koomey Matthew C. Wolfgang. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. **Cellular Microbiology.** Volume 12, Issue 8, pages 1158–1173, 2010.

Rybtke MT, Jensen PO, Hoiby N, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. **Inflamm Allergy Drug Targets** 10(2):141-57. 2011.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiol Rev.** 32 (2):234-58. 2008.

Schultes, R. E; W. A. R. Thomson. The kingdom of plants. **Medicines from the Earth.** New York, p. 208. N.Y. 1978.

Shapira Roni; Efrat Mimran. Isolation and Characterization of *Escherichia coli* Mutants Exhibiting Altered Response to Thymol. **Microbial Drug Resistance** 13(3): 157-165. 2007.

Sikkema, J; Bont;J. A. M., Poolman, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev,** 59, 201-222. 1995.

Silva, Penildon. Farmacologia Clínica. Editora **Guanabara Koogan**, 7a edição, 2010.

Simões, C.M.O; Skenzel, E.P/ Gosmann, G; Mello, J.C. P: Hentz, L.A; Petrovick, P. R. FÁRMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 5 ed. PortoAlegre/ Florianópolis: **editora da UFRGS**, 2001.

Simões, M; Bennett, RN; Rosa, EAS. Understanding antimicrobialactivities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Reportv** 26, n.6, p. 746, 57, 2009.

Simões, C.M.O; Skenzel, E.P/ Gosmann, G; Mello, J.C. P: Hentz, L.A; Petrovick, P. R. *Fármacognosi: da planta ao medicamento*. 5 ed. PortoAlegre/ Florianópolis: **editora da UFRGS**. 2010.

Shipp JL, Hao X, Papadopoulos AP & Binns MR, Impact of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) on growth, photosynthesis and productivity of greenhouse sweet pepper. **Scientia Horticulturae** 72, 87-102, 1998.

Shu Minagawa; Hiroyuki Inami; Tomohisa Kato; Shinji Sawada Tatsuya; Yasuki Shinichi Miyairi; Manabu Horikawa; Jun Okuda; Naomasa Gotoh. RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. **BMC Microbiology**, 12:70. 2012.

Srikumar, R., X. Z. Li., K. Poole. Inner membrane efflux com- ponents are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol** 179:7875–7881, 1997.

Srikumar, R., T. Kon., N. Gotoh., K. Poole. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC- MexD-OprJ in a multidrug-sensitive. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:65–71, 1998.

Staradumskyte Daiva , Algimantas Paulauskas. Non-Fermentative Gram-Negative Bacteria in Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection** Vol.6 No.2, 2014.

Sudhakar, S. Karpagam, S. Shiyama. Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens. **International Journal of ChemTech Research**, 5. pp. 1101–1106. 2013.

Strateva Tanya ; Daniel Yordanov. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Med Microbiol.** vol. 58 no. 9 1133-114. 2009.

Stehling Guedes, Domingos S Leite, Wanderley D Silveira. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. **J Infect Dis** 14 (5): 462-467. 2010.

Thanassi David G; James B. Bliska<sup>1</sup> & Peter J. Christie. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. **Microbiol Rev** 36. 1046–1082. 2012.

Thomas S. Murray; Barbara Kazmierczak I. *Pseudomonas aeruginosa* Run exhibitions Motility in the Type IV Pili Absence and Scourge. **Bacteriol.** vol. 190. 8 de 2700-2708. 2008.

Trabulsi LR. Microbiologia, 5<sup>a</sup> ed. **Atheneu**; cap X. 219-27, 2000.

Victoria L. Campodónico; Nicolás J. Llosa; Martha Grout; Gerd Döring; Tomás Maira-Litrán; Gerald B. Pier. Avaliação of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. **Infect Immun.** V.78 (2); 2010.

Walsh, T.R; Toleman. M.A; Poirel, L; Nordmann, P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? **Rev Clin. Microbiol** v.18, n.2, p.306-325, 2005.

Yong D, *et al.* Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>N<sup>DM</sup>-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53:5046–505. 2009.