



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



DÉBORA LUIZA PAIVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SINÉRGICA DE
MUPIROCINA COM FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE *Protium spruceanum*.**

Ouro Preto/MG
2019

DÉBORA LUIZA PAIVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SINÉRGICA DE
MUPIROCINA COM FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE *Protium spruceanum*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade de Ouro Preto, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros
Teixeira

Coorientadora: Msc. Tatiane Roquete Amparo.

Ouro Preto/MG

2019

P149a

Paiva, Débora Luiza.

Avaliação da atividade antibacteriana sinérgica de mupirocina com fração hidrometanólica de *Protium spruceanum*. [manuscrito] / Débora Luiza Paiva. - 2019.

42f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros Teixeira.

Coorientadora: Prof^a. MSc^a. Tatiane Roquete Amparo.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Produtos naturais. 2. Medicamentos. 3. Pele. I. Teixeira, Luiz Fernando Medeiros. II. Amparo, Tatiane Roquete. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.3

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



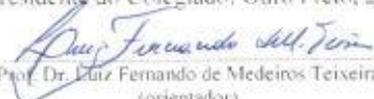
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

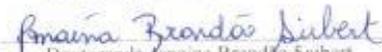


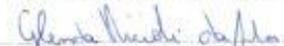
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 434ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 27 do mês de junho de dois mil e dezenove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 09 horas, na sala 02 da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia da candidata ao grau de Farmacêutico Generalista, **Débora Luiza Paiva**, matrícula 12.1.2122, intitulada **Avaliação da atividade antibacteriana sinérgica de mupirocina com fração hidrometanólica de *Protium spruceanum***. A Banca Examinadora foi constituída pela Doutoranda Janaina Brandão Seibert, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-ICEB-UFOP, pela Doutoranda Tamires Cunha Almeida, CIPHARMA-EF-UFOP, pela co-orientadora Doutoranda Tatiane Roquete Amparo, CIPHARMA-EF-UFOP e pelo orientador Prof. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira, DEACL-EF-UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado pela sua APROVAÇÃO, com a NOTA 7,0. Comunicou-se a candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado, Ouro Preto, 27 de junho de 2019.


Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira
(orientador)


Doutoranda Tatiane Roquete Amparo
(co-orientadora)


Doutoranda Tamires Cunha Almeida


Doutoranda Janaina Brandão Seibert


Profa. Dra. Glenda Nicoli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e meu pai por todo amor incondicional e por sempre estarem ao meu lado nunca me deixando desistir. Ao meu irmão Bruno, que de sua maneira sempre cuida e me apoia. E à toda minha família que sempre se preocuparam comigo.

Ao Cássio que sempre esteve em meu lado com o seu amor e apoio. A minha amiga Letícia que aturou minhas inseguranças durante o final do curso e que me apoiou bastante nos momentos difíceis. Aos meus amigos Lucas, Ludmylla, Pollyana, Bruno, Luiz Guilherme, Tamine, Nathália, Ana Carolina, Ana Julia e Felipe pela amizade e por fazer dessa jornada mais divertida e cheia de amor.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira pelo ensinamento. À minha coorientadora Msc. Tatiane Roquete Amparo pelos ensinamentos, confiança, atenção e paciência, o que tornou essa etapa mais leve e de muito aprendizado. Minha gratidão por me aceitarem como orientanda.

À Universidade Federal de Ouro Preto, principalmente à gloriosa Escola de Farmácia de Ouro preto, todo seu corpo docente e seus ensinamentos que possibilitaram me tornar uma profissional melhor.

RESUMO

A resistência microbiana aos antibióticos atuais é um problema global dificultando o tratamento de infecções. Dessa forma, torna-se importante a pesquisa por novos medicamentos. O estudo de produtos naturais é uma das possibilidades nesta busca, por meio de seu efeito sinérgico com antibióticos. *Protium spruceanum* é uma planta muito encontrada em algumas regiões do Brasil. Essa espécie possui ação anti-inflamatória e antibacteriana, podendo ser uma opção para um efeito sinérgico com antibacterianos tópicos no tratamento de infecções de pele e tecidos moles. Essas infecções, causadas principalmente por *Staphylococcus aureus*, apresentam uma alta prevalência e um número elevado de hospitalizações. O antibiótico mais usado no tratamento é a mupirocina. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar a possibilidade de ação sinérgica entre a mupirocina e fração hidrometanólica de folhas de *P. spruceanum*. Foi determinado a concentração inibitória mínima da fração, antibiótico e sua combinação contra *S. aureus*, MRSA e *S. epidermidis*, por microdiluição em caldo. A combinação de fração e mupirocina apresentou atividade sinérgica contra *S. aureus* e MRSA, com efeito indiferente para *S. epidermidis*. Também foi avaliada a inibição da formação de biofilme, pelo método de coloração por cristal violeta. Os resultados indicaram que houve inibição de formação do biofilme de *S. aureus* e MRSA, mas não houve inibição para *S. epidermidis*. O efeito sobre a permeabilidade de membrana foi avaliado por citometria utilizando iodeto de propídeo como marcador. Todas as três bactérias apresentaram aumento da permeabilidade de membrana quando tratadas com a fração, mas não apresentou aumento de permeabilidade em relação ao antibiótico, sendo esse efeito relacionado ao sinergismo. Portanto, a fração possui ação sinérgica com mupirocina e pode facilitar o tratamento de infecções de pele e tecidos moles.

Palavras-Chave: Sinergismo; infecções de pele; *Staphylococcus aureus*; Mupirocina, *Protium spruceanum*; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

Microbial resistance to current antibiotics is a global problem making it difficult to treat infections. In this way, research for new drugs becomes important. The study of natural products is one of the possibilities in this search, through its synergistic effect with antibiotics. *Protium spruceanum* is a plant very found in some regions of Brazil. This species has anti-inflammatory and antibacterial action and may be an option for a synergistic effect with topical antibacterials in the treatment of skin and soft tissue infections. These infections, mainly caused by *Staphylococcus aureus*, present a high prevalence and a high number of hospitalizations. The most commonly used antibiotic in treatment is mupirocin. Thus, the objective of this work is to evaluate the possibility of synergistic action between mupirocin and hydrometanic fraction of leaves of *P. spruceanum*. The minimum inhibitory concentration of the antibiotic fraction and its combination against *S. aureus*, MRSA and *S. epidermidis* were determined by microdilution in broth. The combination of fraction and mupirocin had synergistic activity against *S. aureus* and MRSA, with indifferent effect for *S. epidermidis*. Inhibition of biofilm formation was also evaluated by the violet crystal staining method. The results indicated that there was inhibition of *S. aureus* and MRSA biofilm formation, but there was no inhibition of *S. epidermidis*. The effect on membrane permeability was assessed by cytometry using propidium iodide as the label. All three bacteria presented increased membrane permeability when treated with the fraction but did not show increase of permeability in relation to the antibiotic, being this effect related to synergism. Therefore, the fraction has synergistic action with mupirocin and may facilitate the treatment of skin and soft tissue infections.

KeyWords: Synergism; Skin infections; *Staphylococcus aureus*; Mupirocina, *Protium spruceanum*; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1– Estrutura molecular da mupirocina.....	14
Figure 2 - Formação do biofilme.....	15
Figure 3 - Fotografia da <i>Protium spruceanum</i>	17
Figure 4 - Histograma representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência. Amostra de antibiótico em azul, amostra de fração em verde, amostra de fração + antibiótico em laranja, controle em preto. A- <i>S. aureus</i> B –MRSA. C- <i>S. epid</i>	26
Figure 5 - Gráfico representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência de análise de <i>S. aureus</i> . Amostra de antibiótico, amostra de fração, amostra de fração + antibiótico, controle. A letras diferentes apresentam $p<0,05$	27
Figure 6 - Gráfico representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência de análise de MRSA. Amostra de antibiótico, amostra de fração, amostra de fração + antibiótico, controle. A letras diferentes apresentam $p<0,05$	27
Figure 7 - Gráfico representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência de análise de <i>S. epidermidis</i> . Amostra de antibiótico, amostra de fração, amostra de fração + antibiótico, controle. A letras diferentes apresentam $p<0,05$	28
Figure 8 - Gráfico representativo de concentração de amostra em relação a quantidade de biofilme formado por <i>S. aureus</i> . A- Amostra de fração; B- Amostra de Antibiótico e C- Amostra de fração + antibiótico.	30
Figure 9 - Gráfico representativo de concentração de amostra em relação a quantidade de biofilme formado por MRSA. A- Amostra de fração; B- Amostra de Antibiótico e C- Amostra de fração + antibiótico.	31
Figure 10 – Gráfico representativo de concentração de amostra em relação a quantidade de biofilme formado por <i>S. epidermidis</i> . A- Amostra de fração; B- Amostra de Antibiótico e C- Amostra de fração + antibiótico.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e relação CBM/CIM das amostras de fração hidrometanólica de <i>P. spruceanum</i> e do antibiótico mupirocina.....	22
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) das amostras de fração, de antibiótico mupirocina e mistura fração + antibiótico.....	23

LISTA DE ABREVIÇÃO

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTT - Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólico

DMSO – Dimetil sulfóxido

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

OMS – Organização Mundial de Saúde.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVO GERAL.....	11
2.1	Objetivos específicos	11
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1	Infecções de pele e tecidos moles	12
3.2	Agentes etiológicos das infecções de pele e tecidos moles.....	12
3.3	Mupirocina.....	14
3.4	Biofilmes bacterianos	15
3.5	Sinergismo entre extratos vegetais e fármacos antibacterianos	16
3.6	<i>Protium spruceanum</i>	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Obtenção e fracionamento de extratos	17
4.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações hidrometanólicas e da mupirocina.....	18
4.3	Análise do efeito sinérgico entre a fração e a mupirocina.....	19
4.4	Teste de permeabilidade de membrana.....	20
4.5	Inibição da formação de biofilmes bacterianos	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
5.1	Determinação de CIM da fração hidrometanólica e da mupirocina.....	22
5.2	Análise do efeito sinérgico entre a fração e a mupirocina	23
5.3	Permeabilidade	24
5.4	Inibição da formação de biofilmes bacterianos	28
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A descoberta do antibiótico foi uma das grandes conquistas para a sociedade, e isso foi possível à medida que foram sendo realizados estudos sobre o funcionamento das bactérias planctônicas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Mas com o aparecimento de doenças endêmicas, vieram também os conhecimentos sobre a resistência bacteriana e sobre os biofilmes, que são constituídos por uma matriz extrapolimérica que propicia crescimento e proteção das colônias das bactérias (COSTERTON et al, 2003).

A resistência bacteriana é a causa de infecções de difícil tratamento e propicia uma maior permanência nas unidades de saúde, elevando o custo e conseqüentemente contribuindo para as complicações relacionadas a essas doenças (KADOSAKI, 2012).

Os problemas relacionados com a resistência bacteriana aos antibióticos é um obstáculo na saúde global e são relacionadas a vários aspectos. Sendo assim, é necessário haver um entendimento da ação dos antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bacteriana, políticas mais firmes de uso racional desses medicamentos e ações de controle de infecções em âmbito hospitalar e comunitárias. Além de planejamento e síntese de novos fármacos (SILVEIRA et al, 2006).

Pensando no planejamento de novos fármacos antimicrobianos, o estudo de produtos naturais tem sido uma alternativa (NASCIMENTO et al, 2000). Além de fármacos vindos desses produtos, há também a possibilidade de efeito sinérgico entre produtos de origem vegetal e antibióticos já existentes, potencializando a sua ação (CANTON; ONOFRE, 2010).

Uma das espécies vegetais que pode ser utilizada no estudo por novos antimicrobianos é a *Protium spruceanum*, da família Burseraceae, que além das atividades analgésica, anti-inflamatória, gastroprotetora e antialérgica, possui também ação antibacteriana (RODRIGUES et al, 2013; AMPARO, 2016). Dentre as espécies bacterianas sensíveis a extratos e frações de *P. spruceanum* destaca-se a *Staphylococcus aureus*, principal agente etiológico de infecções de pele e tecidos moles (AMPARO, 2016).

As infecções de pele, como impetigo, foliculites, celulites, abscessos e infecções de feridas e queimaduras, são doenças de alta prevalência e o número de hospitalizações tem aumentado rapidamente (JÄÄSKELÄINEN et al., 2016). Um dos antibióticos utilizados no tratamento de vários tipos de infecções de pele é a mupirocina, considerado o melhor agente tópico, porém existem relatos de resistência bacteriana a esse fármaco (PATEL; GORWITZ; JERNIGAN, 2015).

A mupirocina foi implementada na prática clínica em 1985, mas em apenas 2 anos houve o primeiro relato de resistência a *S. aureus* (MupRSA) (ANTONOV et al, 2015). Segundo Cookson (1998, p.1) “a mupirocina é bacteriostática, mas apresenta atividade bactericida em pH mais baixo semelhante a algumas partes da pele”. Possui uma grande importância no controle de *S. aureus* MRSA e *S.aureus*, pela descolonização de patógenos em pacientes, profissionais de saúde e de materiais médicos (HETEM; BOTEN, 2013).

Nesse trabalho, foi realizado um estudo de avaliação do efeito sinérgico entre uma fração polar de *Protium spruceanum* e o antibiótico mupirocina.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o sinergismo da mupirocina com a fração hidrometanólica de *Protium spruceanum*.

2.1 Objetivos específicos

- Obter as frações dos extratos de folhas de *Protium spruceanum*;
- Determinar a concentração inibitória mínima da mupirocina em relação as cepas testadas;
- Determinar a concentração inibitória mínima da fração hidrometanólica de *P. spruceanum* em relação as cepas testadas.
- Determinar a concentração inibitória mínima da combinação da mupirocina com as frações hidrometanólicas de *P. spruceanum* em relação as cepas testadas.
- Calcular o índice de concentração inibitória fracionada;
- Avaliar a ação contra biofilmes bacterianos;
- Avaliar o efeito sobre a permeabilidade de membrana das bactérias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Infecções de pele e tecidos moles

Segundo Souza (2003): “as infecções de pele e tecidos moles são caracterizadas por inflamação aguda, difusa, edematosa, supurativa e disseminada, que atinge a derme e o subcutâneo e a elas, frequentemente, estão associados sintomas sistêmicos, como febre e calafrios”.

Essas infecções são classificadas de acordo com a complexidade, como infecções superficiais ou complicadas. As superficiais geralmente são tratadas em ambulatórios e com antibióticos orais ou tópicos. Já as infecções complicadas, são aquelas que atingem tecidos mais profundos e necessitam de um cuidado mais especializado em hospitais, com medicamentos intravenosos e até mesmo intervenção cirúrgica em alguns casos (WEIGELT et al., 2005). Dentre as infecções cutâneas mais comuns têm-se: impetigo, ectima, erisipela e foliculites (PIRES et al., 2015).

As infecções de pele e tecidos moles são frequentes no ambiente hospitalar e representam 7% das infecções hospitalares (NOGUEIRA et al., 2009). Também são muito comuns no pronto atendimento, podendo até se tornar casos em que o paciente seja admitido na unidade de tratamento intensivo (UTI), devido a possibilidade de agravamento (MALHEIRO et al. 2017). Dentre as preocupações relacionadas a essas infecções está a resistência bacteriana e, segundo dados da OMS (2018), mais de 50% das infecções do sítio cirúrgico são resistentes a antimicrobianos.

3.2 Agentes etiológicos das infecções de pele e tecidos moles

Os principais agentes etiológicos das infecções de pele e tecidos moles são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio vulnificus* e *Clostridium perfringens* (SOUZA, 2003).

Dentre estas bactérias, *S. aureus* é considerado o principal agente etiológico das infecções de pele. Em estudo de Nogueira et al. (2009) *S. aureus* representou 20% das

infecções hospitalares, sendo o segundo mais prevalente, atrás apenas de *Klebsiella pneumoniae* (22%). E seguido por *Pseudomonas aeruginosa* (14%), *Acinetobacter* sp (13%), *Escherichia coli* (10%), *Enterobacter* sp (9%) e *Candida* sp. (9%). *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva que tipicamente é encontrada na superfície da pele, fazendo parte da flora natural, mas o comprometimento da barreira cutânea e a baixa imunidade faz com que o *S. aureus* demonstre patogenicidade (NETTO ZAVADINACK et al., 2001; YOSHII et al., 2017; PENG et al., 2018). Essa bactéria pode colonizar rosto, mãos, axila e virilha, mas seu habitat primário são as narinas (HENDERSON, 2006). Ela possui um importante papel nas infecções nosocomiais, infecções adquiridas na comunidade e é importante patógeno em infecções por biofilme (NETTO ZAVADINACK et al, 2001; YOSHII et al, 2017; PENG et al, 2018).

Netto Zavadinack et al. (2001) demonstraram que a prevalência de *S. aureus* foi de 66,35% em infecções com abscisão da pele e tecido celular subcutâneo, sendo o micro-organismo mais frequentemente encontrado. A alta prevalência dessa bactéria se tornou um problema, uma vez que, as infecções de pele causadas pelo *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) deixaram de ser uma questão exclusivamente hospitalar e se tornaram um problema emergente na comunidade (GELATTI et al, 2009).

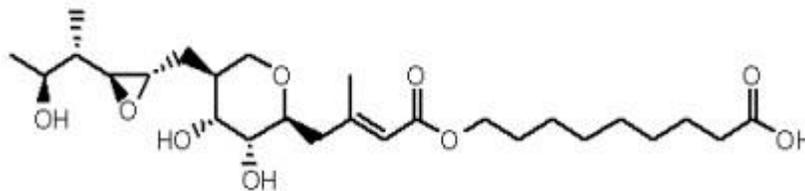
O MRSA mostrou elevadas taxas de resistência a penicilina (84,9%), oxacilina (77,3%), eritromicina (66,0%) e trimetropim mais sulfametoxazol (43,3%) (NOGUEIRA et al., 2009). Além desses antibióticos, têm-se observado uma alta prevalência de cepas de MRSA resistente a mupirocina (HETEM; BOTEN, 2013; CHATURVEDI et al., 2014).

Outro agente etiológico nas infecções de pele e tecidos moles é o *Staphylococcus epidermidis*, também uma bactéria gram-positiva comum na superfície da pele e no ambiente hospitalar (LOWY; HAMMER, 1983). Essa bactéria está muito associada a infecções por formação de biofilme em dispositivos médicos, como cateteres, eletrodos, marca-passos, entre outros (COLAN et al, 2012; ZIEBUHR et al, 2006). Essas infecções possuem grandes chances de ocorrer por contaminação durante a inserção desses dispositivos. Ocorrendo com com grande frequência e de difícil tratamento (OTTO, 2009).

3.3 Mupirocina

A mupirocina (Figura 1) é um dos antibióticos usados para tratamento de vários tipos de infecções de pele, considerado o melhor agente tópico e mais eficiente que bacitracina e neomicina e equivalente a antimicrobianos orais para terapêutica de impetigo, por exemplo (STEVENS et al, 2005). Os antibióticos de uso tópico, como a mupirocina, possuem vantagens: atingem grandes concentrações aos locais alvo, possui uma absorção sistêmica pequena e poucos efeitos adversos (UREN; PSALTIS; WORMAND, 2008). Além disso, esse antibiótico é utilizado também na descolonização de patógenos de mucosas, lesões cutâneas em pacientes e em profissionais de saúde e usado também para a prevenção de infecção em dispositivos médicos internos (MOURA et al., 2010; JOHNSON et al., 2002).

Figure 1– Estrutura molecular da mupirocina



Fonte: FERNANDES (2014. p.41).

A mupirocina é produzida pela bactéria *Pseudomonas fluorescense* e atua inibindo a síntese de proteína da bactéria. Em níveis séricos a mupirocina sofre rápida degradação a um metabólito antibacteriano inativo no plasma, dessa maneira ela só pode ser utilizada topicamente (SUTHERLAND et al 1985; UREN, PSALTIS, WORMAND, 2008). O uso prolongado desse antibiótico na descolonização de patógenos em pacientes causa uma alta prevalência na resistência, como demonstrado no estudo de Miller, et al (1996). Apesar da eficiência comprovada da mupirocina na descolonização de *S. aureus* na pele, há poucos estudos de sua ação nos biofilmes formados por essa bactéria.

3.4 Biofilmes bacterianos

O biofilme criado por *S. aureus* é caracterizado pela fixação de multicamadas de células a superfície, sendo embutidas em uma matriz polimérica (YOSHII et al, 2017; FEUILLIE et al, 2017; PENG et al, 2018). Após a fixação das bactérias à superfície, há a liberação de substâncias extrapoliméricas, constituídas de lipopolissacarídeos, proteínas, lipídeos, glicolipídeos e ácido nucleico, que formam o biofilme. Nessa fase ocorre a formação de microcolônias e a formação de uma camada de hidrogel na superfície da substância extrapolimérica criando uma barreira física entre a microcolônias e o ambiente externo. Com a formação dessa barreira, as células conseguem se replicar e se descolar da superfície e criar outras colônias e biofilme em outra superfície (Figura 2) (KAMARUZZAMAN et al, 2018). A presença do biofilme dificulta o tratamento, podendo levar a maior duração do uso de antibióticos e maiores doses, aumentando a resistência a esses medicamentos (YOSHII et al, 2017; FEUILLIE et al, 2017; PENG et al, 2018).

Figure 2 - Formação do biofilme



Fonte: Adaptado de KAMARUZZAMAN, et al (2018).

Segundo, Percival; McCarty; Lipsky (2015) em casos de feridas abertas, devido à falta da barreira de proteção, a contaminação por microrganismos endógenos ou exógenos é facilitada. O corpo responde a infecção com a atuação do sistema imune que controla ou destrói esses microrganismos. Ao estabelecer o biofilme, essa infecção exibirá resistência ao sistema imune e a antimicrobianos, se tornando uma infecção de difícil tratamento e necessitando de maior especialização.

3.5 Sinergismo entre extratos vegetais e fármacos antibacterianos

A resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado faz com que seja necessário buscar novas alternativas (OLIVEIRA et al, 2008). Visando melhorar a ação desses fármacos, são importantes as pesquisas com produtos naturais, visto que o sinergismo entre antibiótico e extratos de plantas tem ação contra bactérias resistentes e pode ser considerado um novo caminho para o tratamento doenças infecciosas (NASCIMENTO et al., 2000).

Estudos de sinergismo entre produtos naturais e antibióticos se tornaram uma alternativa para contornar o problema da resistência bacteriana. Vários estudos têm analisado a atividade de substâncias a partir de espécies de plantas. Por exemplo, Oliveira et al. (2006) em que demonstram que óleos essenciais de plantas medicinais de uso popular exerceram uma ação interferente na atuação de antibióticos, por sinergismo ou antagonismo.

Em um estudo realizado por Kifer; Muzinic, Klaric (2016) verificou-se a ação da mupirocina juntamente com três monoterpenos: mentol, 1,8-cineol e timol em relação ao biofilme formado por *S. aureus*, no qual foi comprovado o sinergismo na ação anti-biofilme e ação anti-inflamatória.

3.6 *Protium spruceanum*

Uma das espécies vegetais que podem ser utilizadas no estudo por novos antimicrobianos é a *Protium spruceanum* (Figura 3), da família Burseraceae. Essa família inclui 18 gêneros com 700 espécies e no Brasil está presente em grande parte na Amazônia (OLIVEIRA-FILHO; RATTER 1995). O gênero *Protium* é utilizado na medicina tradicional como analgésico, anti-inflamatório, gastroprotetor e antialérgico (RODRIGUES et al, 2013). Além disso, a *P. spruceanum* possui também ação antibacteriana, como demonstrado por Amparo (2016). Em seu estudo foram preparados extratos etanólicos e frações hidrometanólicas, hexânicas e acetatoetilênicas de galhos e folhas da espécie. As frações que apresentaram maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* e MRSA foram as hidrometanólicas e

acetatoetilênicas das folhas. Foram encontrados nos extratos metabólitos secundários das classes: terpenos, flavonoides, taninos e cumarinas e a presença de taninos totais foi relacionado com a atividade antimicrobiana total das frações.

Portanto, neste trabalho avaliou-se o sinergismo da fração polar de *P. spruceanum* com o antibiótico mupirocina, como uma alternativa para o tratamento de infecções de pele.

Figure 3 - Fotografia da *Protium spruceanum*.



Fonte: RODRIGUES et al (2013, p.7).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e fracionamento de extratos

Foi utilizada neste presente estudo a fração hidrometanólica de folhas da espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler., obtida por Amparo (2018). As extrações foram realizadas a partir dos materiais triturados por meio de maceração dinâmica assistida por ultrassom, com etanol 92,8°GL, sob temperatura ambiente e ciclos de 30 min. Filtrou-se e removeu-se completamente o solvente. Repetiu-se o processo até o esgotamento, quase total, do material vegetal.

Após secagem, as extrações etanólicas foram resuspendidas em metanol com água e realizou-se a partição líquido-líquido sucessivas em funil de separação utilizando hexano. Dessa maneira, foram obtidas as frações hexânica e hidrometanólica.

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações hidrometanólicas e da mupirocina

A atividade antimicrobiana das frações hidrometanólicas de galhos de *P. spruceanum* e da mupirocina foram avaliadas utilizando linhagens *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA (isolado clínico) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Determinou-se as concentrações inibitórias mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012).

No preparo do inóculo utilizou-se como base, a escala nefelométrica de McFarland. As bactérias cultivadas em ágar Muller Hinton por 24 horas, foram suspendidas em solução salina (NaCl 0,9%), de modo a se obter turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Essas suspensões foram diluídas 1:100 em caldo Mueller Hinton visando obter uma concentração final no teste de 5×10^5 UFC/mL.

Foram solubilizadas 24mg de fração em 60 μ L de DMSO e pipetou-se 18 μ L de uma solução estoque 2 mg/mL de antibiótico. Completou-se com caldo Mueller Hinton até o volume de 1,5 mL, para obter as concentrações de 16000 μ g/mL para a fração e 8 μ g/mL para a mupirocina. Utilizou-se placas de 96 poços e realizou-se diluições seriadas 1:2. Dessa forma, foram obtidas 8 concentrações, de 8 a 0,03125 mg/mL de fração e de 4 a 0,0625 μ g/mL de mupirocina.

Para controle de crescimento, foram adicionados 50 μ L de caldo Mueller Hinton. No controle positivo, adicionou-se 50 μ L tetraciclina (100 μ g/mL). No controle negativo, adicionou-se 50 μ L caldo Mueller Hinton com 4% de DMSO. Como controle de meio de cultura adicionou-se 100 μ L caldo Mueller Hinton.

Após a adição de 50 μ L da amostra e controles, foram adicionados 50 μ L de inóculo em cada poço (com exceção do controle de meio de cultura) e incubou-se as placas a 37°C por 24 horas. Ao final do tempo de incubação, adicionou-se CTT (Cloreto

de 2,3,5-trifenil tetrazólico) a 2,0 mg/mL e as placas incubadas por 3 horas. A menor concentração das frações e da mupirocina sem crescimento microbiano visível (sem coloração rosa) foram consideradas a CIM.

Os poços sem coloração visível até o primeiro com coloração visível foram repicados, com auxílio de alça bacteriológica para placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 24 horas e foi considerada como concentração bactericida mínima (CBM), a menor concentração em que não houve crescimento microbiano. Os testes foram realizados em triplicata.

A razão CBM/CIM foi calculada para definir o modo de antibiose das frações: bactericida quando $CBM/CIM \leq 4$ e bacteriostático quando $CBM/CIM > 4$ (AYALA-NÚÑEZ et al., 2009).

4.3 Análise do efeito sinérgico entre a fração e a mupirocina

Realizou-se a análise do efeito sinérgico utilizando uma mistura da fração hidrometanólica e da mupirocina em proporção de 1:1, solubilizados em caldo Mueller Hinton com 4% de DMSO, nas concentrações de 8000 µg/mL da fração e 2 µg/mL da mupirocina. A CIM da mistura foi determinada como descrito no item 5.2.

Com os resultados da CIM da mistura, da fração e da mupirocina, foram calculados a concentração inibitória fracionada (CIF) e o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), segundo GOTO et al, 1999.

Foram utilizadas as equações abaixo:

$$ICIF = CIF (fração) + CIF (mupirocina)$$

$$ICIF = \frac{CIM (fração na combinação)}{CIM (fração)} + \frac{CIM(mupirocina na combinação)}{CIM (mupirocina)}$$

Foi utilizada como referência a classificação de Fratini et al (2017), que propõem os valores ICIF para o efeito sinérgico de $ICIF < 1$, o efeito indiferente $1 > ICIF < 2$ e o efeito antagonista $ICIF > 2$.

4.4 Teste de permeabilidade de membrana

Para preparo do inóculo utilizou-se como base, a escala de McFarland. As bactérias cultivadas em ágar por 24 horas, foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%), de modo a se obter turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Essas suspensões foram diluídas em caldo Mueller Hinton, obtendo uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL. A fração, a mupirocina e a mistura de ambas foram diluídas em meio de cultura com 4% de DMSO para obter a concentração final no teste equivalente ao MIC. Em seguida, em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L da fração, do antibiótico e da fração associado ao antibiótico e 100 μ L do inóculo em cada poço, em triplicata. Para o controle foram adicionados 100 μ L de caldo Mueller Hinton e 100 μ L de inóculo. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram transferidas para tubos de citometria. Centrifugou-se as amostras por 10 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi ressuspensa em 100 μ L de solução salina, adicionado 1 μ L de iodeto de propídeo a 1mg/mL e homogeneizado. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min, ao abrigo de luz. A análise de citometria de fluxo foi realizada usando BD FACS Calibur (BD Bioscience®) e os dados foram analisados por Flow Jo v.10® (Chopra et al., 2015). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) e os dados foram avaliados por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Dunn, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

4.5 Inibição da formação de biofilmes bacterianos

Para a avaliação das frações contra biofilmes, utilizou-se a metodologia descrita por Matarasi e Dosler (2012), modificada.

Os inóculos foram preparados pela suspensão de colônias de bactérias cultivadas em ágar Mueller Hinton por 24 horas em salina (NaCl 0,9%), de modo a se obter turvação 0,5 na escala de McFarland. As suspensões foram diluídas 1:5 em caldo Mueller Hinton enriquecido com 2% de glicose.

Foram solubilizadas a fração e a mupirocina em caldo Mueller Hinton enriquecido com 2% de glicose e 4% de DMSO, para obter concentração de 16 mg/mL da fração e 200µg/mL da mupirocina. Em placas de 96 poços, foram adicionados caldo Mueller Hinton enriquecido com 2% de glicose a partir do segundo poço de cada coluna. Em seguida, adicionou-se solução da amostra no primeiro poço e realizou diluições seriadas 1:2, retirando do primeiro poço e adicionando no seguinte. Dessa forma, foram obtidas 6 concentrações, de 8,00 a 0,25 µg/mL e 100 a 1,5625 µg/mL de fração e mupirocina, em triplicata.

Para controle de crescimento, foram adicionados 50 µL caldo Mueller Hinton enriquecido com 2% de glicose. No controle positivo, adicionou-se 50 µL tetraciclina (100 µg/mL). No controle negativo, adicionou-se 50 µL caldo Mueller Hinton enriquecido com 2% de glicose 4% DMSO. Como controle de meio de cultura adicionou-se 100 µL caldo Mueller Hinton enriquecido com 2% de glicose.

Após adição das amostras, adicionou-se o inóculo as placas, que foram incubadas em 37°C por 24 horas. Após incubação, removeu-se o meio e os poços foram lavados com solução salina cuidadosamente e secou-se as placas a 50°C por 40 min.

Os biofilmes formados foram fixados com 200 µL de metanol por 15 min, o solvente foi removido e a placa seca novamente. Em seguida, adicionou-se 30µL de cristal violeta 1% v/v em água e depois de 5 min lavou-se a placa com água destilada. As placas foram secas e adicionou-se 100 µL de etanol. Após a solubilização efetuou-se a leitura da absorbância em 570 nm em leitor de ELISA. Os valores de absorbância foram utilizados para calcular a porcentagem de biofilme em relação ao controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação de CIM da fração hidrometanólica e da mupirocina

Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 1. A razão CBM/CIM da fração hidrometanólica apresentou resultados ≤ 4 para as três bactérias sendo então bactericida, já para a mupirocina as três bactérias apresentaram resultados > 4 , sendo então bacteriostático (AYALA-NÚÑEZ et al., 2009).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e relação CBM/CIM das amostras de fração hidrometanólica de *P. spruceanum* e do antibiótico mupirocina.

	Fração			Antibiótico		
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM/CIM	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM/CIM
<i>S. aureus</i>	2000	4000	2	0,125	>2,0	16
MRSA	2000	4000	2	0,062	1	16,12
<i>S. epidermidis</i>	2000	8000	4	0,062	0,5	8,06

A atividade bactericida possui vantagens clínicas em relação a atividade bacteriostática, podendo apresentar uma menor indução de resistência por eliminar as bactérias (FRENCH, 2006). A fração apresentou atividade bactericida, podendo contribuir para o efeito sinérgico com a mupirocina.

A pele apresenta um pH mais ácido até 5,5 e durante a realização desse trabalho foi utilizado um pH de aproximadamente 7,0. O pH é um fator que influencia na atividade da mupirocina, que apresenta segundo Sutherland et al (1985); Casewell, Hill (1985), uma maior atividade em pH mais ácido. Dessa forma, justifica-se o resultado de que a mupirocina apresentou um caráter bacteriostático e não bactericida nas condições testadas.

No tratamento de infecções de pele, o efeito bacteriostático ou bactericida é considerado um fator indiferente, como demonstrado no estudo de Nemeth; Oesch; Kuster (2014) em que não houve diferença na resposta do tratamento em relação a ser bacteriostático ou bactericida. Dessa maneira, a mupirocina é um medicamento que possui grande aplicação no tratamento de tais infecções.

5.2 Análise do efeito sinérgico entre a fração e a mupirocina

Os resultados obtidos durante os experimentos (Tabela 2) demonstram valores de ICIF para *S. aureus* e MRSA abaixo de 1, indicando assim, efeito sinérgico entre fração e mupirocina para essas duas bactérias. Já o resultado obtido para *S. epidermidis* apresentou valor de ICIF entre 1 e 2, indicando efeito indiferente (FRATINI et al, 2017).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) das amostras de fração, de antibiótico mupirocina e mistura fração + antibiótico.

	Fração	Antibiótico	Fração + Antibiótico	
	CIM	CIM	CIM	ICIF
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	
<i>S. aureus</i>	2000	0,125	Fração 250 + Antibiótico 0,062	0,621
MRSA	2000	0,062	Fração 125 + Antibiótico 0,031	0,562
<i>S. epidermidis</i>	2000	0,062	Fração 250 + Antibiótico 0,062	1,125

O sinergismo entre antibacterianos e extratos de plantas pode ser uma opção quando durante o tratamento de infecções, o antibiótico por si só não consegue mais ser efetivo (NASCIMENTO et al, 2000). Há um crescente número de estudos de sinergismo entre antibióticos e extratos vegetais, como uma opção para tratamento de infecções.

Um desses estudos é o de Sato et al (2004) em que há um efeito sinérgico entre a mupirocina e a isoflavonona bidwillon B contra cepas MRSA. Outra desses estudos é o de Onlen et al (2007) que avaliou o efeito sinérgico do própolis, que tem em sua composição flavonoides entre outros compostos, com a mupirocina e obteve uma redução de bactérias na narinas de coelhos com a combinação de mupirocina e própolis, quando comparado com o tratamento do cada um separadamente.

5.3 Permeabilidade

Para a análise de permeabilidade de membrana foi analisado a fluorescência causada pelo iodeto de propídeo ao passar pela a membrana e se ligar ao DNA. Através dos resultados das análises por citometria (Figura 4), nota-se que para as três bactérias o tratamento com fração associado ao antibiótico induziu aumento da permeabilidade da membrana. As amostras de fração isolada também apresentaram um aumento de permeabilidade em relação as três bactérias, porém esse efeito não foi observado para o antibiótico sozinho (figuras 5,6,7).

A fração apresenta flavonoides sem sua composição entre outros compostos, como demonstrado por Amparo (2018). Esse aumento de permeabilidade pode estar ligado a presença desses flavonoides. Há estudos que relacionam a presença de flavonoides quando usados em combinações apresentam o aumento de permeabilidade de membrana.

Um desses estudos é o de Eumkeb et al (2011) comprovam que a combinação de flavoines com amoxicilina apresentaram aumento da permeabilidade de membrana de microrganismos, mas que os dois sozinhos não apresentaram essa ação. Outro estudo que demonstra a atividade antibacteriana dos flavonoides é o de Cushnie; Lamb

(2005) em que a catequetina, galato de epicatequina, 3-O-octanoil apresentaram moderada e alta permeabilidade de membrana.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o efeito sinérgico entre fração e mupirocina está relacionado com o aumento da permeabilidade de membrana induzido pela fração, entretanto, a amostra de *S. epidermidis* também apresentou um aumento da permeabilidade da membrana, mas esse efeito não foi suficiente para resultar em sinergismo entre fração e antibiótico. Dessa maneira, são necessários mais estudos para esclarecer esse efeito em *S epidermidis*.

Um dos mecanismos de resistência das bactérias é a redução da permeabilidade da membrana e isso resulta na diminuição de absorção de antibióticos (ABREU; MC BAIN; SIMÕES, 2012). A mupirocina associada a fração apresentou um aumento da permeabilidade da membrana, dessa maneira, esse aumento pode diminuir a resistência das bactérias e aumentar a ação do antibiótico, por facilitar sua entrada na célula bacteriana.

Figure 4 - Histograma representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência. Amostra de antibiótico em azul, amostra de fração em verde, amostra de fração + antibiótico em laranja, controle em preto. A- *S. aureus* B –MRSA.

C- *S. epidermidis*

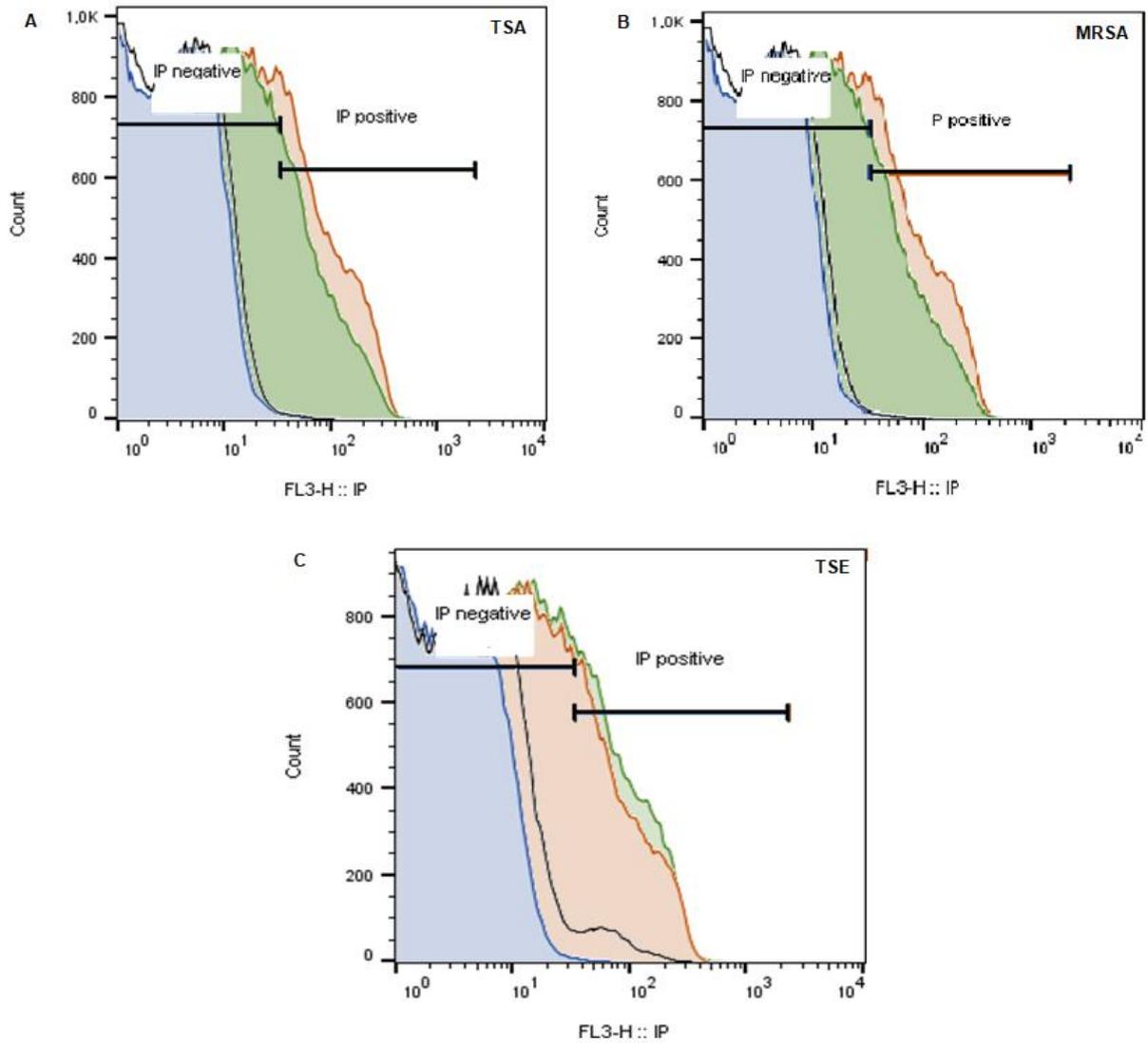


Figure 5 - Gráfico representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência de análise de *S. aureus*. Amostra de antibiótico, amostra de fração, amostra de fração + antibiótico, controle. As letras diferentes apresentam $p < 0,05$.

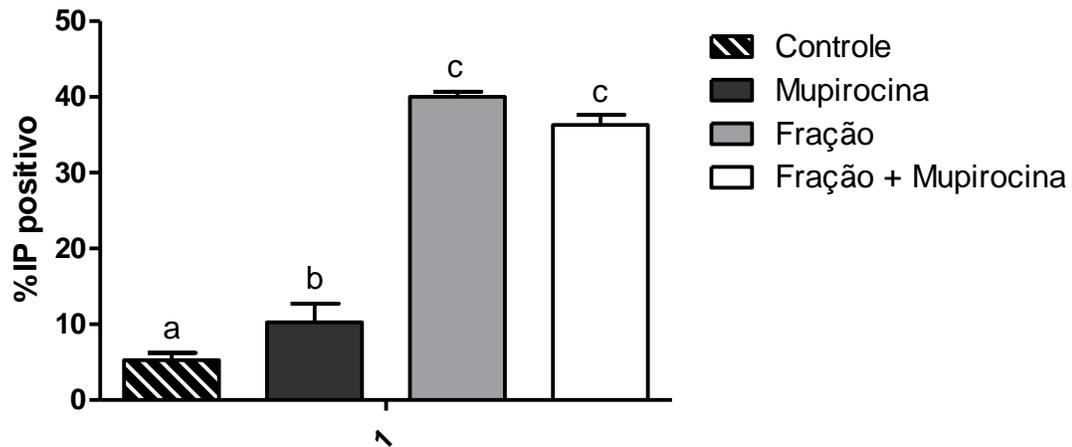


Figure 6 - Gráfico representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência de análise de MRSA. Amostra de antibiótico, amostra de fração, amostra de fração + antibiótico, controle. As letras diferentes apresentam $p < 0,05$.

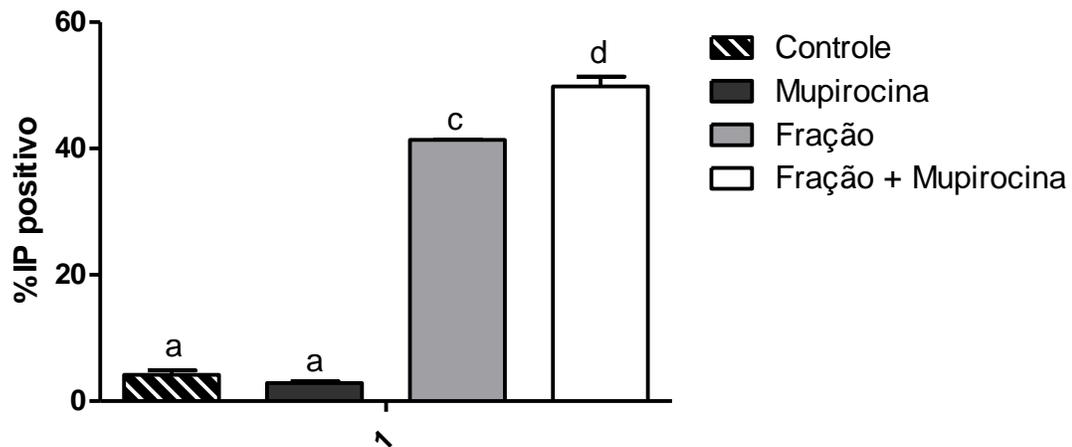
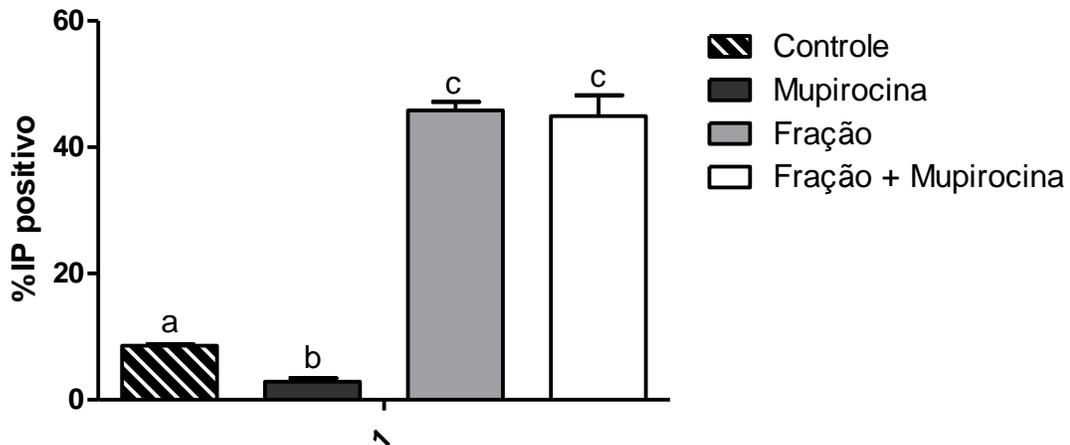


Figure 7 - Gráfico representativo dos resultados expressos em porcentagem de células com fluorescência de análise de *S. epidermidis*. Amostra de antibiótico, amostra de fração, amostra de fração + antibiótico, controle. As letras diferentes apresentam $p < 0,05$.



5.4 Inibição da formação de biofilmes bacterianos

Os resultados obtidos durante os experimentos de inibição de biofilme estão apresentados nas figuras 8, 9 e 10 abaixo. Pode-se observar que a fração em concentrações maiores, inibiu a formação de biofilme pelo *S. aureus* e o MRSA, demonstrados nas figuras 8 e 9.

Já em *S. epidermidis*, demonstrado na figura 10, a fração não apresentou nenhum resultado com significância. O antibiótico mupirocina foi capaz de inibir a formação de biofilmes das três espécies de bactérias testadas. Além disso, para *S. aureus* e MRSA, o antibiótico quando combinado com a fração demonstrou melhor efeito, onde menores concentrações foram necessárias para a inibição.

Como demonstrado por Sritharadol, et al (2018) concentrações sub-inibitórias podem apresentar efeito de indução da formação de biofilme pelo *S. aureus*. Neste trabalho, esse efeito de indução foi observado para MRSA e *S. aureus* pelas amostras testadas.

Figure 8 - Gráfico representativo de concentração de amostra em relação a quantidade de biofilme formado por *S. aureus*. A- Amostra de fração; B- Amostra de Antibiótico e C- Amostra de fração + antibiótico.

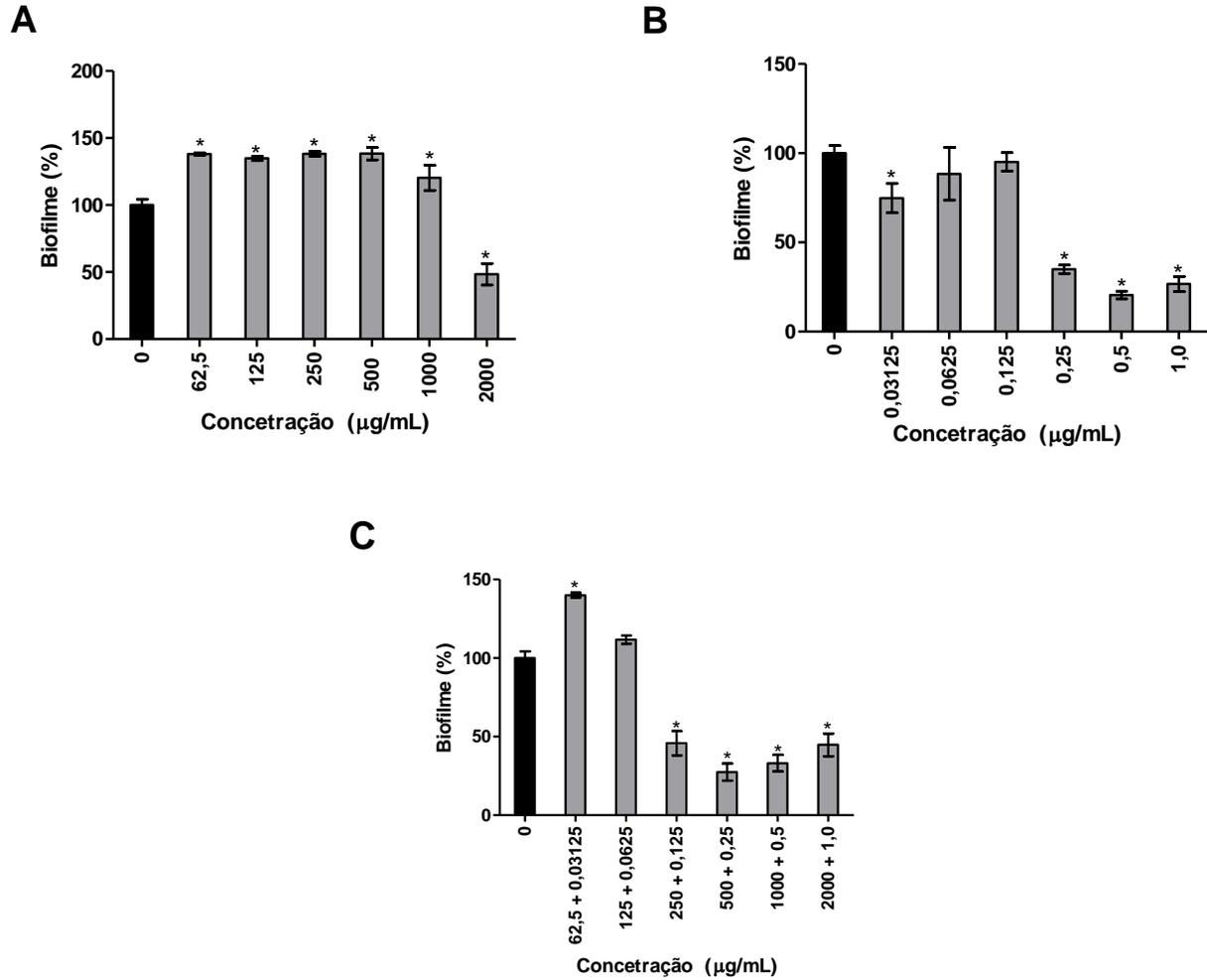
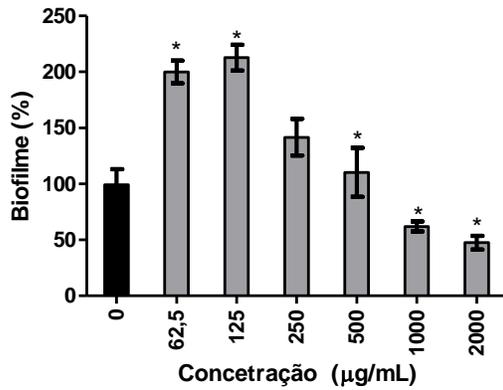
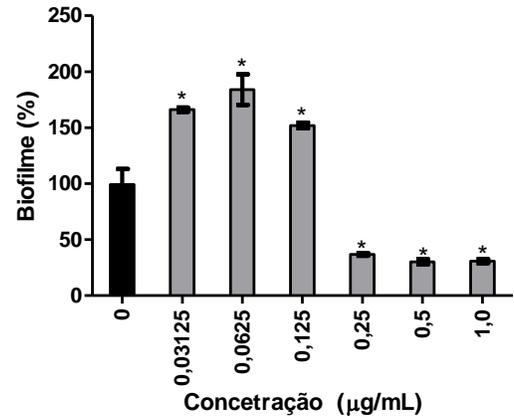


Figure 9 - Gráfico representativo de concentração de amostra em relação a quantidade de biofilme formado por MRSA. A- Amostra de fração; B- Amostra de Antibiótico e C- Amostra de fração + antibiótico.

A



B



C

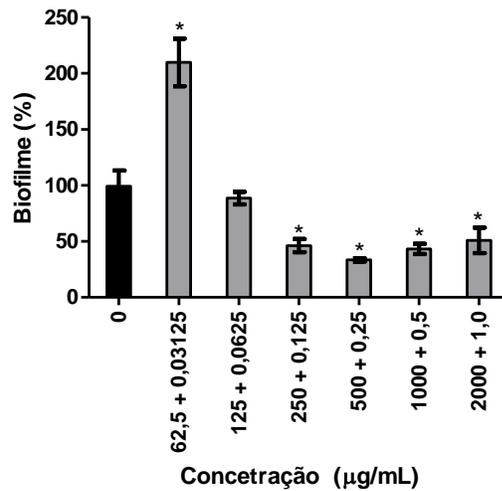
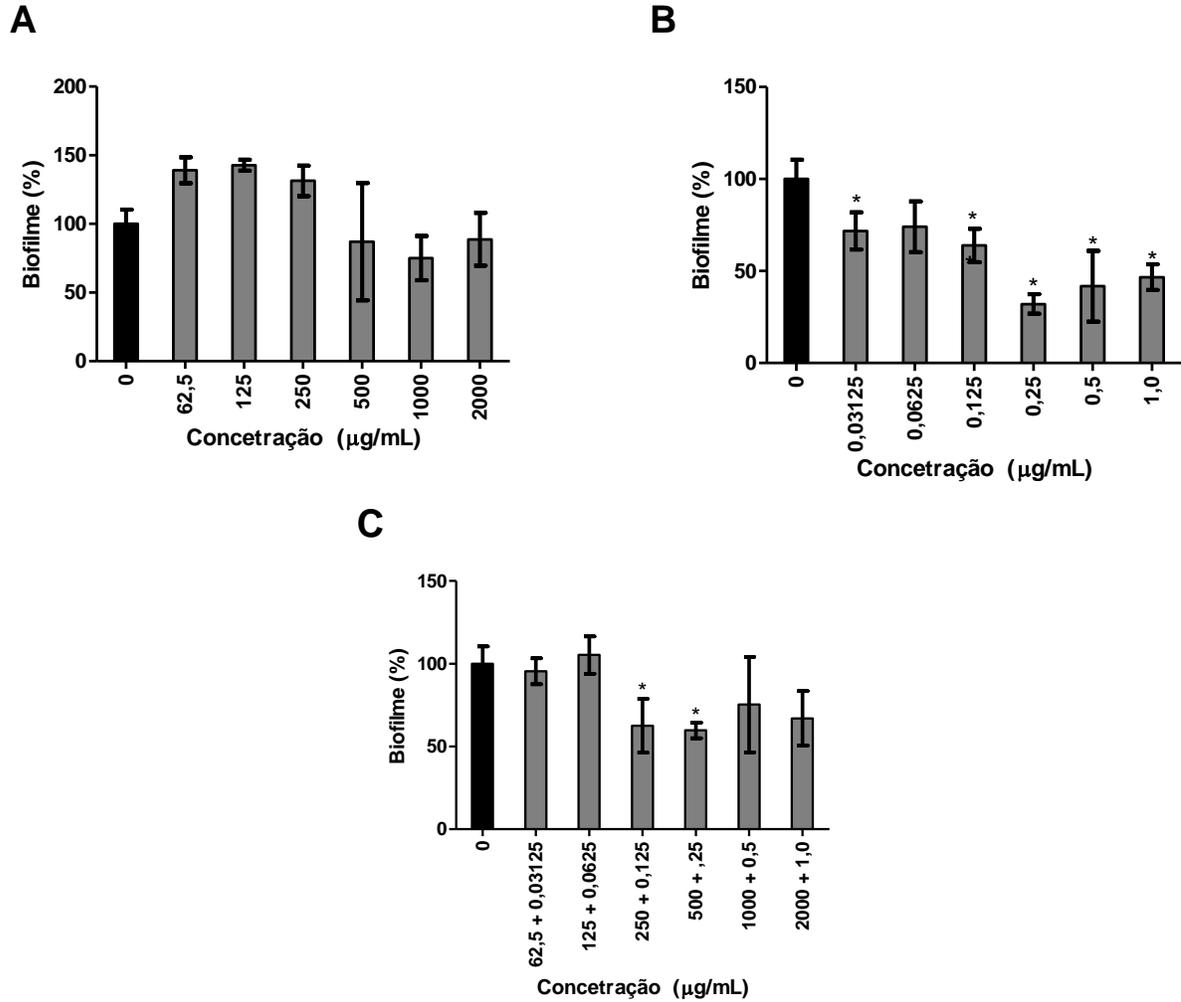


Figure 10 – Gráfico representativo de concentração de amostra em relação a quantidade de biofilme formado por *S. epidermidis*. A- Amostra de fração; B- Amostra de Antibiótico e C- Amostra de fração + antibiótico.



6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram um efeito sinérgico entre a mupirocina e a fração hidrometanólica de folhas de *P. spruceanum* para MRSA e *S. aureus*. O sinergismo observado ocorre devido ao aumento da permeabilidade de membrana induzido pela fração, que facilita a ação do antibiótico. Além disso, houve ação de inibição de formação de biofilme. Nossos resultados indicam que a associação entre o antibiótico e a fração pode ser uma opção para a redução de resistência bacteriana. Dessa forma, pode melhorar a efetividade na ação da mupirocina no tratamento de pacientes com infecções de pele.

Os resultados obtidos para o *S. epidermidis* apresentaram um aumento da permeabilidade de membrana, entretanto não houve ação sinérgica em relação a essa bactéria e não houve inibição da formação de biofilme. Por se tratar de uma espécie bacteriana sabidamente produtora de biofilme em prótese e cateter, mais estudos são necessários.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007–1021, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786554>. Acesso em: 14 abr. 2019.

AMPARO, T. R. **Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler**. 2016. 153 f. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, 2016. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/9906>. Acesso em: 18 set. 2018.

AMPARO, T. R.; et al. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. **Natural product research, formerly natural product letters**, v. 32, n. 16, p. 1951-1954, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28726498>. Acesso em: 20 out. 2018.

ANTONOV, N. K. High Prevalence of Mupirocin Resistance Staphylococcus aureus Isolates from a Pediatric Population. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3350-3356, 2015. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/59/6/3350>. Acesso em: 30 dez. 2018.

AYALA-NÚÑEZ, N. V.; LARA VILLEGAS, H. H.; TURRENT, L. C. I.; PADILLA, C. R. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Nanoscale Does Matter. **Nanobiotechnology**, v. 5, n. 1-4, p. 2-9, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12030-009-9029-1>. Acesso em: 15 mar. 2019.

BARROS, L. M.; et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**. v. 33, n. 3, p. 429-435, 2012. Disponível em: http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&n_extAction=lnk&exprSearch=658502&indexSearch=ID. Acesso em: 20 out. 2018.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista brasileira farmacognosia**. Curitiba, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000300010&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 26 nov. 2018.

CASEWELL, M. W.; HILL, R. L. R. In-vitro activity of mupirocin ('pseudomonic acid') against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Oxford, v. 15, n. 5, p. 523–531, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3924877>. Acesso em: 11 mar. 2019.

CHATURVEDI, P.; et al. Prevalence of Mupirocin Resistant Staphylococcus aureus Isolates Among Patients Admitted to a Tertiary Care Hospital. **North American Journal of Medical Sciences**. Ancaster, Canada, v. 6, n. 8, p. 403-407, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158649/>. Acesso em: 09 out. 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>. Acesso em: 25 out 2018.

CONLAN, S.; MIJARES, L. A.; COMPARATIVE, Nisc; et al. Staphylococcus epidermidis pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. **Genome Biology**. Bethesda, v. 13, n. 7, p. 1-13, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22830599>. Acesso em: 11 mar. 2019.

COOKSON, B. D. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 11-18, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/41/1/11/719049>. Acesso em: 30 dez. 2018.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: Common Cause of Persistent Infections. **Science**. Washington, DC. v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/284/5418/1318/tab-pdf>. Acesso em: 27 nov. 2018.

COSTERTON, W. et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 112, n. 10, p.1466-1477, 2003. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/20365>. Acesso em: 27 nov. 2018.

CUSHNIE, T P Tim; LAMB, Andrew J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v.26, n.5, p.343–56, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16323269>>. Acesso em: 07 jul. 2019.

EUMKEB, G. *et al.* Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant Escherichia coli. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, n.1, p.55–64, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111967>>. Acesso em: 07 jul. 2019.

FERNANDES, A. L. **Antibióticos do Século XX** - Ascensão e Declínio. 2017. 60 f. Faculdade do Algarve, Faro, 2017. Disponível em:

<https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/10467/1/Tese%20Andre%CC%81%20Lourenco%20-%20Final%202.pdf>. Acesso em: 09 out. 2018.

FEUILLIE, C.; et al. Molecular Interactions and Inhibition of the Staphylococcal BiofilmForming Protein SdrC. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, DC., v. 114, n. 14, p. 3738–3743, 2017. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/114/14/3738/tab-article-info>. Acesso em: 19 set. 2018.

FRATINI, F.; MANCINI, S.; TURCHI, B.; et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case Origanum vulgare L. and Leptospermum scoparium J. R. et G. Forst essential oils against Staphylococcus aureus strains. **Microbiological Research**, v. 195, p. 11–17, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28024521>. Acesso em: 20 mar. 2019

GELATTI, L. C.; et al. Sepsis por Staphylococcus aureus resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822009000400019&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 12 out. 2018.

GOTO, Y.; HIRAMATSU, K.; NASU, M. Improved efficacy with nonsimultaneous administration of netilmicin and minocycline against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in in vitro and in vivo models. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 39-46, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075276>. Acesso em: 25 out 2018.

HENDERSON, D. K. Managing methicillin-resistant staphylococci: a paradigm for preventing nosocomial transmission of resistant organisms. **American Journal of medicinal**. Amsterdã, v. 119, n. 6, p. 46–54, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735151>. Acesso em: 19 set. 2018.

HETEM, D. J.; BOTEN, M. J. M. Clinical relevance of mupirocin resistance in Staphylococcus aureus. **Journal of Hospital Infection**. Liverpool, v. 85, n. 4, p. 249-256, 2013. Disponível em: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(13\)00321-6/fulltext](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(13)00321-6/fulltext). Acesso em: 09 out. 2018.

JÄÄSKELÄINEN, I. H.; et al. Treatment of complicated skin and skin structure infections in areas with low incidence of antibiotic resistance- a retrospective population based study from Finland and Sweden. **Clinical Microbiology and Infection**. Philadelphia, v. 22, n. 4, p. 383-393, 2016. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X\(16\)00009-4/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X(16)00009-4/fulltext). Acesso em: 30 dez. 2018.

JOHNSON, D. W.; et al. A randomized controlled trial of topical exit site mupirocin application in patients with tunnelled, cuffed haemodialysis catheters. **Nephrology**

Dialysis Transplantation. Oxford, v. 17, n. 10, p. 1802-1807, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/ndt/article/17/10/1802/1824799>. Acesso em: 17 set. 2018.

KAMARUZZAMAN, N. F.; et al. Targeting the Bacterial Protective Armour; Challenges and Novel Strategies in the Treatment of Microbial Biofilm. **Materials.** Basel, Suíça, v. 11, n. 9, p. 1705-1731, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/11/9/1705>. Acesso em: 04 out. 2018.

KIFER, D.; MUZINIĆ, V.; KLARIĆ, M.Š. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. **The Journal Antibiotics.** Tokyo, Japão, v. 69, n. 9, p. 689–696, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26883392>. Acesso em: 19 set. 2018.

KODOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmácia.** Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-2-1.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2018.

LOWY, F. D.; HAMMER, S. M. *Staphylococcus epidermidis* Infections. **Annals of internal medicine.** Nova Iorque, v. 99, n. 6, p. 834–839. Disponível em: <https://annals.org/aim/article-abstract/697421/staphylococcus-epidermidis-infections>. Acesso em: 16 mar. 2019.

MALHEIRO, L. F.; et al. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva.** São Paulo, v. 29, n. 2, p. 195-205, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103507X2017000502101&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 24 set. 2018.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy.** Washington, v. 56, n. 12, p. 6366-6371, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070152>. Acesso em: 25 out 2018.

MILLER, M. A.; et al. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. **Infection Control & Hospital Epidemiology.** Cambridge, v. 17, n. 12, p. 811-813, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985769>. Acesso em: 22 set. 2018.

MOURA, J. P.; et al. Resistência à mupirocina entre isolados de *staphylococcus aureus* de profissionais de enfermagem. **Acta paulista Enfermagem.** São Paulo, v. 23, n. 3, p. 399-403, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01032100201000030014&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 set. 2018.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15178382200000000003&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 24 set. 2018.

NOGUEIRA, P. S. F. et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de enfermagem**. Rio de Janeiro, v. 17, p. 96-101, 2009. Disponível em: <http://www.facenf.uerj.br/v17n1/v17n1a18.pdf>. Acesso em: 19 set. 2018.

OLIVEIRA FILHO.; A. T.; RATTER, J. A. A study of the origin of central Brazilian forest by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 52, n. 2, p. 141-194, 1995. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/edinburghjournal-of-botany/article/study-of-the-origin-of-central-brazilian-forests-by-the-analysis-of-plant-species-distribution-patterns/A2AA22B2EF9E18957D407BE2E6C90947>. Acesso em: 15 set. 2018.

OLIVEIRA, A. C.; KOVNER, C. T.; SILVA, R. S. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. Ribeirão Preto, v. 18, n. 2, p. 233-239, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010411692010000200014&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 set. 2018.

OLIVEIRA, I. S.; et al. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 587-593, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2008000400016. Acesso em: 26 set. 2018.

OLIVEIRA, R. A. G., et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n1/a13v16n1>. Acesso em: 26 set. 2018.

OMS. **Organização mundial da saúde**. Disponível em: <http://www.who.int/infectionprevention/en/>. Acesso em: 19 set. 2018.

ONLEN, Yusuf; DURAN, Nizami; ATIK, Esin; et al. Antibacterial Activity of Propolis Against MRSA and Synergism with Topical Mupirocin. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.13, n.7, p.713–718, 2007. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/acm.2007.7021>>. Acesso em: 07 jul. 2019.

PATEL, J. B; GORWITZ, R. J.; JERNIGAN, J. A. Mupirocin resistance. **Clinical Infections Diseases**. Oxford, v. 49, n. 6, p. 935-941, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/49/6/935/334845>. Acesso em: 19 set. 2018.

PENG, D.; et al. Preliminary study on the effect of brazilin on biofilms of *Staphylococcus aureus*. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Atenas, v. 16, n. 3, p. 2108-2118, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30186447>. Acesso em: 17 set. 2018.

PERCIVAL, S. L.; MCCARTY, S. M.; LIPSKY, B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. **Advances in wound care**. New Rochelle, v. 4, n. 7, p. 373-381, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4486148/>. Acesso em: 14 out. 2018.

PIRES, C. A.; et al. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. Ananindeua, v. 6, n. 2, p. 45-50, 2015. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232015000200006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 26 set. 2018.

POOVELIKUNNEL, T.; GETHIN, G.; HUMPHREYS, H. Mupirocin resistance: Clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. Oxford, v. 70, n. 10, p. 2681-92, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/70/10/2681/829798>. Acesso em: 18 set. 2018.

RODRIGUES, I. V.; et al. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). **Pharmacognosy Journal. Bangalore**, v. 5, n. 1, p. 6-12, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0975357513000072>. Acesso em: 15 set. 2018.

ROTH, E.; et al. High-level mupirocin resistance within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic lineages. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Washington DC, v. 50, n. 9, p. 3207-3211, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1563509/>. Acesso em: 23 set. 2018.

SATO, M.; et al. Synergistic effects of mupirocin and an isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 24, n. 3, p. 241-246, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325427>. Acesso em: 24 mar. 2019.

SILVEIRA, G. P.; et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422006000400037&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 26 nov. 2018.

SOUZA, C. S. Infecções de tecidos moles - Erisipela. Celulite: Síndromes infecciosas mediadas por toxinas. **Medicina**. Ribeirão Preto, v. 36, n. 2, p. 351-356, 2003. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/733>. Acesso em: 26 set. 2018.

SRITHARADOL, R.; HAMADA, M; KIMURA, S.; et al. Mupirocin at Subinhibitory Concentrations Induces Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 9, p. 1249–1258, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29653478>. Acesso em: 19 abr. 2019.

STEVENS. D. L. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft-Tissue Infections. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford, v. 41, n. 10, p. 1407-1415, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/issue/41/10>. Acesso em: 24 set. 2018.

SUTHERLAND; R.; et al. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington DC, v. 27, n. 4, p. 495-498, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3923922>. Acesso em: 04 de out 2018.

UREN, B.; PSALTIS, A.; WORMALD, P. Nasal Lavage With Mupirocin for the Treatment of Surgically Recalcitrant Chronic Rhinosinusitis. **The Laryngoscope**. Nova York, v. 118, n. 9, p. 1677-1680, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545212>. Acesso em: 04 out. 2018.

WEIGELT, J.; et al. Linezolid versus Vancomycin in Treatment of Complicated Skin and Soft Tissue Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington DC, v. 39, n. 6, p. 2260-2266, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917519>. Acesso em: 05 out. 2018.

YOSHII, Y.; et al. Norgestimate inhibits staphylococcal biofilm formation and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactam antibiotics. **NPJ Biofilms Microbiomes**. Tokyo, v. 3, n. 18, p. 1-9, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522392/>. Acesso em: 19 set. 2018.

ZAVADINACK, N. M.; et al. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum health sciences**. Maringá, v. 23, n. 3, p. 709–712, 2001. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/2922>. Acesso em: 23 set. 2018.

ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial**. Warzburg, v. 28, s. 1, p. 14–20, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857906001774?via%3Dihub>. Acesso em: 16 mar. 2019.