



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

SARA SCANDORIEIRO

**EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO E ADITIVO DE
ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO COMBINADO A
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS**

SARA SCANDORIEIRO

**EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO E ADITIVO DE
ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO COMBINADO A
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Londrina
2016

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S283e Scandorieiro, Sara.

Efeito antibacteriano sinérgico e aditivo de óleo essencial de orégano combinado a nanopartículas de prata biológicas / Sara Scandorieiro. – Londrina, 2016.
104 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bactérias multirresistentes – Teses. 2. Agentes antibacterianos – Teses. 3. Óleo essencial de orégano – Teses. 4. Nanopartículas de prata – Teses. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.61

SARA SCANDORIEIRO

**EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO E ADITIVO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO COMBINADO A NANOPARTÍCULAS DE
PRATA BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Katsuko
Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Ana Angelita Sampaio Baptista
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a vocês que sempre me apoiaram. A meus queridos pais, Moacir Scandorieiro e Hermínia Scandorieiro, por todo exemplo de amor, carinho, perseverança e principalmente dignidade. E a meu esposo, Diego Cabreira, companheiro de todas as horas, pela compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Moacir e Hermínia, expresso o meu infinito agradecimento. Pessoas de fé, lutadoras e amigas, que merecem toda minha gratidão e admiração. Agradeço pelo incentivo à educação e por me ensinar a lutar pelos meus objetivos com respeito, dignidade e dedicação.

Ao Gaúcho, meu esposo, por sempre acreditar em mim e me incentivar a vencer qualquer limitação e dificuldade. Obrigada por todo carinho, amor, amizade e companheirismo; especialmente pelos finais de semana e feriados que estive comigo no laboratório para realização não só do mestrado, mas também da graduação em Biologia. Sou grata pela compreensão e pelo apoio. Agradeço pelo seu bom humor e otimismo que fazem toda diferença na minha vida. São quase dez anos ao seu lado que trouxeram muitas alegrias, não só a mim, mas para toda minha família.

Aos meus irmãos, Tânia Scandorieiro e Morvan Scandorieiro, que sempre cuidaram de mim, me considerando filha. Obrigada pelo carinho e amor incondicional!

Aos meus sobrinhos, Bruna Scandorieiro e Bruno Scandorieiro, que considero como irmãos.

Aos meus sogros, Jucélia Cabreira e Rogério Cabreira, pela confiança em mim depositada e por serem pessoas tão maravilhosas.

À professora Renata Kobayashi, minha orientadora, por todo apoio, ensinamentos e paciência diante das minhas dificuldades. Por ter aberto as portas de seu laboratório e me acolhido em seu grupo de pesquisa desde a minha graduação. Agradeço pela confiança e pelas diversas oportunidades que me foram dadas para cada vez mais melhorar minha formação. Obrigada pelas conversas, pela amizade e por ser um exemplo de profissional e ser humano. Renata, trabalhar com você é um prazer!

Ao professor Gerson Nakazato pelas excelentes explicações, pelo profissionalismo e por sempre nos ajudar com o desenvolvimento desta presente dissertação. Obrigada por ser essa pessoa ativa, disposta e com pensamento à frente. Também agradeço pelo seu bom humor que deixa nosso ambiente de trabalho tão divertido e “leve”; pois eu sou adepta do lema: “Quem ri junto, trabalha melhor”.

À Larissa Ciappina por todo auxílio e dedicação no desenvolvimento desta dissertação de mestrado. Obrigada pelas horas que passamos juntas realizando experimentos, tirando dúvidas, estudando, conversando sobre a vida. Agradeço por sua alegria, brincadeiras e bom humor que deixam as dificuldades insignificantes. Lari, é um prazer ter você como parceira de trabalho, e além de tudo como amiga.

À Angela Kimura e à Mariane Beatrice Fortin não apenas pela parceria em vários experimentos durante este mestrado, mas também por ótimas conversas e momentos de descontração.

Aos professores com quem fizemos parcerias em estudos paralelos a este aqui apresentado, professoras Ana Angelita Sampaio Baptista, Audrey Lonni e Amedea Seabra.

A todos amigos e companheiros do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da UEL (NIP3), pelos ótimos momentos que passamos juntos desde a Graduação. Obrigada pela animação, união e auxílio nos momentos de dificuldade. Em especial, agradeço à querida amiga Vanessa Koga, pela amizade, pelo carinho e apoio sempre que precisei! E ao meu amigo, desde o primeiro dia de faculdade, Erick Nishio, pela parceria em inúmeros momentos.

Aos alunos e professores do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP 5), principalmente ao César Contreras, à Danielle Kian e à Ana Elisa Belotto pelo auxílio com alguns ensaios apresentados nesta dissertação.

Aos alunos e professores do Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal (NIP 9) pela convivência e parceria em diversos projetos.

Aos colegas da turma de Mestrado em Microbiologia pelo convívio, parceria e aprendizado. Especialmente à Érica Pelegrin e ao Leonardo Medeiros, que também são meus parceiros de laboratório, com quem passei ótimos momentos nesses dois anos de pós-graduação.

Às minhas queridas amigas Mayara Ogaki e Paloma Shimizu pelo companheirismo desde a época de graduação. Obrigada pelas risadas, conversas e principalmente pela compreensão nos momentos que estive ausente.

Aos professores que participaram das bancas durante o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado. Professor Gerson Nakazato (mencionado anteriormente) pela participação nas bancas de defesa do plano e defesa final do mestrado. Professor Luciano Panagio pela participação na banca de

defesa do plano com ótimas sugestões e observações. Professora Sueli Fumie Yamada Ogatta pela participação na banca de qualificação, com sugestões e ensinamentos que enriqueceram este trabalho, e pelo auxílio em etapas experimentais importantes deste estudo. Professor Admilton Gonçalves de Oliveira Junior por ter participado da banca de qualificação, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho, e também pelo grande auxílio com planejamento e execução da técnica de microscopia eletrônica. Professora Ana Angelita Sampaio Baptista (mencionada anteriormente) pela participação na banca de defesa final do mestrado com sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos professores que me deram aula no mestrado e contribuíram muito para meu aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de trabalhar com excelentes profissionais, que sem dúvida alguma fazem efetivamente parte da minha formação.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e suporte financeiro para realização deste estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho: Muito obrigada!

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

(Abraham Lincoln)

SCANDORIEIRO, Sara. **Efeito antibacteriano sinérgico e aditivo de óleo essencial de orégano combinado a nanopartículas de prata biológicas.** 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais é um sério problema clínico e de saúde pública, que desafia as decisões terapêuticas. Portanto, são extremamente necessários a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos com potencial para combater bactérias multirresistentes. Compostos derivados de plantas, animais ou microrganismos, substâncias em nanoescala e combinação de antimicrobianos têm sido propostos como alternativas antimicrobianas. Estudos têm mostrado que o óleo essencial de orégano (OEO) e nanopartículas (NPs) de prata apresentam potente ação antimicrobiana; no entanto, as características organolépticas marcantes deste óleo e a evolução de resistência a NPs de prata limitam suas aplicações. Com o objetivo de minimizar os fatores de limitação já descritos, esta pesquisa avaliou o efeito antibacteriano do OEO combinado a NPs de prata produzidas por *Fusarium oxysporum* (bio-AgNP) contra bactérias Gram positivas e negativas, incluindo cepas multirresistentes. OEO e bio-AgNP foram bactericidas para todas as cepas testadas, e as faixas de concentração inibitória mínima (CIM) foram de 0,298 – 1,193 mg/mL (0,03 – 0,12%, v/v) (OEO) e 62,5 – 250 µM (bio-AgNP). As curvas de crescimento e morte bacterianas mostraram que o OEO elimina a população em 0,17 h (10 min) e bio-AgNP em 4 h para Gram negativa e 24 h para Gram positiva. A combinação dos dois compostos resultou em efeito antibacteriano sinérgico e aditivo, reduzindo significativamente os valores de CIM de ambos compostos em comparação aos tratamentos com os antimicrobianos sozinhos. A interação entre OEO e bio-AgNP também apresentou tempo de ação reduzido quando comparado ao uso de bio-AgNP individualmente; sendo pelo menos 0,33 h (20 min) ou 7 h, para Gram negativa e positiva respectivamente. A análise da morfologia por microscopia eletrônica de varredura revelou que as células de *Staphylococcus aureus* que receberam os três tratamentos (OEO, bio-AgNP e combinação de ambos) apresentaram alterações morfológicas similares caracterizadas como protusões na superfície celular, e que não estavam presentes no controle bacteriano não tratado. Os tratamentos levaram à redução da densidade celular bacteriana e reduziram a quantidade de matriz exopolissacarídica comparada ao controle. Tanto o OEO como bio-AgNP apresentaram baixa atividade hemolítica, especialmente nas CIMs. O ensaio de MTT indicou que os dois agentes antimicrobianos afetaram células HEp-2. Este estudo descreve, pela primeira vez, interação sinérgica e aditiva entre OEO e bio-AgNP contra bactérias multirresistentes, como *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) e cepas produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) e carbapenemase como *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, respectivamente. Esses resultados indicam que esta combinação pode ser uma estratégia alternativa para o controle de infecções com pouca ou nenhuma opção de tratamento, além de minimizar a seleção de cepas resistentes e ter potencial para ser aplicado em indústrias e ambientes clínicos e/ou hospitalares.

Palavras-chave: Óleo essencial de orégano. Nanopartículas de prata. Antibacterianos. Sinergismo. Bactérias multirresistentes.

SCANDORIEIRO, Sara. **Antibacterial synergistic and additive effect of oregano essential oil combined with biologically produced silver nanoparticles.** 2016. 104 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Bacterial resistance to conventional antibiotics is a clinical and public health problem and have defied therapeutic decisions. Therefore, it is crucial the research and development of new drugs for controlling emergence of antibiotic-resistant strains and for killing such microorganisms. Compounds derived from plants, animals or microorganisms, nanodrugs and antimicrobial combination have been proposed as alternative antimicrobials. Studies have shown that oregano essential oil and silver nanoparticles have potent antimicrobial action; however, the stronger organoleptic characteristics of the oil and the development of resistance to these metal nanoparticles limit their applications. This research evaluated the antibacterial effect of oregano essential oil (OEO) combined with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* (bio-AgNP), against Gram positive and negative bacteria, including multidrug-resistant strains. OEO and bio-AgNP showed bactericidal effect against all tested strain, with minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 0.298 to 1.193 mg/mL (0.03 – 0.12%, v/v) (OEO) and from 62.5 to 250 µM (bio-AgNP). Time-kill curves showed that oregano oil eliminated bacterial population at 0.17 h (10 min) of treatment and bio-AgNP at 4 h and 24 h for Gram negative and Gram positive respectively. The combination of both compounds resulted in synergistic or additive, significantly reducing the MIC values of them when compared to antimicrobials used alone; besides reduced time of action compared to bio-AgNP individually, 7 h for Gram positive and 0.33 h (20 min) for Gram negative. Analysis by scanning electron microscopy revealed that *Staphylococcus aureus* cells exposed to three different treatments (OEO, bio-AgNP and combination of both) had similar morphological changes which appear as protrusions on the cell surfaces and were not present on untreated bacterial control. Individual and combination treatments led to reduction of bacterial cell density and decreased exopolysaccharides matrix compared to the control. OEO and bio-AgNP showed low hemolytic activity, especially at MIC values. MTT assay indicated that the two antimicrobial agents affect HEp-2 cells. This study describes for the first time the synergistic and additive interactions between OEO and bio-AgNP against multidrug-resistant bacteria, as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains and extended spectrum betalactamases (ESBL) and carbapenemases-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*, respectively. These results indicate that this combination can be an alternative strategy in infection control with few or no treatment option, minimizing selection of resistant strains, and has potential for application in industrial and clinical or hospital environments.

Key words: Oregano essential oil. Silver nanoparticles. Antibacterial. Synergism. Multidrug-resistant bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	– Alvos e mecanismo de ação de óleos essenciais	34
Figura 02	– Técnica para extração de óleo essencial de orégano	35
Figura 03	– Estruturas químicas dos terpenoides carvacrol (A) e timol (B)	37
Figura 04	– Mecanismos de ação de nanopartículas de prata contra células microbianas	48
Figura 05	– Produção de nanopartículas de prata utilizando o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> como agente redutor dos íons metálicos	49
Figura 06	– Mecanismo hipotético de biossíntese de nanopartículas de prata	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	– Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana	27
Tabela 02	– Concentração inibitória mínima (CIM) de vários óleos essenciais.....	36
Tabela 03	– Estudos que abordam atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano, indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas	39
Tabela 04	– Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando informações adicionais sobre as nanopartículas (síntese e tamanho), a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas	44
Tabela 05	– Transformação da unidade de concentração mg/mL para % (v/v) do óleo essencial de orégano utilizado neste estudo.	104
Tabela 06	– Transformação da unidade de concentração μM para $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de prata sintetizadas através de redução de íons de prata pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos para indicar desvio padrão
β	Beta
α	Alfa
°C	Graus Celsius
°GL	Grau Gay Lussac
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Ag ⁺	Íon prata
Ag ⁰	Prata metálica
AMI	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AZT	Aztreonam
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
bio-AgNP	Nanopartículas de prata biológicas
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAZ	Ceftazidima
CBM	Concentração bactericida mínima
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Cefalotina
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLI	Clindamicina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
CPM	Cefepima
CR	Resistente a carbapenêmicos

CTX	Cefotaxima
Cu	Cobre
D-Ala	Alanina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERT	Ertapenem
ERY	Eritromicina
ESBL	Betalactamase de espectro estendido
ESP	Substância polimérica extracelular (exopolissacarídeo)
Fe	Ferro
FIC	Concentração inibitória fracionada
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada
g	Grama
GEN	Gentamicina
h	Hora
H ⁺	Íon hidrogênio (próton)
H ₂ O	Água
HEp-2	<i>Human laryngeal epithelial carcinoma</i> (linhagem celular tumoral)
HU	Hospital Universitário
I	Intermediário
IMP	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KPMG	<i>Klynveld-Peat-Marwick-Goerdeler</i>
LNZ	Linezolida
log	Logaritmo
LVX	Levofloxacino
M	Molar
MDR	Multidrug resistance
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
MH	Müller Hinton
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MRP	Meropenem
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente à meticilina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
m/v	Porcentagem em massa (massa/volume)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
nm	Nanômetro
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
NOR	Norfloxacino
NP	Nanopartícula
OEO	Óleo essencial de orégano
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
p < 0,05	Probabilidade menor que 5%
p > 0,05	Probabilidade maior que 5%
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PBS	Tampão fosfato-salino
PDR	Pan-droga resistentes
PEG	Poli(et)ilenoglicol
PEN	Penicilina
pH	Potencial de hidrogênio
PIB	Produto interno bruto
PR	Paraná
PTZ	Piperacilina + tazobactam
PVA	Poliacetato de vinila
PVP	Polivinilpirrolidona
R	Resistente
RAND	<i>Research ANd Development</i>
RIF	Rifampicina
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo

S	Sensível
UK	<i>Universal killer</i>
SP	São Paulo
STR	Streptomicina
SXT	Sulfametoxazol + trimetoprima
TET	Tetraciclina
TiO ₂	Dióxido de titânio
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UVA	Radiação ultravioleta do tipo A
UVB	Radiação ultravioleta do tipo B
V	Volts
VRE	Enterococo resistente à vancomicina
v/v	Porcentagem em volume (volume/volume)
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	Extensivamente resistente a drogas
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	RESISTÊNCIA A ANTIBACTERIANOS	20
3.2	ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	25
3.2.1	Antimicrobianos Derivados de Plantas	26
3.2.2	Óleos Essenciais de Plantas	26
3.2.2.1	Óleo essencial de orégano.....	34
3.3	NANOTECNOLOGIA	38
3.3.1	Nanopartículas Metálicas	42
3.3.1.1	Nanopartículas de prata	43
3.4	COMBINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS.....	49
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	ARTIGO: EFEITO SINÉRGICO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS CONTRA CEPAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES	66
6	CONCLUSÃO	102
	ANEXOS	103
	ANEXO A - Transformação da unidade de concentração	104
	ANEXO B - Transformação da unidade de concentração	105

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos convencionais é um problema hospitalar, comunitário e ambiental. Infecções causadas por bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, ou ainda por *Staphylococcus aureus* resistente à metilcolina (MRSA) têm sido motivo de preocupação.

O uso inadequado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária (especialmente na produção animal), e a despreocupação com descarte de efluentes (inclusive de hospitais) têm contribuído expressivamente para a seleção de cepas bacterianas multirresistentes. Dificuldade no controle de infecções bacterianas repercutem em altos custos com tratamento, falhas terapêuticas e óbitos; diante disso são cruciais a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos com potencial para combater infecções causadas por cepas resistentes. As alternativas terapêuticas incluem antimicrobianos de origem natural, como mel, própolis e especiarias; ainda substâncias metálicas como compostos à base de prata e combinações de antimicrobianos.

Um dos focos de pesquisa são as plantas medicinais, pois essas possuem uma série de compostos que podem ser aproveitados pela indústria farmacêutica. Estudos sobre o potencial antimicrobiano de especiarias mostram que o óleo essencial de orégano (OEO) apresenta resultados relevantes na inibição de bactérias responsáveis pela contaminação de alimentos e infecções hospitalares, como *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Escherichia coli* e outras. Nanopartículas (NPs) também são opções atrativas como antimicrobiano, já que possuem atividade bactericida contra bactérias Gram negativas e Gram positivas, incluindo cepas multirresistentes.

Apesar do potencial antibacteriano do OEO e de NPs de prata, os dois compostos possuem características que limitam sua aplicação; todavia a combinação de ambos é uma estratégia para lidar com esses inconvenientes. O OEO possui aroma e sabor marcantes; por outro lado, seu uso combinado a outro antimicrobiano minimiza as características organolépticas indesejáveis, pois na associação é possível diminuir a concentração de cada composto. Tem sido relatada a emergência de cepas bacterianas resistentes a NPs de prata; no entanto, quando esse nanometal é combinado a outro composto antimicrobiano, a chance de seleção

dessas cepas resistentes à prata é reduzida.

Muitos estudos relatam sinergismo entre NPs de prata e outros antibióticos, e entre OEO combinado a diferentes compostos. Não há dados na literatura sobre a interação de óleo de orégano e NPs de prata. Portanto, neste estudo foi testado o efeito antimicrobiano dessa combinação, utilizando bactérias de interesse clínico como MRSA, *E. coli* produtora de ESBL, *E. coli* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, entre outras. A combinação pode ser útil na indústria alimentícia (para conservar alimentos), no desenvolvimento de produtos odontológicos (como cimento dentário) e farmacêuticos (como curativos e pomadas), e demais setores que necessitem de controle de crescimento microbiano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana da combinação composta por óleo essencial de orégano (OEO) e nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP) frente a cepas Gram positivas e Gram negativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana dos compostos isolados e combinados frente a cepas bacterianas de referência e isolados bacterianos clínicos multirresistentes.
- Determinar a concentração inibitória mínima de OEO e bio-AgNP separadamente.
- Determinar a concentração bactericida mínima de OEO e bio-AgNP separadamente.
- Verificar a interação da atividade antibacteriana entre os dois compostos.
- Avaliar a dinâmica de populações bacterianas em exposição aos compostos separados e combinados.
- Verificar as alterações morfológicas bacterianas provocadas pelos compostos separados e combinados.
- Avaliar a toxicidade de OEO e bio-AgNP para eritrócitos humanos e células HEp-2.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESISTÊNCIA A ANTIBACTERIANOS

O período de 1945 a 1955 foi importante para a medicina moderna, pois antimicrobianos produzidos por fungos e bactérias, como penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina, marcaram a era antibiótica (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009). A era dos antibióticos é responsável pelo aumento na expectativa e qualidade de vida da população, pois medicamentos efetivos no controle microbiano passaram a ser desenvolvidos em escala industrial e com as modificações necessárias para combater os mais variados microrganismos. Apesar do amplo desenvolvimento de agentes antibacterianos, a emergência de bactérias patogênicas multirresistentes está diminuindo a vida útil desses medicamentos, ameaçando a volta da humanidade à era pré-antibiótica.

Atualmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais é um problema clínico e de saúde pública, pois atinge desde ambientes hospitalares até a comunidade e o meio ambiente. Os antimicrobianos são importantes por controlar infecções e conseqüentemente promover aumento na expectativa e qualidade de vida, porém o risco da resistência microbiana é relevante já que esses medicamentos causam uma pressão seletiva sobre os microrganismos. A etiologia da resistência bacteriana é multifatorial, envolvendo fatores como a seleção natural de bactérias resistentes, a fácil disseminação dessa resistência entre os seres procaríotos, más condições de higiene (pacientes, população e profissionais de saúde), fluxo contínuo de viajantes, demora no diagnóstico de infecções, prescrição exagerada para profilaxia, uso de antimicrobianos na produção animal (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

Estima-se que nos Estados Unidos, a cada ano, pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes a antibióticos, e pelo menos 23 mil pessoas chegam a óbito devido a conseqüências diretas dessas infecções (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2014 um relatório concluindo que a resistência bacteriana é uma ameaça global à saúde pública, uma análise de 114 países sinalizou essa situação alarmante. A OMS enfatizou a emergência de

Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos e MRSA no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Estudos realizados pelas corporações RAND Europe e KPMG estimaram os custos econômicos globais e os índices de mortalidade até 2050 se medidas não forem tomadas com relação à resistência bacteriana; os dados mostram que nos próximos 35 anos, 300 milhões de pessoas vão morrer devido a infecções por cepas multirresistentes e o PIB mundial será de 2 a 2,5% inferior ao que seria de outra maneira (O'NEILL, 2014).

Existem infecções com pouca ou nenhuma opção de tratamento. De acordo com Magiorakos et al. (2011), os microrganismos são classificados em três categorias baseadas na resistência aos antimicrobianos: (1) microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR, *multidrug-resistant*) apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano de, no mínimo, três diferentes classes; (2) microrganismos extensamente resistentes (XDR, *extensively drug resistant*) apresentam resistência a todos antimicrobianos de todas classes, exceto duas classes quaisquer; (3) microrganismos pan-resistentes (PDR, *pandrug resistant*) possuem resistência a todos antimicrobianos de todas as classes disponíveis.

A dificuldade em controlar infecções bacterianas resulta em altos custos com tratamento, falhas terapêuticas e morte (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural é aquela intrínseca da espécie, relacionada ao cromossomo. Ter conhecimento sobre a resistência natural do microrganismo pode auxiliar na escolha dos antimicrobianos para o tratamento empírico; *Mycoplasma* spp. por exemplo, possuem resistência aos betalactâmicos devido à ausência de parede celular (BEBEAR; PEREYRE, 2005). A resistência adquirida não é característica da espécie, ela é preocupante porque pode se disseminar amplamente pela transferência de elementos genéticos móveis entre os microrganismos através de conjugação, transformação e transdução (DEL FIO; FILHO; GROppo, 2000).

A resistência adquirida aos betalactâmicos ocorre com bastante frequência, pois esses antibacterianos têm sido muito usados. Existem quatro grupos de betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) que são resultado dos esforços de pesquisas farmacêuticas para aumentar o espectro de ação de agentes antimicrobianos e combater a disseminação de resistência. Os betalactâmicos compartilham o mesmo mecanismo

antibacteriano já que possuem em comum o anel betalactâmico, portanto, atuam seletivamente na inibição da síntese de parede celular bacteriana (KASMAR; HOOPER, 2009).

A transpeptidação é uma etapa da síntese da parede celular que consiste na ligação cruzada de duas cadeias peptídicas unidas à porção glicana. Em condições normais, as ligações cruzadas da parede são catalizadas pelas transpeptidases bacterianas; essas enzimas atacam o substrato D-Ala-D-Ala na extremidade terminal de um pentapeptídeo associado a uma cadeia de peptideoglicano, um resíduo D-alanina é deslocado e forma-se um intermediário composto por transpeptidase-D-alanina-peptideoglicano que é então atacado pela extremidade amino de um peptídeo associado à uma cadeia adjacente de peptideoglicano, finalmente a enzima transpeptidase é liberada e forma-se uma ligação cruzada (KASMAR; HOOPER, 2009).

O anel betalactâmico é um análogo estrutural do dipeptídeo D-Ala-D-Ala (substrato das transpeptidases bacterianas); portanto esses antimicrobianos acabam interferindo no processo de transpeptidação. Assim, as transpeptidases acabam se ligando aos betalactâmicos ao invés de se associarem ao substrato natural (D-Ala-D-Ala), mas o antimicrobiano fica incapaz de ser clivado do restante da molécula e conseqüentemente a extremidade amino do peptídeo adjacente não consegue fazer o necessário ataque para realizar ligação cruzada (KASMAR; HOOPER, 2009).

No entanto, a bactéria usa-se de estratégias para resistir à ação de antibacterianos. Em Gram negativas é comum a presença de enzimas que inativam os betalactâmicos, são as conhecidas betalactamases, que por sua vez possuem sítio ativo que ataca o anel betalactâmico na mesma região em que este é alvo das transpeptidases; devido a essa semelhança catalítica acredita-se que betalactamases e transpeptidases divergiram de um ancestral comum (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010). Uma hidroxila livre presente na enzima betalactamase ataca o anel betalactâmico, e como resultado de uma reação de hidrólise, ocorre formação de ácido peniciloico que é desprovido de atividade antibacteriana (SILVA; LINCOPAN, 2012). Em Gram negativas esse mecanismo de resistência é mais eficiente porque as enzimas ficam no espaço periplasmático, enquanto em Gram positivas as betalactamases são secretadas, portanto não ficam concentradas (KASMAR; HOOPER, 2009).

Entre os patógenos Gram negativos multirresistentes, merecem destaque as bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, sendo que a enzima *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) tem causado grandes preocupações (CANTAS et al., 2013).

ESBL e KPC hidrolizam o anel betalactâmico, inativando o antimicrobiano (DRAWZ; BONOMO, 2010; QUEENAN; BUSH, 2007). A maioria da resistência aos betalactâmicos detectada em Gram negativas é devido à ação de ESBLs. Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) são antibacterianos de escolha para o controle de infecções causadas por bactérias produtoras de betalactamases de amplo espectro (DHILLON; CLARK, 2012; SILVA; LINCOPAN, 2012). No entanto, carbapenemases reduzem as opções de tratamento porque são capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e inclusive carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007).

Normalmente as enzimas ESBL e KPC são codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, que por sua vez também carregam genes de resistência a outros antimicrobianos não betalactâmicos (quinolonas, tetraciclina, cotrimoxazol, trimetoprima e aminoglicosídeos), contribuindo para a emergência de bactérias com resistência a múltiplos antimicrobianos e para a disseminação desse perfil de multirresistência entre diferentes cepas e gêneros (DHILLON; CLARK, 2012; PATEL; BONOMO, 2013; PITOUT, 2012; SHAIKH et al., 2015; SILVA; LINCOPAN, 2012)

Em Gram positivas, o mecanismo de resistência mais comum aos betalactâmicos ocorre por mutação no gene da transpeptidase, ou seja, ocorre alteração no sítio de ação do antibacteriano (KASMAR; HOOPER, 2009). MRSA possuem o gene *mecA* que codifica transpeptidases que apresentam baixa afinidade pelos betalactâmicos (RICE, 2012). O microrganismo expressa proteína de ligação à penicilina (PBP) adicional e modificada; assim o antimicrobiano continua inibindo ação da PBP normal, no entanto a PBP2' (com reduzida afinidade pelo betalactâmico) permite a síntese de parede e a sobrevivência da bactéria (MENDES, 2010; MENEGOTTO; PICOLLI, 2007). Além disso, algumas cepas de MRSA podem carregar genes de resistência para outros antimicrobianos, reduzindo as opções de tratamento (TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011).

Bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos desafiam as equipes de controle de infecção hospitalar, muitas vezes resultando em falhas

terapêuticas e surtos hospitalares. Infecções urinárias, pneumonias, sepse, bacteremias, meningites e outros processos infecciosos têm sido frequentemente associados a cepas produtoras de ESBL, como por exemplo *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp. e outras (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010; PITOUT, 2012; SHAIKH et al., 2015; SILVA; LINCOPAN, 2012). Ainda mais desafiadoras estão as bactérias resistentes a carbapenêmicos como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Acinetobacter baumannii* (DESHPANDE et al., 2006; JÁCOME et al., 2012; MIRIAGOU et al., 2003; NAVON-VENEZIA et al., 2006; PATEL; BONOMO, 2013). Bactérias resistentes a antimicrobianos têm sido encontradas em alimentos para consumo humano, efluentes hospitalares tratados e rios urbanos, caracterizando um problema de saúde pública.

Cepas de *Salmonella* spp. produtoras de ESBL têm sido reportadas em produtos avícolas, como frangos e ovos, no Paraná e Santa Catarina (SILVA; LINCOPAN, 2012). Koga et al. (2015), analisando carcaças de frango para consumo humano, reportaram que 65% portavam *E. coli* produtora de ESBL. Cepas de *Pseudomonas fluorescens* produtoras de carbapenemases já foram encontradas em lulas comercializadas como alimento para humanos (RUBIN; EKANAYAKE; CHAMPIKA, 2014). Além disso, cepas multirresistentes têm sido encontradas em rios e efluentes. No estado do Rio de Janeiro, cepa de *Klebsiella* spp. produtora de ESBL foi encontrada em efluentes de hospitais já tratados (PRADO et al., 2008). *P. aeruginosa* multirresistente foi isolada de amostras de água do Rio Tietê (FONTES et al., 2011). *E. coli* produtora de ESBL foi isolada de águas do rio Thames em Londres (DHANJI et al., 2011).

Como visto, bactérias multirresistentes já foram isoladas de diferentes locais, diante disso é extremamente necessário pesquisar e desenvolver novas estratégias antimicrobianas que visem (1) combater infecções que possuem pouca ou nenhuma opção de tratamento, (2) minimizar a seleção de resistência e (3) diminuir o uso de antimicrobianos convencionais na clínica veterinária e na produção animal, especialmente para preservar opções terapêuticas aos seres humanos. Para combater a resistência bacteriana, as pesquisas estão voltadas para compostos de origem natural, nanotecnologia ou até combinações de antimicrobianos.

3.2 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

O uso de produtos naturais para aliviar doenças, especialmente doenças infecciosas, acontece desde as civilizações antigas, tais como egípcios, chineses, gregos e romanos que empregavam mel no tratamento de feridas (ZUMLA; LULAT, 1989). Os egípcios e outros povos de civilizações antigas pressionavam pão bolorento contra feridas para tratar e prevenir infecções (SIPOS et al., 2004). Apesar do uso de remédios encontrados na natureza, ao longo da história a humanidade foi vítima de muitas doenças infecciosas que frequentemente causavam sequelas e mortes.

Atualmente as pesquisas, que lidam com o problema da resistência bacteriana, estão voltadas para compostos originários de fontes naturais como animais, microrganismos e plantas. Entre janeiro de 1981 e dezembro de 2010, aproximadamente 35% dos antimicrobianos aprovados foram naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Entre os compostos produzidos por animais, o mel se destaca, possuindo atividade antimicrobiana bem documentada nas literaturas médicas mais antigas do mundo, e atualmente tem sido reavaliado como alternativa para combater patógenos multirresistentes (MANDAL; MANDAL, 2011; NISHIO et al., 2014); além do mel, a própolis também tem efeito contra agentes infecciosos (KUJUMGIEV et al., 1999; STEPANOVIĆ et al., 2003). Além das abelhas, invertebrados marinhos como tunicados, quelicerados, crustáceos e moluscos produzem peptídeos antimicrobianos que são explorados na pesquisa de novos antibióticos (OTERO-GONZALEZ et al., 2010; TINCU; TAYLOR, 2004). A secreção presente na pele de anfíbios possui substâncias que apresentam atividade antimicrobiana comprovada e também são estudadas para fim de desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos (GOVENDER et al., 2012).

Outros grupos de pesquisadores se atentam para os antibióticos produzidos por bactérias e fungos (ABBAS; SENTHILKUMAR; ARJUNAN, 2014; CARDOZO et al., 2013; DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Apesar da imensa diversidade de produtos naturais com atividade contra microrganismos patogênicos, o estudo de compostos derivados de plantas tem ganhado destaque na pesquisa de novos agentes antimicrobianos (COWAN, 1999).

3.2.1 Antimicrobianos Derivados de Plantas

Desde os tempos antigos, produtos vegetais são utilizados como conservantes alimentares, intensificadores de sabor e principalmente na medicina popular, sendo que até hoje os extratos de plantas são usados para fins profiláticos e terapêuticos no controle de doenças (UPADHYAY et al., 2014).

A atividade antibacteriana de plantas é bastante relatada (Tabela 01) e diferentes componentes bioativos estão sendo identificados, como é o caso do eugenol encontrado no cravo-da-índia, cinamaldeído abundante na canela, além de carvacrol e timol presentes no orégano e tomilho (AYALA-NÚÑEZ et al., 2009; BURT, 2004; CLEFF et al., 2008; NUÑEZ; D'AQUINO, 2012; PRABUSEENVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; SANKAR et al., 2013; STOJKOVIĆ et al., 2013). Muitos desses compostos são metabólitos secundários produzidos como resultado das interações entre plantas, microrganismos e animais (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Compostos derivados de plantas dificultam a seleção de bactérias resistentes, provavelmente devido à presença de múltiplos componentes com ação antibacteriana. Dentre estes estão fenóis e polifenóis (flavonoides, quinonas, taninos, coumarinas), alcaloides, terpenoides, lectinas e polipeptídeos (UPADHYAY et al., 2014).

Embora os mecanismos antibacterianos de produtos derivados de plantas não sejam totalmente esclarecidos, vários mecanismos potenciais têm sido relatados; como rompimento da membrana celular bacteriana, aumento da suscetibilidade a antibióticos convencionais em bactérias resistentes aos mesmos, atenuação da virulência bacteriana, como ação antibiofilme, inibição na produção de cápsula bacteriana ou redução na síntese de toxinas (UPADHYAY et al., 2014).

3.2.2 Óleos Essenciais de Plantas

Dentre os produtos derivados de plantas com atividade antimicrobiana estão os óleos essenciais de especiarias como orégano, cravo, canela, hortelã, manjeriço, alecrim, gengibre, tomilho e outros (NAZZARO et al., 2013; TRAJANO et al., 2009). Além das especiarias, há outras plantas que possuem óleos com ação antibiótica, como lavanda, rosas, gerânios e laranja (NAZZARO et al., 2013).

Tabela 01 – Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana

(continua)

Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismos^{a, b}	Referências
Açafrão-da-terra	<i>Curcuma domestica</i>	Bacteria	Pandey et al. (2014)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Geral	Cowan (1999)
Alfafa	<i>Medicago sativa</i>	Gram-positiva	Cowan (1999)
Alho	<i>Allium sativum</i>	Geral	Cowan (1999)
Arnica	<i>Arnica montana</i>	Geral	Cowan (1999)
Arruda	<i>Ruta graveolens</i>	Bacteria, Fungi	Pavlović et al. (2014)
Batata-inglesa	<i>Solanum tuberosum</i>	Bacteria, Fungi	Cowan (1999)
Bérberis	<i>Berberis vulgaris</i>	Bacteria, Protozoa	Cowan (1999)
Bico-de-papagaio	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Geral	Cowan (1999)
Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i>	Bacteria, MTB, Helmintos, Vírus	Cowan (1999)
Camomila-romana	<i>Anthemis nobilis</i>	<i>Candida albicans</i>	Duarte et al. (2005)
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Bacteria	Pandey et al. (2014)
Canela-do-ceilão	<i>Cinnamomum verum</i>	Geral	Cowan (1999)

Tabela 01 – Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana

			(continuação)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismos^{a, b}	Referências
Cânhamo	<i>Cannabis sativa</i>	Bacteria, Vírus	Cowan (1999)
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Bacteria, Fungi	Almeida et al. (2013), Moore-Neibel et al. (2011), Vazirian et al. (2013)
Cebola	<i>Allium cepa</i>	Bacteria, <i>Candida</i>	Cowan (1999)
Chapéu-de-napoleão	<i>Thevetia peruviana</i>	<i>Plasmodium</i>	Cowan (1999)
Chá-verde	<i>Camellia sinensis</i>	Bacteria, Vírus	Cowan (1999), Omolo et al. (2014)
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i>	<i>C. albicans</i>	Duarte et al. (2005)
Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Bacteria	Cowan (1999)
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Bacteria, Fungi	Cowan (1999)
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	Geral	Cowan (1999), Pandey et al. (2014)
Dente-de-leão	<i>Taraxacum officinale</i>	Fungi	Cowan (1999)
Dormideira	<i>Papaver somniferum</i>	Geral	Cowan (1999)

Tabela 01 – Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana

			(continuação)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismos ^{a, b}	Referências
Equinácea	<i>Echinaceae angustifolia</i>	Geral	Cowan (1999)
Erva-cidreira-falsa	<i>Lippia alba</i>	<i>C. albicans</i>	Duarte et al. (2005)
Erva-de-são-joão	<i>Hypericum perforatum</i>	Geral	Cowan (1999)
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Bacteria, vírus	Cowan (1999)
Falso-barbatimão	<i>Cassia leptophylla</i>	<i>B. subtilis, Pseudomonas aeruginosa</i>	Daniel et al. (2014)
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Bacteria, Fungi	Mickiene et al. (2011)
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	<i>C. albicans</i>	Duarte et al. (2005)
Hena	<i>Lawsonia inermis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cowan (1999)
Hortelã-doce	<i>Mentha arvensis</i>	Bacteria, Fungi	Duarte et al. (2005), Mickiene et al. (2011)
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i>	Geral	Cowan (1999), Duarte et al. (2005), Singh et al. (2011), Zaidi e Dahiya (2015)
Hortelã-verde	<i>Mentha spicata</i>	Bacteria, Fungi	Zaidi e Dahiya (2015)

Tabela 01 – Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana

			(continuação)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismos^{a, b}	Referências
Ingá-feijão	<i>Inga marginata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Daniel et al. (2014)
Laranja-azedada	<i>Citrus aurantium</i>	Bacteria	Madhuri et al. (2014)
Lima	<i>Citrus aurantifolia</i>	Bacteria	Oikeh et al. (2015)
Limão	<i>Citrus limon</i>	Bacteria	Adham (2015), Dhanavade et al. (2011), Oikeh et al. (2015)
Lírio-de-escalada	<i>Gloriosa superba</i>	Geral	Cowan (1999)
Louro-do-mato	<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	<i>P. aeruginosa, Escherichia coli</i> , Fungi	Daniel et al. (2014)
Lúpulo	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Omolo et al. (2014)
Maçã	<i>Malus sylvestris</i>	Geral	Cowan (1999)
Mamão	<i>Carica papaya</i>	Geral	Cowan (1999)
Mamona	<i>Ricinus communis</i>	Geral	Cowan (1999)
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	Bacteria	Cowan (1999)

Tabela 01 – Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana

			(continuação)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismos^{a, b}	Referências
Margarida	<i>Calendula officinalis</i>	Bacteria	Cowan (1999)
Mulungu-do-litoral	<i>Erythrina speciosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> , Fungi	Daniel et al. (2014)
Noz-moscada	<i>Myristica fragrans</i>	Geral	Cowan (1999)
Oliveira	<i>Olea europaea</i>	Geral	Cowan (1999)
Palmarosa	<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>C. albicans</i>	Duarte et al. (2005)
Peiote (cacto)	<i>Lophophora williamsii</i>	Geral	Cowan (1999)
Pimenta-da-guiné	<i>Aframomum melegueta</i>	Gram negativa	Doherty et al. (2010)
Pimenta-da-Jamaica	<i>Pimenta dioica</i>	Geral	Cowan (1999)
Pimentão	<i>Capsicum annuum</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Omolo et al. (2014)
Pimenta-preta	<i>Piper nigrum</i>	Fungi, Bacteria	Cowan (1999), Pandey et al. (2014)
Priprioca	<i>Cyperus articulatus</i>	<i>C. albicans</i>	Duarte et al. (2005)
Sene	<i>Cassia angustifolia</i>	<i>S. aureus</i>	Cowan (1999)
Tangerina	<i>Citrus reticulata</i>	Bacteria	Adham (2015)

Tabela 01 – Exemplos de plantas com atividade antimicrobiana

			(conclusão)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismos ^{a, b}	Referências
Timbó-de-caiena	<i>Tephrosia toxicaria</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Daniel et al. (2014)
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Vírus, Bacteria, Fungi	Cowan (1999)
Toranja	<i>Citrus paradisi</i>	Bacteria, Fungi	Adham (2015), Cowan (1999)
Wasabi	<i>Wasabia japonica</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Omolo et al. (2014)

^a Exemplos de alguns microrganismos sensíveis ao efeito antimicrobiano da planta correspondente.

^b “Geral” indica atividade contra múltiplos tipos de microrganismos (Bacteria, Fungi e Protozoa), “Bacteria” indica atividade contra bactérias Gram positiva e Gram negativas.

“MTB” significa *Mycobacterium tuberculosis*.

As referências incluem tanto artigo de revisão como pesquisas originais.

Fonte: próprio autor (2016). O levantamento de dados foi realizado no período de 2014 a 2016.

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de vegetais e desempenham um papel importante para as plantas, atraindo alguns insetos que promovem dispersão de pólenes e sementes ou mantendo afastados os predadores e outros animais indesejáveis (BAKKALI et al., 2008; NAZZARO et al., 2013). Caracterizam-se por misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e odoríferas; em cuja composição inserem-se terpenoides, especialmente monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e outras moléculas como ácidos, fenóis, ésteres, álcool, aldeídos, hidrocarbonetos alifáticos, éteres, peróxidos e cetonas (NAZZARO et al., 2013; SIMÕES et al., 2001).

Os terpenos possuem atividade antibacteriana moderada, e entre esses compostos encontram-se o limoneno, α -pineno, β -pineno e outros; já os terpenoides (como carvacrol, timol e mentol) e fenilpropenos (como eugenol e cinamaldeído) possuem ótima ação contra diversas bactérias (NAZZARO et al., 2013).

Considerando o representativo número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é bem provável que a ação antibacteriana não é devida a um único mecanismo, e sim devido a existência de muitos alvos celulares (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013). A hidrofobicidade dos óleos essenciais permite que os mesmos interajam com os lipídeos de membrana celular, perturbando sua estrutura e funcionamento (BURT, 2004; FALEIRO, 2011; NAZZARO et al., 2013). É provável que nem toda estrutura ou via celular bacteriana seja alvo direto dos óleos essenciais, pois algumas podem ser afetadas indiretamente como consequência de outro mecanismo antibacteriano (Figura 01).

Os óleos essenciais podem ser obtidos de flores, folhas, cascas, rizomas e frutos, como a exemplo de óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Podem ser obtidos por vários métodos, entre eles se destacam a prensagem do pericarpo de frutos, a destilação por arraste a vapor, a hidrodestilação e o CO₂ supercrítico (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; SANTOS et al., 2004). Tais óleos são utilizados desde os tempos antigos, a exemplo da civilização egípcia que os extraía por infusão de plantas aromáticas e utilizava-os para massagem, perfumes e embalsamamentos (SIPOS et al., 2004).

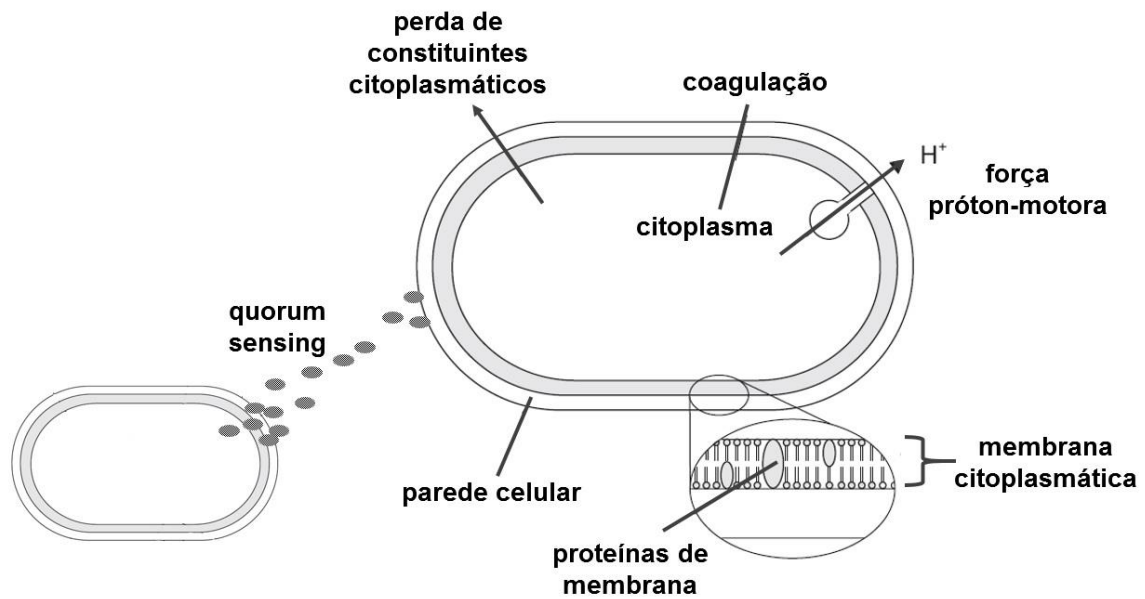


Figura 01 – Alvos e mecanismo de ação de óleos essenciais. Os óleos essenciais podem danificar a membrana citoplasmática, afetando a sua permeabilidade e levando à perda de constituintes celulares como íons e outros metabólitos importantes para a viabilidade da bactéria; além disso, podem afetar proteínas de membrana, causar depleção da força próton-motora, danificar a parede celular, coagular constituintes citoplasmáticos e interferir na comunicação entre as células bacterianas.

Fonte: adaptado de Burt (2004).

3.2.2.1 Óleo essencial de orégano (OEO)

O OEO é extraído principalmente das folhas de uma erva de origem Mediterrânea chamada *Origanum vulgare*, pertencente à família Labiatae (CHUN et al., 2005). Essa extração é realizada por métodos ecologicamente adequados, como a hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor (Figura 02). Na destilação por arraste a vapor, o óleo essencial é vaporizado quando as folhas do orégano são submetidas a uma corrente de vapor de água; após condensação, a mistura de vapores de óleo e água é separada pela diferença de densidade. No entanto, na técnica de extração por destilação via arraste a vapor, o material vegetal não fica em contato direto com a água, e sim sobre um suporte perfurado por onde o vapor de água passa. Já na hidrodestilação o material vegetal fica em contato direto com a água em ebulição (KOKETSU; GONÇALVES, 1991).

Dentre os óleos essenciais, o de orégano se destaca pela potente atividade antibacteriana (BURT, 2004; BURT; REINDERS, 2003; CHAFTAR et al., 2015; DIBROV et al., 2002; SOKOVIĆ et al., 2007). Soković et al. (2007) avaliaram a ação de dez óleos essenciais contra bactérias patogênicas humanas e verificaram

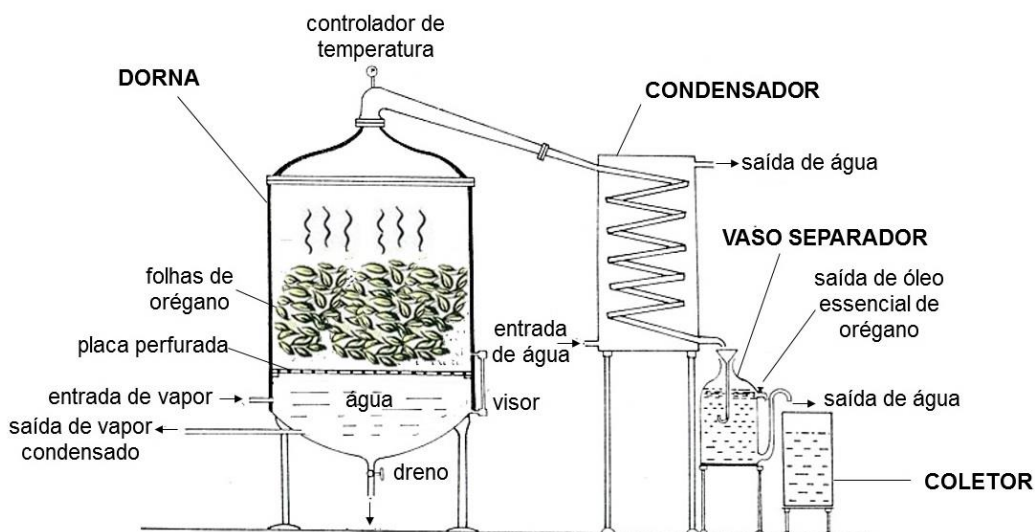


Figura 02 – Técnica para extração de óleo essencial de orégano. A destilação por arraste a vapor é um dos métodos mais comuns para extração de óleo essencial de folhas vegetais e necessita de um aparato composto por cinco partes: (1) fonte geradora de vapor, (2) dorna (recipiente que comporta a água e o material vegetal), (3) condensador, (4) vaso separador e (5) coletor. Neste método, o material vegetal (folhas de orégano) não fica em contato direto com a água, porém ambos ficam no interior de uma dorna. O material a ser destilado fica sobre uma placa perfurada no interior da dorna, e esta é preenchida com água até um nível um pouco inferior ao da placa, de modo que a água é aquecida e o vapor úmido atravessa o material vegetal. O óleo volatilizado e o vapor de água vão para o condensador, onde serão resfriados. A mistura condensada de água e óleo flui para o vaso separador (ou decantador) que facilita a separação dos dois componentes pela diferença de densidade, o óleo (menos denso que a água) é coletado na parte superior do vaso separador e a água é recolhida na parte inferior.

Fonte: adaptado de Koketsu e Gonçalves (1991).

que o OEO apresentou a melhor atividade antibacteriana, com baixa concentração inibitória mínima. Chaftar et al. (2015) testaram dezenove óleos essenciais contra *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus xylosus*, e o óleo de orégano (*Origanum vulgare*) foi um dos mais potentes, apresentando concentração inibitória mínima dentro da faixa de 0,3 a 1,13 mg/mL (Tabela 02).

O OEO inibe o crescimento de bactérias importantes em contaminação alimentar e infecções hospitalares. Barros et al. (2009) relataram a interferência do óleo de orégano no crescimento de isolados *S. aureus* de alimentos. Betancourt et al. (2012) demonstraram a atividade de OEO contra *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 25922. Si et al. (2008) observaram cepas de *E. coli* produtoras de ESBL sensíveis ao óleo de orégano. O estudo de Fournomiti et al. (2015) mostrou que o OEO é eficiente, em uma concentração aproximada de 0,2 mg/mL, contra *E. coli* resistente a carbapenêmicos. Saghi et al. (2015) relataram a eficiência do OEO no combate a cepas de *A.*

Tabela 02 – Concentração inibitória mínima (CIM) de vários óleos essenciais

Óleo essencial	CIM (mg/mL)	
	Gram negativa	Gram positiva
<i>Citrus sinensis</i> (laranjeira)	> 0,80 a > 4,00	> 4,00
<i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	0,40 a > 4,00	1,00 a 2,00
<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto-comum)	> 0,90 a > 4,50	> 4,50
<i>Mentha piperita</i> (hortelã-pimenta)	> 0,90 a 4,50	2,25 a > 4,50
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	0,12 a 0,30	1,13
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	> 0,90 a > 4,50	> 4,50
<i>Ruta graveolens</i> (arruda)	< 0,02 a > 4,00	0,50 a 2,00
<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-índia)	0,25 a 2,50	1,25 a > 5,00

Fonte: Adaptado de Chaftar et al. (2015).

baumannii multirresistentes, inclusive resistente a imipenem e polimixina. O estudo de Nostro et al. (2004) mostrou MRSA suscetível ao OEO e seus componentes, carvacrol e timol.

O carvacrol é um monoterpeneo fenólico, isômero do timol (Figura 03), e ambos são compostos majoritários do OEO. Entre os compostos minoritários estão: álcoois monoterpênicos (linalool, 4-terpineol), hidrocarbonetos monoterpênicos (para-cimeno, terpinoleno, terpineno, pineno), sesquiterpenos (beta-cariofileno, germacreno, espatulenol), mirceno, limoneno, ácido rosmarínico e outros (CLEFF et al., 2008). Esses componentes variam em diferentes óleos, por exemplo, o eugenol é a molécula mais abundante no óleo essencial de cravo e o eucaliptol é o composto majoritário do óleo de eucalipto (SIMÕES et al., 2001).

Os compostos fenólicos carvacrol e timol (Figura 03) são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas do orégano, a hidrofobicidade dessas moléculas indica que a membrana celular microbiana é o principal alvo da ação antibiótica desse óleo essencial; ao modificarem essa estrutura lipídica, aumenta-se sua permeabilidade de forma que haja extravasamento de íons e outros constituintes celulares (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013). Quando a membrana celular é afetada, é plausível que haja comprometimento da viabilidade bacteriana porque essa estrutura é responsável por

muitas funções em procaríotos.

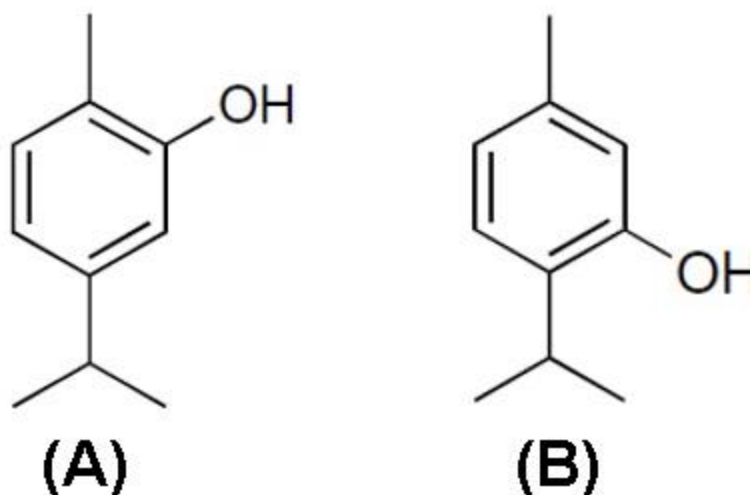


Figura 03 – Estruturas químicas dos terpenoides carvacrol (A) e timol (B). São isômeros fenólicos caracterizados como componentes antimicrobianos majoritários do óleo essencial de orégano.

Fonte: Bakkali et al. (2008).

Lambert et al. (2001) sugerem que o OEO danifica a integridade da membrana citoplasmática, afetando o equilíbrio de pH e de íons intracelulares (potássio e fosfato) em *S. aureus*. De Souza et al. (2010) mostraram que células de *S. aureus* tratadas com OEO, na concentração inibitória mínima, apresentaram perda de material celular e alterações morfológicas identificadas como vesículas na superfície celular. Suzuki et al. (2015) observaram alterações morfológicas superficiais em células de *S. epidermidis* e *Proteus vulgaris* tratadas com OEO; essas alterações se mostraram como regiões superficiais afundadas em direção ao citoplasma, sendo características de células murchas que provavelmente perderam seus constituintes. Caillet et al. (2009) estudaram células de *S. aureus* tratadas com OEO e verificaram que houve redução da quantidade de ATP intracelular e aumento de ATP extracelular; além disso o tratamento afetou a composição de muropeptídeos da parede. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou o dano à estrutura de peptideoglicano.

Os óleos essenciais geralmente têm melhor atividade antibacteriana do que a mistura de seus principais componentes; sugerindo que os componentes minoritários são importantes na atividade antimicrobiana (BASSOLÉ; JULIANI,

2012). O OEO apresenta atividade antimicrobiana potencializada, provavelmente devido a diversas interações sinérgicas, por exemplo: entre carvacrol e p-cimeno (componente minoritário), ou entre carvacrol e timol (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; BURT, 2004; LAMBERT et al., 2001; PEI et al., 2009; RIVAS et al., 2010; ZHOU et al., 2007). Além disso, a mistura de componentes existente em óleos essenciais tem potencial para minimizar a seleção de cepas resistentes; pois a combinação pode perturbar várias funções biológicas ao mesmo tempo, desde que os agentes antimicrobianos na associação tenham diferentes alvos celulares bacterianos (BOLLENBACH, 2015).

Estudos anteriores mostraram que o OEO possui outras atividades biológicas além de antibacteriana (Tabela 03), tais como antifúngica, antiviral, antioxidante e anticancerígena (CERVATO et al., 2000; GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014; GILLING et al., 2014; KALEMBA; KUNICKA, 2003). Romero et al. (2012) relataram que OEO é ativo contra os fungos fitopatogênicos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*. Manohar et al. (2001) reportam a atividade do OEO contra *Candida albicans*. O OEO também possui atividade contra o vírus Influenza e o norovírus (GILLING et al., 2014; VIMALANATHAN et al., 2012).

3.3 NANOTECNOLOGIA

O marco histórico e científico da nanotecnologia ocorreu em 1959 em uma palestra ministrada por Richard Feynman do Instituto Americano de Tecnologia; no entanto, o termo “nanotecnologia” não foi usado na ocasião, mas falava-se da possibilidade de manipular a matéria na escala atômica e molecular (MARTINS; TRINDADE, 2012).

A nanotecnologia é a ciência que tem como objeto de estudo a matéria em seu tamanho nanométrico. Os prefixos centi, mili, micro e nano são utilizados para especificar o fator pelo qual uma grandeza é multiplicada; e na escala nano esse fator corresponde a 10^{-9} , ou seja, um nanômetro corresponde a bilionésima parte de um metro, ou uma milionésima parte do milímetro (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2011; GUAZZELLI, 2009).

Apenas reduzindo o tamanho de um material para a escala nanométrica, sem alterar suas substâncias químicas, é possível alterar suas

Tabela 03 – Estudos que abordam atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano, indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas

(continua)

CIM (mg/mL ou %)	Bactérias	Referências
0,240 ^a	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Choleraesuis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Alvarez et al. (2014)
0,460 – 2,31 ^a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CR e ATCC, <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Amrouni et al. (2014)
0,780 – 3,12 ^a	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Betancourt et al. (2012)
* A, B, C	<i>E. coli</i>	Burt e Reinders (2003)
0,230 – 0,69 ^a	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Busatta et al. (2007)
0,300 – 1,13 ^a	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	Chaftar et al. (2015)
0,120 – 0,5 ^b	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , MRSA	Da Costa et al. (2009)
0,060 ^b	<i>S. aureus</i>	De Souza et al. (2009)
*D	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Du et al. (2009)
0,073 – 0,219 ^a	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Fournomiti et al. (2015)
0,472 – 1,181 ^a	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Lambert et al. (2001)

Tabela 03 – Estudos que abordam atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano, indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas

(conclusão)

CIM (mg/mL ou %)	Bactérias	Referências
* D	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. Choleraesuis</i>	López et al. (2007)
0,060 – 0,125 ^b 0,010 – 0,03 ^{b, c} 0,030 – 0,06 ^{b, d}	MRSA, MRSE	Nostro et al. (2004)
5,800 – 46,3 ^a	<i>Pseudomonas syringae</i>	Oliva et al. (2015)
0,300 – 0,6 ^a	<i>B. cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	Rosato et al. (2010)
0,200 – 0,35 ^a	<i>A. baumannii</i> CR	Saghi et al. (2015)
0,460 ^a	<i>S. Enteritidis</i>	Santurio et al. (2007)
0,050 ^b	<i>E. coli</i> ESBL	Si et al. (2008)
* E	<i>S. Enteritidis</i>	Silva et al. (2010)
0,050 – 0,1 ^b	<i>S. aureus</i> , <i>S. Typhimurium</i>	Stojković et al. (2013)

^a concentração do óleo de orégano em mg/mL; ^b concentração do óleo essencial de orégano em % (v/v).

^c CIM do carvacrol; ^d CIM do timol.

* Sem dados de CIM, pois foi usado outro método para determinar a atividade antibacteriana.

A: disco difusão, B: curva de crescimento e morte, C: microscopia eletrônica de varredura, D: difusão de fase-vapor, E: poço-difusão.

CR: resistente a carbapenêmicos.

Fonte: próprio autor (2015). Levantamento de dados realizado no período de 2014 a 2016.

propriedades, tais como condutividade elétrica, elasticidade, resistência, cor, atividade antimicrobiana, entre outras (GUAZZELLI, 2009). As propriedades dos materiais mudam à medida que seus tamanhos se aproximam da nanoescala, ou seja, à medida que a porcentagem de átomos na superfície do material se torna significativa (RAI et al., 2012). Por exemplo, o carbono na forma de grafite é macio e maleável, mas quando diminuído à nanoescala torna-se mais resistente que o aço; o alumínio em nanoescala é altamente inflamável, podendo pegar fogo espontaneamente; já o ouro nanoparticulado funde em temperatura bem abaixo (300°C) que placas de ouro (1064°C) (GUAZZELLI, 2009; GÜNTER; CORAIN, 2003).

Tipicamente, a nanotecnologia trabalha com partículas cujo tamanho encontra-se entre 1 e 100 nm (THE NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2011), sendo essa faixa frequentemente utilizada para definir nanomateriais. No entanto, essa definição está sendo bastante questionada; pois pesquisas têm mostrado que em tamanhos maiores, as propriedades características do material em nanoescala ainda podem ser mantidas; sendo assim, recomenda-se que estruturas com até 300 nm também sejam consideradas nanomateriais (FRIENDS OF THE EARTH AUSTRALIA, 2009; GUAZZELLI, 2009; SOIL ASSOCIATION, 2015).

O termo “nanopartícula (NP)” é bastante amplo, e se refere a agregados nanométricos de diferentes composições, como metálicas, lipídicas, proteicas, entre outras. As NPs aplicadas em liberação controlada de fármacos se referem a dois tipos de estruturas, nanoesferas e nanocápsulas. Nos sistemas denominados de nanoesferas, o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica; já nanocápsulas são sistemas que contêm o fármaco confinado a uma cavidade delimitada por polímero (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Ainda há NPs que não carregam fármacos, mas por si só são o princípio ativo, como é o caso das NPs metálicas que apresentam ação antimicrobiana (HERMAN; HERMAN, 2014).

NPs podem ser produzidas por duas metodologias, (1) métodos “de cima para baixo” (*top-down*) ou (2) métodos “de baixo para cima” (*bottom-up*). *Top-down* é quando o material macroscópico é processado e dividido até atingir escala nanométrica; *bottom-up* é produção de NP a partir de blocos de construção (átomos, moléculas), unindo-os até atingirem agregados nanométricos (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012; GADE et al., 2010).

NPs estão presentes em vários materiais do nosso cotidiano, sendo

aplicadas em cosméticos, produtos médicos e farmacêuticas, entre outros, devido a suas propriedades químicas, físicas e biológicas únicas. NPs de dióxido de titânio (TiO_2) e de óxido de zinco (ZnO) são amplamente usadas em cosméticos devido à ótima capacidade de bloquear raios UVA e UVB (HERMAN; HERMAN, 2014). Devido a seus efeitos antimicrobianos, NPs de prata e titânio são impregnadas em vários materiais, como filtros de água, têxteis, calçados, ar condicionado, eletrodomésticos, produtos de higiene pessoal, eletrônico, material hospitalar e odontológico (GUAZZELLI; PEREZ, 2009; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

3.3.1 Nanopartículas Metálicas

Há séculos os humanos aproveitam as propriedades antimicrobianas dos metais. Vasos de cobre e prata eram usados para desinfecção de água e preservação de alimentos desde os tempos dos reis persas, porém essa prática foi adotada por fenícios, gregos, romanos e egípcios. Há registro de tratados cirúrgicos de milhares de anos que documentam o uso de sal de cobre como adstringente. A prata tem importância histórica na medicina, como o nitrato de prata na prevenção de infecções oculares em recém-natos e as películas à base de prata na prevenção de infecções de feridas (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

A ação antimicrobiana de metais é devida principalmente ao potencial de redução desses elementos, pois são capazes de participar de reações de oxidorredução, ligando-se a moléculas microbianas doadoras de elétrons (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). A prata é um dos metais de destaque com relação à atividade antimicrobiana, principalmente por esse elemento possuir grande tendência à redução (potencial de redução igual a 0,80 V) comparado a metais como Cu (0,34 V), Fe (- 0,44 V) e Zn (-0,76 V) (SCOTT; YU, 2015).

NPs metálicas têm sido produzidas por diversos métodos, podendo ser físicos, químicos ou biológicos. Nos processos físicos, diversas técnicas, tais como evaporação-condensação, ablação por laser ou emprego de microondas transformam metal “bulk” em metais nanoparticulados (EL-NOUR et al., 2010). No método químico ocorre redução de íons metálicos (provenientes de sais) a suas respectivas NPs, para tanto nessa técnica empregam-se agentes redutores (como borohidreto de sódio, citrato de sódio e outros) e estabilizadores (polímeros como PVP, PEG, poliácridamida, etc) (EL-NOUR et al., 2010; JIA; SCHÜTH, 2011). Uma

metodologia mais recente é a síntese de NPs metálicas através de métodos biológicos, nos quais peptídeos, bactérias, fungos e plantas são utilizados como agentes redutores de sais metálicos; essa abordagem é interessante porque dispensa o uso de agentes redutores químicos, sendo ecologicamente mais adequada (DURÁN et al., 2011).

3.3.1.1 Nanopartículas de prata

A prata tem sido utilizada há séculos para tratamento de feridas, infecções oculares, preservação de alimento e água (ALEXANDER, 2009); nos dias de hoje ainda é empregada como nitrato de prata para tratar doenças oftálmicas (CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015) ou sulfadiazina de prata para tratamento de feridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). O uso de nanopartículas precede o início da nanotecnologia. NPs de prata são utilizadas há mais de 100 anos, têm sido registradas como um material biocida nos Estados Unidos desde 1954, sendo principalmente aplicadas como algicidas, aditivos antimicrobianos (para serem introduzidos em plásticos e têxteis) e impregnados em filtros de água (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

No entanto, com a era da nanotecnologia, o uso da prata em nanoescala foi amplamente difundido, principalmente devido a seus efeitos antimicrobianos. NPs de prata estão cada vez mais presente em itens do nosso cotidiano como têxteis, eletrodomésticos, cosméticos, canecas, talheres e outros utensílios domésticos, brinquedos, desinfetantes, tintas, curativos, equipamentos médicos e odontológicos, artigos eletrônicos, e muitos outros (GUAZZELLI; PEREZ, 2009; REIDY et al., 2013).

Estudos anteriores têm mostrado que NPs de prata possuem amplo espectro de ação antibacteriana, inclusive contra bactérias multirresistentes (Tabela 04); podendo ser alternativas para combater infecções causadas por MRSA e MRSE (ALZOHAIRY et al., 2015; CARDOZO et al., 2013; RAI et al., 2012), *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Citrobacter* sp. produtores de ESBL (SUBASHINI; KHANNA; KANNABIRAN, 2014), *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina (VRE), *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos e polimixina, *P. aeruginosa* e Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos (CAVASSIN et al., 2015).

A prata nanométrica possui grande área superficial, proporcionando

Tabela 04 – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando informações adicionais sobre as nanopartículas (síntese e tamanho), a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas

(continua)

Bactéria	AgNP (tamanho)	CIM (µg/mL)	Referência
<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Síntese química com revestimento de citrato, diversos tamanhos	20 – 80 (5 nm) 20 – 100 (7 nm) 30 – 100 (10 nm) 30 – 110 (15 nm) 40 – 120 (20 nm) 50 – 120 (30 nm) 80 – 160 (50 nm) 90 – 200 (63 nm) 90 a >200 (85 nm) 110 a >200 (100 nm)	Agnihotri et al. (2014)
MRSA, MRSE	-	11,25 – 45,00	Ansari et al. (2014)
MRSA	Nanopartículas comerciais de marcas diferentes ^{(d), (e)}	900 (10 nm) ^(d) 4170 (30 -40 nm) ^(d) 1370 (100 nm) ^(e)	Ayala-Núñez et al. (2009)
MRSA, VRE, <i>Acinetobacter baumannii</i> MDR, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MDR, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR, Enterobacteriaceae MDR	Síntese química, revestimentos de citrato (40 nm) ^(a) , quitosana (25 nm) ^(b) e PVA (10 nm) ^(c)	1,6 – 13,5 ^(a) 1,6 – 13,5 ^(b) 13,5 a ≥ 54 ^(c)	Cavassim et al. (2015)
<i>E. coli</i> MDR e <i>S. aureus</i> MDR	Biossíntese usando <i>Ocimum gratissimum</i> (alfavaca) (18 nm)	4 – 8	Das et al. (2015)

Tabela 04 – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando informações adicionais sobre as nanopartículas (síntese e tamanho), a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas

(continuação)

Bactéria	AgNP (tamanho)	CIM (µg/mL)	Referência
<i>E. coli</i> , <i>Salmonella Typhi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Biossíntese utilizando <i>Trichoderma viride</i> (5-40 nm)	30 – 80	Fayaz et al. (2010)
<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> MDR, <i>M. luteus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Síntese química, revestimento de citrato (25-40 nm)	0,61 – 6,12	Ghosh et al. (2013)
<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>E. coli</i>	Redução foto-assistida de íons prata (7-20 nm)	6,25 – 12,5	Jain et al. (2009)
<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	-	100	Kim et al. (2011)
<i>P. aeruginosa</i> MDR	Síntese química (20-30 nm)	* A	Palanisamy et al. (2014)
Enterobacteriaceae ESBL e KPC	Biossíntese usando <i>Fusarium oxysporum</i> (41,7 nm)	* B	Picoli et al. (2013)
<i>P. aeruginosa</i> MDR	Biossíntese usando a planta <i>Phyllanthus amarus</i> (30 nm)	6,25 – 12,5	Singh et al. (2014)

Tabela 04 – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando informações adicionais sobre as nanopartículas (síntese e tamanho), a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) e as bactérias testadas (conclusão)

Bactéria	AgNP (tamanho)	CIM (µg/mL)	Referência
<i>E. coli</i> ESBL, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL, <i>Citrobacter</i> sp. ESBL	Biossíntese usando <i>Streptomyces</i> (20-70 nm)	1,4 – 4	Subashini et al. (2014)

^(a) Revestimento de citrato, ^(b) Revestimento de quitosana, ^(c) Revestimento de PVA.

^(d), ^(e) São identificações para duas marcas diferentes de nanopartículas de prata comercial.

MDR, Resistência a múltiplos antimicrobianos.

ESBL, betalactamase de espectro estendido.

MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

VRE, *Enterococcus* resistente à vancomicina.

-, Informações adicionais sobre as nanopartículas não estão disponíveis.

*, CIM indisponível porque foi utilizado outro método para determinar atividade antibacteriana.

A: inibição de biofilme, B: disco difusão,

FONTE: próprio autor. O levantamento de dados foi realizado no período de 2014 a 2016.

melhor contato com bactéria; pois o tamanho pequeno permite a existência de um alto número de átomos na superfície da NP, proporcionando ótima eficiência antibacteriana (HERMAN; HERMAN, 2014; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011; RAI et al., 2012).

Apesar da comprovada ação antibacteriana das NPs de prata, o mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido. Uma linha de pesquisadores sugere que a ação antimicrobiana é devida aos íons de prata que são liberados pela oxidação do nanometal; Xiu et al. (2012) relataram que quando se tira a possibilidade de oxidação, as NPs de prata não são tóxicas para as bactérias porque não liberam íons metálicos. Por outro lado, outra vertente de estudo sugere que o mecanismo de ação envolve fatores intrínsecos das NPs, que vão além da liberação dos íons de prata (DESPAX et al., 2011).

Além disso, é provável que as NPs de prata afetem microrganismos devido a múltiplos mecanismos de ação (Figura 04). Estudos sugerem que as mesmas danificam membranas celulares, afetam sua permeabilidade seletiva e o funcionamento da cadeia respiratória, danificam a parede, enzimas e proteínas celulares, causam danos ao DNA, além de induzir a formação de radicais livres (DIBROV et al., 2002; FENG et al., 2000; KIM et al., 2011; LI et al., 2010; LOK et al., 2006; REIDY et al., 2013). Kim et al. (2011) relataram que *S. aureus* e *E. coli* expostos a NPs de pratas apresentaram grande perda de proteínas celulares, inativação de lactato desidrogenase, formação de espécies reativas de oxigênio, além de alterações morfológicas (fragmentos irregulares na superfície celular) que sugerem dano à membrana celular com consequente aumento de sua permeabilidade e perda de constituintes citoplasmáticos. Utilizando análises proteômicas e investigando os níveis de ATP celular, Lok et al. (2006) sugerem que NPs de prata levam à dissipação da força proton motora da bactéria, e desestabilizam a membrana externa ao deixar a bactéria mais suscetível à ação bacteriolítica de detergente.

Há uma variedade enorme de NPs, pois existem vários formatos (esférico, triangular, tetraédrico), tipos de revestimentos (citrato de sódio, borohidreto de sódio, diferentes polímeros, peptídeos, etc), diferentes tamanhos (na faixa de 1 a 100 nm, ou até um pouco mais), diferentes formas de preparo (REIDY et al., 2013).

Nitrato de prata é frequentemente usado como um precursor na síntese de NP de prata por métodos químicos e biológicos, mas para os primeiros

utilizam-se agentes redutores químicos e para os últimos são empregados agentes redutores biológicos (DURÁN et al., 2011).

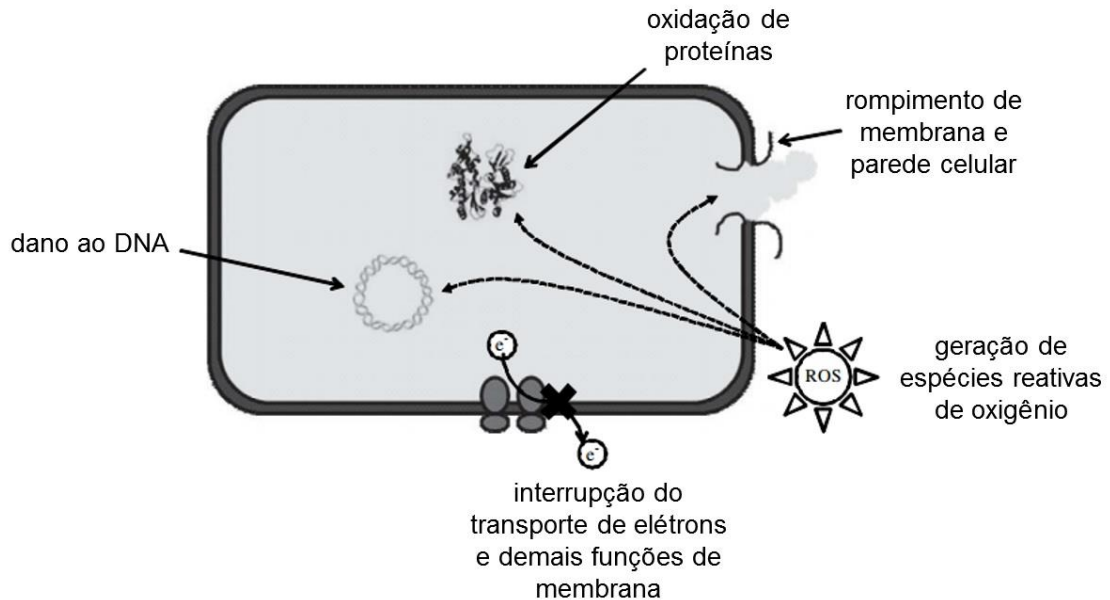


Figura 04 – Mecanismos de ação de nanopartículas de prata contra células microbianas. Estudos sugerem que antimicrobianos à base de prata danificam membrana e suas diversas funções em procariotos (transporte de substâncias, permeabilidade seletiva, transporte de elétrons e geração de energia), afetam o DNA bacteriano, oxidam proteínas e enzimas, além de contribuírem para a geração de espécies reativas de oxigênio nas células bacterianas.

Fonte: adaptado de Li et al. (2008)

As bactérias são de grande interesse para a produção de nanometais devido à facilidade de manipulação genética desses microrganismos. Entre as espécies já utilizadas para esse fim estão *Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Lactobacillus*, e muitas outras (IRAVANI, 2014). Estudos mostraram que várias plantas podem ser usadas na biossíntese de NP de prata, a exemplo de *Pelargonium graveolens* (gerânio), *Origanum vulgare* (orégano), *Cinnamomum camphora* (cânfora) e outras (DAS et al., 2015; HUANG et al., 2007; LI et al., 2010; MUN et al., 2013; SANKAR et al., 2013; SHANKAR; AHMAD; SASTRY, 2003).

Vários fungos são descritos como redutores dos íons de prata na produção de NPs, como *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Coriolus versicolor*, *Trichoderma asperellum* e outros (DURÁN et al., 2005; DURAN et al., 2011; GADE et al., 2010). Durán et al. (2005) padronizaram o método biológico de produção extracelular de NP de prata utilizando o fungo *F. oxysporum* (Figura 05), e sugerem que o mecanismo de biossíntese se deve à nitrato redutase e quinona

transportadora de elétrons que possuem a capacidade de reduzir íons metálicos de nitrato de prata em solução (Figura 06).

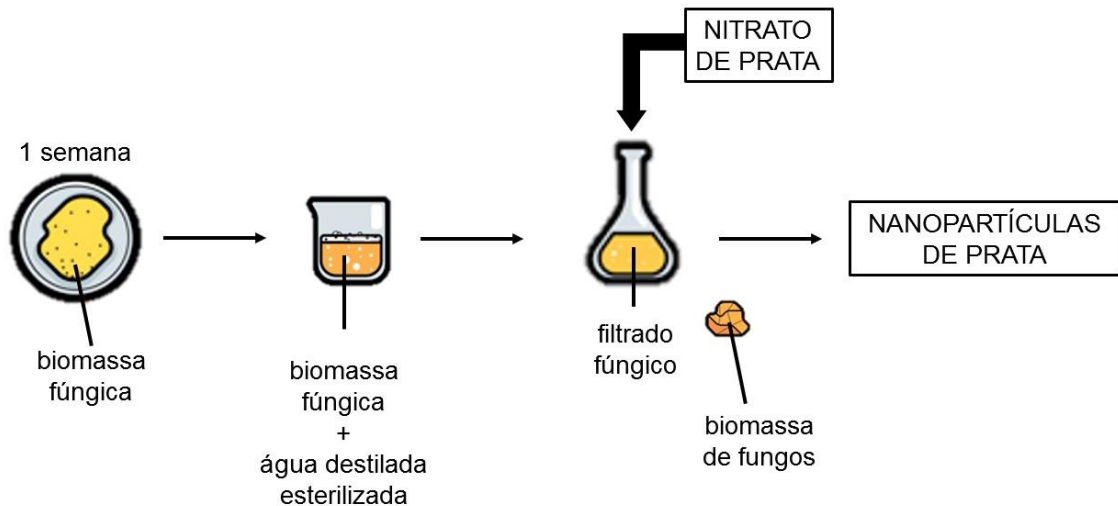


Figura 05 – Produção de nanopartículas de prata utilizando o fungo *Fusarium oxysporum* como agente redutor dos íons metálicos. O fungo cultivado em placa de Petri durante uma semana é adicionado à água destilada, e após incubação (28°C, 72 h) o sistema passa por processo de filtração para remoção da biomassa fúngica. Ao filtrado livre de células fúngicas adiciona-se nitrato de prata, e posteriormente incubo-o em ausência de luz (28°C) até a formação de nanopartículas de prata. O filtrado compõe-se de enzimas e outros compostos orgânicos responsáveis pela reação de redução em que íons de prata ganham elétrons, e que por sua vez se reúnem em aglomerados de átomos de prata, formando as nanopartículas.

Fonte: adaptado de Ereno (2013).

3.4 COMBINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS

Combinação de antimicrobianos é uma estratégia promissora para melhorar a eficácia do tratamento e inclusive minimizar a seleção de bactérias multirresistentes (BOLLENBACH, 2015; FISCHBACH, 2011).

Muitos estudos relatam efeito aditivo ou sinérgico entre o OEO e outros antimicrobianos alternativos (eugenol, linalol, mentol, cinamaldeído, óleo essencial de tomilho) ou convencionais (gentamicina, polimixina, canamicina, levofloxacina) (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; DE SOUZA et al., 2009; ROSATO et al., 2007; SI et al., 2008; STOJKOVIĆ et al., 2013).

Efeito antimicrobiano aditivo ou sinérgico também tem sido mostrado entre NP de prata e diversos agentes antimicrobianos, como eugenol, fenazina-1-carboxamida, cinamaldeído, ampicilina, canamicina, eritromicina, cloranfenicol e amoxicilina (BIASI-GARBIN et al., 2015; CARDOZO et al., 2013; FAYAZ et al., 2010;

GHOSH et al., 2013; LI et al., 2005). Inclusive, NP de prata produzidas pelo fungo *F. oxysporum* apresentaram ação antimicrobiana melhorada contra MRSA, *Streptococcus agalactiae* e *C. albicans*, quando combinadas com fenazina-1-carboxamida, eugenol e fluconazol respectivamente (BIASI-GARBIN et al., 2015; CARDOZO et al., 2013; LONGHI et al., 2015).

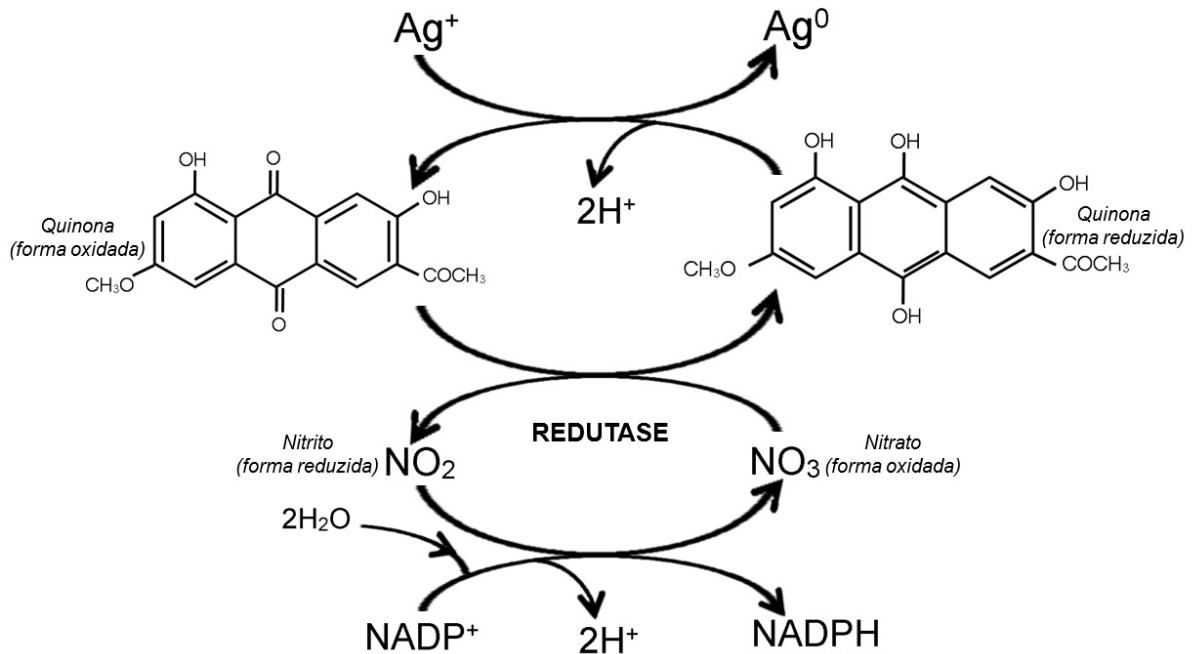


Figura 06 – Mecanismo hipotético de biossíntese de nanopartículas de prata. Análises do sobrenadante fúngico por cromatografia de camada delgada e espectro de fluorescência indicam a presença de antraquinona, e a presença de nitrato redutase foi indicada por reação do nitrito com o reagente 2,3 diaminonaftaleno. Diante disso, sugere-se que a redução dos íons de prata e subsequente formação de nanopartículas ocorrem devido a ação conjunta da enzima nitrato redutase e quinona transportadora de elétron.

Fonte: Duran et al. (2005)

Apesar de NP de prata e OEO terem sido testados em combinações com outros antimicrobianos, não há dados na literatura sobre a combinação de ambos, portanto este estudo teve como objetivo principal testar essa associação contra cepas bacterianas de referências e isolados clínicos multirresistentes. A combinação é uma maneira de minimizar alguns fatores negativos do OEO, tais como fortes aroma e sabor, e da NP de prata, como evolução de resistência. Embora as NP de prata apresentem excelente atividade antimicrobiana, a resistência a esses nanometais tem sido descrita (GRAVES et al., 2015; LOSASSO et al., 2014); contudo a associação contendo prata em nanoescala combinada a óleo de orégano possivelmente minimiza a seleção dessas cepas resistentes. O OEO, por

sua vez, também apresenta potente ação antimicrobiana, apesar de seu odor e sabor limitarem sua aplicação (ALVAREZ et al., 2014; BURT, 2004); mas a combinação apresentada neste trabalho minimiza os efeitos organolépticos indesejáveis deste óleo, desde que interações sinérgicas e aditivas reduzem a concentração necessária de cada composto antimicrobiano.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S.; SENTHILKUMAR, R.; ARJUNAN, S. Isolation and molecular characterization of microorganisms producing novel antibiotics from soil sample. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 5, p. 149–155, 2014.

ADHAM, A. N. Comparative Antimicrobial Activity of Peel and Juice Extract of Citrus Fruits Growing in Kurdistan/Iraq. **American Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 5, p. 155–159, 2015.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. **Surgical infections**, v. 10, n. 3, p. 289–292, 2009.

ALVAREZ, M. V. et al. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 699, p. 1–7, 2014.

ALZOHAIRY, M. A. et al. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 101–109, 2015.

AMROUNI, S. et al. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. **Phytothérapie**, v. 12, n. 5, p. 309–313, 2014.

ANSARI, M. A. et al. Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 688–699, 2014.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Cartilha sobre nanotecnologia**. 2011. Disponível em: < <http://www.abdi.com.br/Estudo/Cartilha%20nanotecnologia.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Orientações gerais para a implantação da sub-rede analítica de resistência microbiana em serviços de saúde**. 2015. Disponível em: < http://acen.saude.sc.gov.br/arquivos/NT_02-2015.pdf>. Acesso em : 27 dez. 2015.

ALMEIDA, R. B. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp.. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 474–481, 2013.

AYALA-NÚÑEZ, N. V. et al. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter.

Nanobiotechnology, v. 5, n. 1-4, p. 2–9, 2009.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARROS, J. C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1139–1143, 2009.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.

BEBEAR, C. M.; PEREYRE, S. Mechanisms of Drug Resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, v. 5, n. 3, p. 263–271, 2005.

BETANCOURT, L. et al. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* Genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 21–31, 2012.

BIASI-GARBIN, R. P. et al. Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 1–9, 2015.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162–167, 2003.

BUSATTA, C. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610–616, 2007.

CAILLET, S. et al. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. 499–508, 2009.

CANTAS, L. et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in

medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 96, p. 1–14, 2013.

CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 12, 2013.

CAVASSIN, E. D. et al. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 64, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.

Antibiotic/Antimicrobial resistance. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/>>. Acesso em: 27 dez. 2015.

CERVATO, G. et al. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 453–465, 2000.

CHAFTAR, N. et al. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 2–7, 2015.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809–816, 2005.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; CURRIE, C. R. The natural history of antibiotics. **Current Biology**, v. 19, n. 11, p. 1–8, 2009.

CLEFF, M. B. et al. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704–709, 2008.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Farmácia não é um simples comércio**. 2011. Disponível em: <<http://portal.crfsp.org.br/prescricaofarmaceutica/documentos/orientacoestecnicas/Fasciculo%20II%20-%20MIPs.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Pareceres**. 2015. Disponível em: <<http://www.cremesp.org.br/?siteAcao=Pareceres&dif=s&ficha=1&id=13237&tipo=PARRECER&orgao=Conselho%20Regional%20de%20Medicina%20do%20Estado%20de%20S%EA3o%20Paulo&numero=82003&situacao=&data=22-04-2015>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiololy Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

DA COSTA, A. C. et al. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial

patients. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 B, p. 236–241, 2009.

DANIEL, J. F. S. D. et al. Antimicrobial activity of Brazilian plants of the genera *Leguminosae* and *Mytaceae*, v. 8, n. 28, p. 958–966, 2014.

DHANA VADE, M. J. et al. Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 119–122, 2011.

DAS, B. et al. Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

DE SOUZA, E. L. et al. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 387–393, 2009.

DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 308–311, 2010.

DEL FIO, F. S., FILHO, T. R. M, GRO PPO, F. C. **Resistência bacteriana**. 2000. Disponível em: <
http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=70&fase=imprime>. Acesso em: 13 dez. 2015.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.

DESH PANDE, L. M. et al. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 4, p. 367–372, 2006.

DESPAX, B. et al. Transmission electron microscopy for elucidating the impact of silver-based treatments (ionic silver versus nanosilver-containing coating) on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nanotechnology**, v. 22, n. 17, p. 175101, 2011.

DHANJI, H. et al. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 512–516, 2011.

DHILLON, R. H. P.; CLARK, J. ESBLs: A clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, 2012.

DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668–2670,

2002.

DOHERTY, V. F. OLARINAN, O. O., KANIFE, U. C. Antimicrobial activity of *Aframomum melegueta* (Alligator Pepper). **International Journal of Biology**, v. 2, n. 2, 2010.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 2010.

DU, W. X. et al. Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. **Journal of Food and Safety**, v. 74, n. 7, p. 390–397, 2009.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 305–311, 2005.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, 2005.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609–1624, 2011.

EL-NOUR, K. M. M. A. et al. Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 135–140, 2010.

ERENO, D. **Prata Biológica**. 2013. Disponível em: <http://issuu.com/pesquisafapesp/docs/_pesquisa_206/68>. Acesso em: 29 dez. 2015.

FALEIRO M.L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 3, n. 3, p. 1143–1156, 2011.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32–53, 2012.

FAYAZ, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 103–109, 2010.

FENG, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 662–668, 2000.

FISCHBACH, M. A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance.

Current Opinion in Microbiology, v. 14, n. 5, p. 519–523, 2011.

FRIENDS OF THE EARTH AUSTRALIA. **To the House of Lords Science and Technology Committee Nanotechnologies and Food inquiry**. 2009. Disponível em: < http://www.centroecologico.org.br/novastecnologias/novastecnologias_1.pdf >. Acesso em: 20 dez. 2015.

FONTES, L. C. et al. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3063–3064, 2011.

FOURNOMITI, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 1–7, 2015.

GADE, A. et al. Mycogenic metal nanoparticles: Progress and applications. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 5, p. 593–600, 2010.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. **BioMed Research International**, 2014.

GHOSH, I. N. et al. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4721–4731, 2013.

GILLING, D. H. et al. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 5, p. 1149–1163, 2014.

GOVENDER, T. et al. Antimicrobial properties of the skin secretions of frogs. **South African Journal of Science**, v. 108, n. 5-6, p. 1–6, 2012.

GRAVES, J. L. et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 42, p. 1–13, 2015.

GUAZZELLI, MARIA JOSÉ; PEREZ, J. **Nanotecnologia - A manipulação do invisível**. 2009. Disponível em: < http://www.centroecologico.org.br/novastecnologias/novastecnologias_1.pdf >. Acesso em: 19 dez. 2015.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 946–957, 2014.

HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1–11, 2007.

- JÁCOME, P. RE. L. D. A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.
- JAIN, J. et al. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 2009.
- JIA, C. J.; SCHÜTH, F. Colloidal metal nanoparticles as a component of designed catalyst. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, n. 7, p. 2457–2487, 2011.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.
- KASMAR, A. G.; HOOPER, D. Farmacologia das infecções bacterianas: síntese da parede celular. In: GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica e da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Ed.), 2009. p. 562 – 578.
- KIM, S. H. et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77–85, 2011.
- KOGA, V. L. et al. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 6, p. 479–485, 2015.
- KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1991. 24 p.
- KONG, K.-F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1–36, 2010.
- KUJUMGIEV, A et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.
- LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing Enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.
- LEMIRE, J. A; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–84, 2013.

- LI, P. et al. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 9, p. 1912–1917, 2005.
- LI, Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, n. 18, p. 4591–4602, 2008.
- LI, W. R. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1115–1122, 2010.
- LOK, C. N. et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916–924, 2006.
- LONGHI, C. et al. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. **Medical Mycology Advance**, p. 1–5, 2015.
- LÓPEZ, P. et al. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4348–4356, 2007.
- LOSASSO, C. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 227, p. 1–9, 2014.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.
- MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154–160, 2011.
- MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, n. 1-2, p. 111–117, 2001.
- MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- MENDES, J. Resistência antibiótica no *Staphylococcus aureus*; da investigação básica à prática clínica. **Revista Portuguesa de Medicina Intensiva**, v. 17, n. 1, p. 11–15, 2010.
- MENEGOTTO, F. R.; PICOLLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **RBCA**, v. 39, n. 2, p. 147–150, 2007.
- MICKIENĖ, R., RAGAŽINSKIENĖ, O., BAKUTIS, B. Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* L. and *Zingiber officinale* R. essential oils. **Biologija**, v. 57, n. 2, p. 92–97,

2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica N°349/2013**. 2013. Disponível em: < <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/17/Sulfadiazina-de-prata.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

MIRIAGOU, V. et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1297–1300, 2003.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

MOORE-NEIBEL, K. et al. Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, 0. 485–492, 2011.

MUN, S.-H. et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8-9, p. 714–718, 2013.

NAVON-VENEZIA, S. et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3098–3101, 2006.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, GORDON M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepelletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Apicultural Research**, 2014. (in press)

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191–195, 2004.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177–1183, 2011.

NUÑEZ, L.; D'AQUINO, M. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1255–1260, 2012.

O'NEILL, J. **Antimicrobial resistance**: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014. Disponível em: < <http://amr->

review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf >. Acesso em: 27 dez. 2015.

OLIVA, M. DE LAS M. et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. **Plant Biology**, v. 17, n. 3, p. 758–765, 2015.

OMOLO, M. A. et al. Antimicrobial Properties of Chili Peppers. **Infections diseases & Therapy**, v. 2, n. 4, 2014.

OTERO-GONZALEZ, A. J. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 5, p. 1320–1334, 2010.

PALANISAMY, N. K. et al. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 2, 2014.

PANDEY, B.; KHAN, S.; SINGH, S. A study of antimicrobial activity of some spices. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 643–650, 2014.

PATEL, G.; BONOMO, R. A. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 48, p. 1–17, 2013.

PAVILOVIĆ, D. R. et al. Assessment of polyphenol content, in vitro antioxidant, antimicrobial and toxic potentials of wild growing and cultured rue. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 87, p. 175–181, 2014.

PEI, R. et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. M379–M383, 2009.

PICOLI, S. U.; MARCATO, P. D.; DURÁN, N. Antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles against isolates from Enterobacteriaceae producers of Beta-lactamases (KPC and ESBL). In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed). **Worldwide Research Efforts in the Fighting Against Microbial Pathogens from Basic Research to Technological Developments**. Boca Raton: Brown Walker Press, 2013. p. 272.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 1–7, 2012.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 6, n. 39, 2006.

PRADO, T. et al. Detection of extended-spectrum betalactamase-producing

Klebsiella pneumoniae in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 136–141, 2008.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RAI, M. K. et al. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 841–852, 2012.

REIDY, B. et al. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v. 6, n. 6, p. 2295–2350, 2013.

RICE, L. B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. **Mayo Clin Proc.**, v. 87, n. 2, p. 198–208, 2012.

RIVAS, L. et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 70–78, 2010.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica - Ciências biológicas e da saúde**, v. 14, n. 4, p. 231–235, 2012.

ROSATO, A et al. In vitro synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 28, p. 3289–3295, 2010.

ROSATO, A. et al. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. **Phytomedicine**, v. 14, n. 11, p. 727–732, 2007.

RUBIN, J. E.; EKANAYAKE, S.; CHAMPIKA, F. Carbapenemase- producing organism in food , 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, 2014.

SAGHI, H. et al. Antibacterial effects of *Origanum vulgare* essence against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from selected Hospitals of Tehran , Iran. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2015.

SANKAR, R. et al. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 80–84, 2013.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. 2004.

Disponível em: <

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27902/1/com.tec.99.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803–808, 2007.

GÜNTER, S.; CORAIN, B. **Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities**, v. 2003, n. 17, p. 3081–3098, 2003.

SCOTT, K.; YU, E. H. (Ed.). **Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. 410 p.

SINGH et al. Green silver nanoparticles of *Phyllanthus amarus*: as an antibacterial agent against multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 40, 2014.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015.

SHANKAR, S. S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 6, p. 1627–1631, 2003.

SI, H. et al. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 190–194, 2008.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136–141, 2010.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 833 p.

SIPOS, P. et al. Special wound healing methods used in ancient egypt and the mythological background. **World journal of surgery**, v. 28, n. 2, p. 211–6, 2004.

SOIL ASSOCIATION. **Food and drink**. 2013. Disponível em: < <http://www.soilassociation.org/LinkClick.aspx?fileticket=4IKnBZAUtQs%3D&> >. Acesso em: 19 dez. 2015.

SOKOVIĆ, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. **Global Science Books**, v. 1, p. 220 – 226, 2007.

STEPANOVIĆ, S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological research**, v. 158, n. 4, p.

353–357, 2003.

STOJKOVIĆ, D. et al. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. **Archives of Biological Sciences**, v. 65, n. 2, p. 639–644, 2013.

SUBASHINI, J.; KHANNA, G. V.; KANNABIRAN, K. Anti-ESBL activity of silver nanoparticles biosynthesized using soil *Streptomyces* species. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 6, p. 999–1006, 2014.

SUZUKI, É. Y. et al. Essential oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: An alternative against microorganisms responsible for bad perspiration odor. **Journal of Young Pharmacists**, v. 7, n. 1, p. 12–20, 2015.

THE NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE/NANOTECHNOLOGY. **Research and development leading to a revolution in Technology and industry**, 2011.

Disponível em:

<https://www.whitehouse.gov/sites/default/files/microsites/ostp/nni_2011_budget_supplement.pdf>. Acesso em : 27 dez. 2015.

TINCU, J.; TAYLOR, S. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3645–3654, 2004.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542–545, 2009.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: An overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95–103, 2011.

UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. **BioMed Research International**, 2014.

VAZIRIAN, M. et al. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) essential oil against food-borne pathogens added to cream-filled cakes and pastries. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 579–582, 2012.

VIMALANATHAN, S. et al. Anti-Influenza virus activities of commercial oregano oils and their carriers. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 02, n. 07, p. 214–218, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

XIU, Z. et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles.

Nano letters, v. 12, n. 8, p. 4271–4275, 2012.

ZAIDI, S.; DAHIYA, P. In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*.

International Food Research Journal, v. 22, n. 6, p. 2420–2445, 2015.

ZHOU, F. et al. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium.

Journal of Food Safety, v. 27, p. 124–133, 2007.

ZUMLA, A.; LULAT, A. Honey-a remedy rediscovered. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 82, n. 7, p. 384–385, 1989.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO

Os resultados e discussão, juntamente com a metodologia necessária ao desenvolvimento deste trabalho de mestrado, foram apresentados na forma de artigo, seguindo as normas de formatação da revista *Frontiers in Microbiology* para qual foi submetido (com modificações para se adequar ao presente manuscrito).

ARTIGO

Efeito sinérgico de óleo essencial de orégano e nanopartículas de prata biológicas contra cepas bacterianas multirresistentes

Sara Scandorieiro¹, Renata Katsuko Takayama Kobayashi^{1,*}

¹ Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

***Autor correspondente:** Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Rodovia Celso Garcia Cid – Pr 445 Km 380, s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil. (kobayashirkt@uel.br)

Resumo

Resistência bacteriana a antimicrobianos convencionais é um problema clínico e de saúde pública que desafia as decisões terapêuticas em controle de infecções. Compostos derivados de plantas e diversas nanopartículas estão sendo propostos como potenciais alternativas antimicrobianas. Estudos anteriores mostram que tanto óleo essencial de orégano (OEO), extraído da planta *Origanum vulgare*, quanto nanopartículas de prata apresentam atividade antibacteriana, inclusive contra cepas de bactérias multirresistentes. No entanto, as acentuadas características organolépticas do óleo de orégano e o desenvolvimento de resistência à prata podem limitar a aplicação desses compostos como agentes antimicrobianos. Com objetivo de minimizar os fatores de limitação já descritos, este estudo avaliou a atividade antibacteriana de OEO combinado a nanopartículas de prata, sintetizadas biologicamente (bio-AgNP) por *Fusarium oxysporum*, contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo cepas multirresistentes. OEO e bio-AgNP, quando usados individualmente, apresentaram atividade bactericida contra todas as cepas testadas, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) que vão de 0,298 a 1,193 mg/mL e de 62,5 a 250 µM, respectivamente. As curvas de crescimento e morte bacterianas indicaram que o OEO tem ação rápida (0,17 h; ou seja, 10 min), enquanto que as nanopartículas de prata agem em 4 h para bactéria Gram negativa e 24 h para Gram positiva. A combinação dos dois compostos resultou em interação sinérgica ou aditiva (dependendo da cepa testada), reduzindo os valores de CIM de ambos antibacterianos e o tempo de ação comparado ao tratamento com bio-AgNP individualmente, sendo pelo menos 0,33 h (20 min) para bactéria Gram negativa e 7 h para Gram positiva. A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou alterações morfológicas similares nas células de *Staphylococcus aureus* expostas a três tratamentos diferentes (OEO, bio-AgNP e combinação de ambos), mostrando protuberâncias na superfície celular. Ainda por MEV, observou-se que todos tratamentos reduziram a densidade celular e a quantidade de matriz exopolissacarídica bacteriana em comparação à amostra de bactéria não tratada. OEO e bio-AgNP apresentaram baixa atividade hemolítica, principalmente nos valores de CIM. Este estudo descreve, pela primeira vez, atividade antimicrobiana sinérgica e aditiva entre OEO e bio-AgNP produzidas por *F. oxysporum*, frente a bactérias multirresistentes, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos. Esses resultados sugerem que a combinação estudada pode ser uma alternativa no controle de infecções com pouca ou nenhuma opção tratamento, além de possivelmente minimizar a seleção de cepas resistentes.

Palavras-chave: óleo de orégano, nanopartículas de prata biológicas, bactéria multirresistente, sinergismo, antibacteriano.

1 Introdução

Resistência bacteriana à maioria dos antimicrobianos convencionais é um problema clínico e de saúde pública. Infecções por microrganismos multirresistentes têm causado grande preocupação, tais como bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL, *Extended Spectrum Beta-lactamase*) e carbapenemases, por exemplo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), ou ainda *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). A dificuldade no controle de infecções bacterianas pode implicar altos custos com tratamento, falhas terapêuticas e óbitos em casos mais graves (Silva e Lincopan, 2012; Cantas et al., 2013).

As enzimas ESBL e KPC hidrolisam o anel betalactâmico e conseqüentemente inativam o antimicrobiano (Queenan e Bush, 2007; Drawz e Bonomo, 2010). ESBLs são capazes de inativar a maioria dos betalactâmicos, e estão presentes principalmente em bactérias Gram negativas (Dhillon e Clark, 2012; Silva e Lincopan, 2012). Os carbapenêmicos, tais como imipenem, meropenem e ertapenem, são a classe de primeira escolha para tratar infecções por cepas produtoras de ESBL. No entanto, carbapenemases reduzem as opções de tratamento porque inativam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Queenan e Bush, 2007).

As enzimas ESBL e KPC são codificadas por genes presentes em plasmídeo que também carregam genes de resistência a antimicrobianos não betalactâmicos; portanto, este mecanismo de resistência mediado por elementos genéticos móveis contribui para a emergência de multirresistência e facilita a disseminação da mesma entre diferentes cepas e gêneros bacterianos (Pitout, 2012; Silva e Lincopan, 2012; Patel e Bonomo, 2013; Shaikh et al., 2015). Cepas de bactérias produtoras de ESBL e KPC geralmente exibem resistência a quinolonas, tetraciclina, cotrimoxazol, trimetoprima e aminoglicosídeos (Dhillon e Clark, 2012; Pitout, 2012; Patel e Bonomo, 2013).

Em bactérias Gram positivas, o mecanismo de resistência mais comum a betalactâmicos é mediado por transpeptidases alteradas; ou seja, por uma mutação em um gene codificador de transpeptidase. Em *S. aureus*, a resistência à meticilina ocorre devido ao gene *mecA* que codifica uma transpeptidase com baixa afinidade pelo betalactâmico (Rice, 2012). Além do gene *mecA*, cepas de MRSA podem apresentar genes de resistência a antimicrobianos não betalactâmicos, comprometendo as opções de tratamento (Turlej; Hryniewicz; Empel, 2011).

Bactérias multirresistentes têm sido encontradas em alimentos para consumo humano, rios urbanos e efluentes tratados; portanto, são um problema hospitalar, comunitário e ambiental (Prado et al., 2007; Fontes et al., 2011; Silva e Lincopan, 2012; Rubin et al., 2014; Koga et al., 2015). Logo que novos betalactâmicos são amplamente utilizados, novas betalactamases também são descobertas (Bush, 2010; Kong; Schneper; Mathee, 2010; Shaikh et al., 2015). Portanto, são extremamente necessários a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibacterianos com potencial para inibir cepas resistentes e minimizar a evolução de resistência.

Compostos provenientes de fontes naturais como animais, plantas e microrganismos têm sido propostos como potenciais antimicrobianos alternativos (Mandal e Mandal, 2011; Cardozo et al. 2013; Biasi-Garbin et al., 2015). Os óleos essenciais de especiarias se destacam pela atividade antimicrobiana (Burt, 2004; Du et al, 2009; Betancourt et al., 2012; Nazzaro et al., 2013). Os compostos fenólicos desses óleos são os principais responsáveis pela

propriedade antibiótica (Rhayour et al., 2003; Burt, 2004; Nostro et al., 2007).

Estudos sobre mecanismos antibacterianos de óleos essenciais vegetais sugerem que compostos bioativos lipofílicos interagem com a membrana celular, ocasionando aumento de permeabilidade da célula, interferência na síntese de ATP e de proteínas, distúrbio no pH bacteriano e inibição de *quorum sensing* (Helander et al., 1998; Ultee et al., 1999; Lambert et al., 2001; Rhayour et al., 2003; Souza et al., 2010; Szabó et al., 2010; Souza et al., 2013).

Óleo essencial de orégano (OEO), extraído principalmente de folhas da erva *Origanum vulgare* por métodos ecologicamente adequados, tem sido relatado como antibacteriano de amplo espectro (Burt, 2004; Busatta et al., 2007; Betancourt et al., 2012). Outras atividades biológicas para o OEO também têm sido descritas, tais como, antifúngica, antiviral, antioxidante e anticancerígena (Cervato et al., 2000; Kalemba e Kunicka, 2003; Gautam et al., 2014; Gilling et al., 2014; Sobral et al., 2014).

A atividade antimicrobiana do OEO varia de acordo com as concentrações de seus principais componentes, os terpenoides carvacrol e timol (Nostro et al., 2004; Cleff et al., 2008; Stojković et al., 2013). Interações sinérgica e aditiva entre carvacrol e timol têm sido reportadas (Bassolé; Juliani, 2012); além disso, a mistura de componentes com atividade antimicrobiana desse óleo essencial, possivelmente minimiza a seleção de cepas bacterianas resistentes. Estudos mostram que o OEO tem potencial para prevenir contaminação de alimentos e controlar o crescimento de bactérias responsáveis por infecções hospitalares graves (Nostro et al., 2004; Si et al., 2008; Barros et al., 2009; Amrouni et al., 2014). Apesar do potencial antibacteriano do OEO, o aroma e sabor intensos limitam sua aplicação; diante disso, estratégias são necessárias para minimizar ou eliminar essas características organolépticas indesejáveis (Burt, 2004; Alvarez et al., 2014).

A prata tem sido utilizada há milênios para o tratamento de feridas e conservação de alimentos e água, sendo que há séculos é aplicada na prevenção de oftalmia neonatal infecciosa (Alexander, 2009). Nanopartículas de prata vem sendo intensivamente estudadas como agentes antimicrobianos, até frente a bactérias multirresistentes (Li et al., 2010; Cardozo et al., 2013; Naqvi et al., 2013; Ansari et al., 2014; Palanisamy et al., 2014; Singh et al., 2014; Subashini et al., 2014). A nanotecnologia permite retomar o uso antimicrobiano da prata, porém em baixas concentrações. Nanopartículas metálicas apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas alteradas em comparação ao metal convencional, pois a nanoescala melhora a atividade antibacteriana já que a grande área superficial deixa a partícula mais reativa (Nowack et al., 2011; Rai et al., 2012; Herman e Herman, 2014). Além disso, já é descrita a menor toxicidade de nanopartículas de prata em comparação à prata iônica para o hospedeiro suscetível à infecção bacteriana (Lima et al., 2012).

O mecanismo bactericida de nanopartículas de prata não está totalmente esclarecido; no entanto, múltiplos alvos bacterianos são sugeridos (Herman; Herman, 2014). Estudos indicam que nanopartículas de prata aumentam a permeabilidade da membrana celular ou até causam desintegração dessa estrutura, inativam enzimas bacterianas por interação com grupos tiol, depletam os níveis de ATP intracelular, causam dano ao DNA e induzem formação de espécies reativas de oxigênio (Feng et al., 2000; Dibrov et al., 2002; Lok et al., 2006; Li et al., 2010; Kim et al., 2011).

Embora as nanopartículas de prata apresentem excelente atividade antibacteriana, a resistência à prata já é bem descrita e além disso, estudos de evolução experimental mostram que os microrganismos podem desenvolver rapidamente resistência à prata nanoparticulada

por alterações genéticas diversas (Losasso et al., 2014; Graves et al., 2015).

A combinação de antimicrobianos é uma estratégia promissora para controlar a emergência de microrganismos resistentes a antibióticos (Fischbach, 2011; Bass et al., 2015; Bollenbach, 2015). Muitos estudos mostram efeito antibacteriano sinérgico e aditivo de nanopartículas de prata combinada a outros antibacterianos alternativos (eugenol, fenazina-1-carboxamida e cinamaldeído) e convencionais (ampicilina, canamicina, eritromicina, cloranfenicol e amoxicilina) (Li et al., 2005; Fayaz et al., 2010; Cardozo et al., 2013; Ghosh et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015). Efeito antimicrobiano sinérgico e aditivo tem sido reportado para o OEO ou seus principais componentes combinados a eugenol, linalol, mentol, cinamaldeído, óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), gentamicina, polimixina, canamicina, levofloxacina e outros antibacterianos (Rosato et al., 2007; Si et al., 2008; Souza et al., 2009; Bassolé e Juliani, 2012; Stojković et al., 2012).

Os estudos estão voltados para a produção biológica de nanopartículas de prata, buscando métodos rápidos, de baixo custo e ecologicamente adequados. Os processos de biossíntese de nanopartículas metálicas substituem os reagentes químicos por fungos, bactérias, plantas e outros organismos ou biomoléculas (Sastry et al., 2003; Durán et al., 2005; Durán et al., 2011; Sankar et al., 2013; Singh et al., 2014). Este estudo avaliou, pela primeira vez, a atividade antibacteriana de OEO combinado a nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP), sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*, frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo cepas multirresistentes.

2 Material e métodos

2.1 Cepas bacterianas

Todos ensaios de atividade antibacteriana foram realizados frente a cepas bacterianas de referência (ATCC, *American Type Culture Collection*), doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), e isolados bacterianos clínicos (Tabela 01) fornecidos pelo Hospital Universitário de Londrina (HU, Londrina, Paraná, Brasil). Todas as amostras microbianas testadas estão depositadas na coleção do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina (Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas).

As cepas bacterianas de referência utilizadas foram as seguintes: *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076, *S. enterica* sorovar Typhimurium UK-1 (ATCC 68169) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) N315 fornecida pela Dra. Elza Masae Mamizuka (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

E as cepas clínicas utilizadas foram as descritas a seguir: seis isolados de *E. coli* de infecção do trato urinário, sendo quatro produtores de betalactamase de espectro estendido (ESBL, *Extended Spectrum Betalactamase*) e dois produtores de *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) (todos fornecidos pela Dra. Eliana Carolina Vespero do HU de Londrina), um isolado de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos coletado por *swab* inguinal e retal (fornecido pela Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni do Hospital das Clínicas de Londrina) e dois isolados de MRSA coletados de secreção de descargas gerais (fornecidos pela Dra. Marcia Regina Eches Perugini do HU de Londrina). As amostras

bacterianas foram estocadas a - 80°C, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) contendo 25% (v/v) de glicerol (Merck).

2.2 Agentes antimicrobianos

2.2.1 Óleo essencial de *Origanum vulgare* – orégano (OEO)

O OEO foi obtido comercialmente da empresa Ferquima Ind. e Com. Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Esse OEO (lote 224) foi extraído por destilação a vapor e sua densidade (0,954 g/mL) e composição (principais componentes: 71% de carvacrol, 3% de timol, 4,5% de gama-terpineno, 3,5% de para-cimeno e 4% de beta-cariofileno) foram descritas em um relatório técnico disponibilizado pelo fornecedor comercial. Foi preparada uma solução estoque de OEO a 50% (v/v) em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). A maior concentração de DMSO utilizada nos ensaios foi de 1% (v/v).

2.2.2 Nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP)

A biossíntese de nanopartículas foi realizada de acordo com a metodologia de Duran et al. (2005), que está depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (Pedido de registro de patente, 2006, PI 0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). Bio-AgNP foram obtidas após redução de prata iônica pelo *Fusarium oxysporum*, cepa 551, procedente da coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil). Brevemente, o fungo *F. oxysporum* foi cultivado em meio solidificado contendo 0,5% (m/v) de extrato de levedura (Neogen), 2% (m/v) de extrato de malte (Neogen) e 2% (m/v) de ágar (Neogen) em água destilada, a 28°C por 7 dias. Após o crescimento, 10 g de biomassa fúngica foram adicionados à 100 mL de água destilada esterilizada, e posteriormente foram incubados a 28°C por 72 h. Em seguida, os componentes da solução foram separados por filtração. Foi adicionado AgNO₃ (Nuclear) a 1 mM à solução livre de células fúngicas, e o sistema foi incubado por pelo menos 28 horas sob ausência de luz. Periodicamente, alíquotas do sistema eram removidas para mensurar absorção por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) (Varian Cary 50 Probe), e consequentemente acompanhar a formação de nanopartículas de prata que apresentaram banda de ressonância plasmônica a 440 nm. As nanopartículas foram centrifugadas (15.000 rpm, 30 min, 4°C), ressuspensas com volume idêntico ao inicial de água destilada e submetidas a sonicação (30 min); a centrifugação e sonicação foram repetidas por três vezes, intercalando ambos procedimentos. Finalmente, as bio-AgNP foram caracterizadas, sendo que o diâmetro foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern), e a medida do potencial zeta foi realizada utilizando o mesmo instrumento.

2.3 Atividade antibacteriana de OEO e bio-AgNP separadamente

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M07-A9 publicado por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), com modificações necessárias. As faixas de concentrações testadas de OEO e bio-AgNP foram de 0,075 a 9,540 mg/mL e de 1,91 a 500 µM, respectivamente. Caldo Mueller-Hinton (MH, Difco), MH contendo apenas OEO e MH contendo apenas bio-AgNP foram testados como controles de esterilidade; bactéria inoculada em apenas MH e em MH contendo 1% de DMSO foram testadas como controles de viabilidade e crescimento celular. Após 24 h de incubação a 37°C, a CIM foi definida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano visível. A

concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada por subcultivo de 10 µL da CIM e concentrações superiores em ágar MH (Oxoid) desprovido de agente antimicrobiano adicionado. A CBM foi definida como a menor concentração que elimina $\geq 99,9\%$ das células bacterianas após 24 h de tratamento com o antibacteriano (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCLLS, 1999). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e no mínimo em três ocasiões diferentes.

2.4 Ensaio de combinação dos antibacterianos

A interação do OEO e bio-AgNP foi determinada por microdiluição em caldo, utilizando duplo gradiente de concentração (um gradiente para cada antibacteriano testado), conforme a metodologia descrita por Traub e Kleber (1975), porém com modificações necessárias. Amostras bacterianas com densidade de 5×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foram incubadas, a 37°C por 24 h, em MH caldo com ambos antibacterianos em combinação. Controles de esterilidade e viabilidade celular foram realizados conforme descrito acima para o ensaio de atividade antibacteriana dos compostos separadamente. A CIM considerada foi a menor concentração de ambos compostos que não apresentou turbidez referente a crescimento bacteriano.

A interação de OEO combinado a bio-AgNP foi analisada pelo índice de concentração inibitória fracionada (FICI, *Fractional Inhibitory Concentration Index*), de acordo com Chin e Weitzman (1997), utilizando a seguinte equação: $FICI = FIC_{OEO} + FIC_{bio-AgNP}$. A concentração fracionada inibitória (FIC) de cada composto é determinada pela razão entre CIM do antibacteriano quando utilizado sozinho e CIM do mesmo quando utilizado em combinação ($FIC = CIM_{combinação}/CIM_{individual}$). A FICI é interpretada como “interação sinérgica” quando $\leq 0,5$; “interação aditiva” quando $> 0,5$ e ≤ 1 ; “indiferente (sem interação)” quando > 1 e < 4 e como “interação antagonista” quando ≥ 4 . Todos os ensaios foram realizados em triplicata, no mínimo em três ocasiões diferentes e contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo cepas multirresistentes.

2.5 Curva de crescimento e morte bacteriana

O ensaio de cinética de população bacteriana foi realizado pelo método de contagem de células viáveis, de acordo com o documento M-26A publicado por NCCLS (1999), atual CLSI, com modificações necessárias. Três condições de tratamentos foram avaliadas, (1) bactérias tratadas com OEO, (2) bio-AgNP e (3) combinação de ambos agentes antibacterianos; e como controle de crescimento e viabilidade celular foi utilizada amostra bacteriana sem tratamento. As quatro amostras (tratadas e não tratadas) foram incubadas à 37°C por 24 h. Porém em dez tempos de tratamento/incubação (0 h; 0,008 h; 0,17 h; 0,33 h; 0,5 h; 2 h; 4 h; 7 h; 10 h e 24 h), alíquotas de 10 µL das culturas tratadas e não tratadas foram transferidas para ágar MH para quantificar as células viáveis (UFC/mL).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e no mínimo em duas ocasiões diferentes, com três cepas bacterianas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* 131 produtora de carbapenemase). Os tratamentos individuais, com óleo de orégano e nanopartículas de prata separadamente, foram realizados com valores de CIM, e para a combinação foram utilizadas as concentrações do sinergismo ou aditismo. Para *S. aureus*, os tratamentos foram realizados com OEO a 0,596 mg/mL, bio-AgNP a 250 µM e combinação de ambos (OEO a 0,298 mg/mL e bio-AgNP a 125 µM). *E. coli* ATCC 25922 foi tratada com OEO a 0,596 mg/mL, bio-AgNP a 62,5 µM e combinação contendo 0,298 mg/mL e 15,62 µM de ambos antibacterianos respectivamente. *E. coli* 131 resistente a carbapenêmicos recebeu

tratamento de OEO a 0,596 mg/mL, bio-AgNP a 125 μ M e ambos compostos combinados, porém com concentrações de 0,075 mg/mL e 31,25 μ M respectivamente.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostra de *S. aureus* ATCC 25923 com densidade celular de 10^9 UFC/mL foi preparada em caldo MH e subdividida em cinco tubos (5 mL de cultura bacteriana por tubo). A bactéria foi exposta a três tratamentos diferentes; OEO a 0,594 mg/mL (1° tubo), bio-AgNP a 250 μ M (2° tubo) e combinação de ambos compostos, OEO a 0,297 mg/mL e bio-AgNP a 125 μ M (3° tubo). O tempo de tratamento foi diferente para cada situação, foram realizadas incubações a 37° por 0,5 h (30 min) para o OEO, e 6 h para bio-AgNP individualmente e combinação de ambos agentes antimicrobianos. Foram preparados dois controles bacterianos não tratados, um com 0,5 h (30 min) de incubação (4° tubo) e outro com 6 h (5° tubo). Após os tempos de incubação e tratamento, 20 μ L de cada uma das cinco amostras bacterianas foram transferidos para lamínulas de vidro revestidas previamente com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Cada amostra, já presente na lamínula, foi fixada (por 20 h) por imersão em 1 mL de tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído. Foi realizada uma pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio (por 2 h). Todos os reagentes utilizados nas fixações foram fornecidos por *Electron Microscopy Sciences*. As células (tratadas e não tratadas), após fixadas, foram desidratadas em gradiente de etanol (Sigma-Aldrich) (70, 80, 90 e 100°GL), secas pelo método do ponto crítico usando CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas com auxílio de MEV (FEI quanta 200) para analisar topograficamente alterações morfológicas celulares.

2.7 Ensaios de toxicidade a eritrócitos humanos e células HEp-2

A atividade hemolítica do OEO e bio-AgNP foi determinada de acordo com Izumi et al. (2012), com modificações necessárias. O sangue humano foi coletado, em tubos heparinizados (Vacutainer), de doador voluntário saudável, e com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CAAE 47661115.0.0000.5231, No. 1.268.019 – UEL). Os eritrócitos foram separados por centrifugação (5000 rpm, 4°C, 5 min). Uma suspensão dessas células a 6% (v/v) foi preparada em tampão fosfato-salino (PBS, *phosphate buffered saline*), contendo 0,9 % (m/v) de cloreto de sódio (Merck), 0,2 M de fosfato de sódio monobásico (Chemco) e 0,2 M de fosfato de sódio bibásico (Nuclear). Em placa de polietileno 96 poços, 100 μ L de eritrócitos a 6% foram adicionados a 100 μ L de PBS contendo diferentes concentrações dos agentes antibacterianos individualmente. Após 3 h de incubação à 37°C, foi realizada leitura dos sobrenadantes em espectrofotômetro (550 nm) para monitorar a liberação de hemoglobina. Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 1% foi utilizado como controle, indicando 100% de atividade hemolítica; e com base nesse controle positivo, foi calculada a porcentagem de hemólise para cada concentração testada de cada composto.

A toxicidade dos antimicrobianos OEO e bio-AgNP a células derivadas de carcinoma epitelial de laringe humana (HEp-2), foi realizada por método colorimétrico, utilizando brometo de dimetiliazol difenil tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich), em placa de 96 poços, de acordo com as recomendações do fabricante. Células HEp-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) à 37°C em estufa de atmosfera com 5% de CO₂, para formação de monocamada celular. Células não aderidas foram removidas utilizando PBS e as confluentes foram novamente incubadas em RPMI suplementado com diferentes concentrações de ambos os compostos individualmente, por 24 h, à 37°C e sob atmosfera contendo 5% de CO₂. Após incubação, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado com 100 μ L de PBS. A

solução de MTT (10 μL a 1,250 g/mL por poço) foi adicionada aos poços, e a placa foi incubada por 2 h nas mesmas condições anteriores. Solução solvente (Sigma-Aldrich), contendo 10% de Triton X-100 em isopropanol ácido (HCl 0,1N), foi adicionada a cada poço (90 μL por poço) para dissolver os cristais azuis de formazan. Após 15 min de homogeneização, realizou-se leitura da placa a 570 nm. Células HEp-2 não tratadas foram utilizadas como controle, indicando 100% de viabilidade celular; e com base nesse controle, foi calculada a porcentagem de células viáveis para cada concentração de composto antibacteriano.

Em ambos ensaios de citotoxicidade, as faixas de concentrações testadas foram de 0,075 a 9,540 mg/mL (OEO) e de 1,95 a 250 μM (bio-AgNP). A concentração citotóxica (CC_{50}) dos antibacterianos foi definida como concentração necessária para reduzir a viabilidade de 50% das células, em comparação ao controle não tratado. O valor de CC_{50} de cada composto foi determinado, por regressão linear, para os dois tipos celulares (eritrócitos e HEp-2).

2.8 Análise estatística

Os resultados de CIM e de cinética bacteriana foram analisados utilizando os testes de Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas com auxílio do *software* R, versão 3.1.0 (*Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 Resultados

3.1 Caracterização das nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP)

As nanopartículas de prata apresentaram diâmetro médio de 77,68 nm. O potencial zeta foi de -34,6 mV, indicando boa estabilização da suspensão metálica.

3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e interação entre OEO e bio-AgNP

O óleo essencial de orégano (OEO) e as bio-AgNP inibiram o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas, incluindo as multirresistentes (Tabela 02). O valor médio de CIM para o OEO foi $0,526 \pm 0,130$ mg/mL, e o valor médio de concentração bactericida mínima (CBM) foi $0,500 \pm 0,158$ mg/mL; a faixa tanto de CIM como de CBM foi de 0,298 a 1,193 mg/mL (Tabela 02). O valor médio de CIM para bio-AgNP foi $129,17 \pm 55,25$ μM , com faixa de valores variando de 62,5 a 250 μM ; e o valor médio de CBM foi $154,17 \pm 110,46$ μM , variando de 62,5 a 500 μM (Tabela 02).

Com relação ao valor médio de CIM para ambos os compostos antibacterianos, não houve diferença estatística significativa entre cepas bacterianas de referência e cepas multirresistentes ($p > 0,05$). Com relação à sensibilidade ao OEO, não foi encontrada diferença entre bactérias Gram positivas e Gram negativas ($p > 0,05$), pois não houve diferença estatística no valor médio de CIM para ambos grupos bacterianos. Bio-AgNP mostrou melhor atividade frente a bactérias Gram negativas ($p < 0,05$), com $125 \pm 56,53$ μM como valor médio de CIM; sendo que para Gram positivas esse valor foi de $225 \pm 55,90$ μM .

A combinação reduziu significativamente ($p < 0,05$) o valor de CIM de ambos compostos, OEO e bio-AgNP, em comparação aos tratamentos individuais. Devido a interações sinérgicas e aditivas entre os antibacterianos, os valores de CIM reduziram em média 83,3% e 66,4% para OEO e bio-AgNP, respectivamente (Tabelas 02 e 03).

3.3 Curva de crescimento e morte bacteriana

Os controles bacterianos não tratados mostraram que as células microbianas estavam viáveis, havendo crescimento populacional com o decorrer do tempo de incubação; portanto, a redução de densidade celular das amostras que receberam tratamento, com OEO, bio-AgNP ou combinação de ambos, é devida a ação antimicrobiana dos compostos.

O OEO reduziu rapidamente a densidade celular das populações bacterianas tratadas. Após 0,17 h (10 min) de tratamento com CIM (0,596 mg/mL), houve total eliminação de células viáveis ($p < 0,05$) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 01), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura 02) e *E. coli* 131 resistente a carbapenêmicos (CR) (Figura 03). A inibição bacteriana pelo OEO foi imediata, sendo que em apenas 0,008 h (30 s) de tratamento houve redução de 0,57 log ($p < 0,05$), 1,54 log ($p < 0,05$) e 0,27 log ($p < 0,05$) das populações de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* produtora de carbapenemase respectivamente.

A CIM de bio-AgNP (250 μ M) apresentou atividade bactericida para *S. aureus* ATCC 25923, após 24 h de tratamento (Figura 01). Após 10 h de contato com as nanopartículas de prata, houve redução de 0,57 log ($p < 0,05$) da população de *S. aureus*, e entre 10 e 24 h de houve redução de 4,73 log ($p < 0,05$). Para as bactérias Gram negativas, houve total inibição de crescimento ($p < 0,05$) em apenas 4 h de tratamento com 62,5 μ M e 125 μ M de bio-AgNP, para *E. coli* ATCC 25922 (Figura 02) e *E. coli* 131 CR (Figura 03) respectivamente. Porém, em apenas 2 h de exposição à prata, houve redução significativa ($p < 0,05$) na densidade celular das populações bacterianas Gram negativas, reduzindo 3,3 log (*E. coli* ATCC 25922) e 2,31 log (*E. coli* 131 CR).

A combinação de OEO e bio-AgNP foi mais eficiente que o tratamento individual com bio-AgNP, agindo em menor tempo tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas. A combinação dos dois compostos contendo CIM sinérgica (0,149 mg/mL de OEO e 62,5 μ M de bio-AgNP) mostrou atividade bacteriostática contra *S. aureus* ATCC 25923 (dado não mostrado). No entanto, a combinação contendo CIM aditiva (0,298 mg/mL de OEO e 125 μ M de bio-AgNP), foi bactericida para a mesma cepa bacteriana (Figura 01), resultando em redução de 3,48 log ($p < 0,05$) na densidade celular em apenas 2 h de tratamento e total inibição de viabilidade celular em 7 h ($p < 0,05$).

A combinação aditiva, contendo 0,298 mg/mL de OEO e 15,62 μ M de bio-AgNP, causou redução de 2,3 log ($p < 0,05$) na população bacteriana de *E. coli* ATCC 25922 em apenas 0,17 h (10 min) de tratamento, e houve total inibição de crescimento ($p < 0,05$) em 0,32 h (20 minutos) (Figura 02). A população de *E. coli* 131 CR, quando exposta à combinação sinérgica (OEO a 0,075 mg/mL e bio-AgNP a 31,25 μ M), foi reduzida em 2,7 log ($p < 0,05$) com 0,5 h (30 min) de tratamento, e em 2 h já não havia células viáveis ($p < 0,05$) (Figura 03).

3.4 Microscopia eletrônica (MEV)

A análise utilizando MEV mostrou que as amostras bacterianas controles (não tratadas) (Figuras 04 A e B) apresentaram morfologia e arranjo típicos de *S. aureus*, com células esféricas (coco) agrupadas em cachos. As células não tratadas não apresentaram as alterações observadas nas amostras que receberam tratamento. O procedimento de fixação foi bastante eficiente porque permitiu a preservação, com boa qualidade, da matriz exopolissacarídica (EPS); sendo possível observar, principalmente no controle de 6 h (Figura 04 B), uma

estrutura reticulada com os canais de água típicos de biofilme. A comparação entre os controles de 0,5 h (30 min) (Figura 04 A) e de 6 h (Figura 04 B) mostra que houve um aumento na densidade celular com o decorrer do tempo de incubação, corroborando com o crescimento bacteriano observado no ensaio de cinética de população microbiana.

A amostra de *S. aureus* tratada com OEO (Figura 04 C) apresentou menor densidade celular que o controle de 0,5 h (30 min) (Figura 04 A), corroborando com a curva de crescimento e morte; e não apresentou arranjo típico dessa espécie bacteriana. O tratamento também afetou a deposição de EPS. As células expostas ao óleo de orégano apresentaram alteração morfológica, como protuberâncias na superfície celular, que indicam possível extravasamento de conteúdo citoplasmático (Figura 04 D). No entanto, também foram observadas células em estágio mais avançado de alteração, apresentando deformações e resquícios celulares (Figura 04 C).

A amostra de *S. aureus* exposta a bio-AgNP (Figura 04 E) apresentou menor densidade celular que o controle de 6 h (Figura 04 B), também corroborando com a cinética bacteriana estudada previamente. O tratamento com nanopartículas de prata resultou em redução de deposição de EPS, em comparação ao controle sem tratamento. As células tratadas apresentaram alterações morfológicas semelhantes às encontradas no tratamento com OEO; porém na amostra exposta a bio-AgNP (Figura 04 F), essas alterações são mais sutis, confirmando o maior potencial antibacteriano do óleo de orégano. As protrusões na superfície celular podem indicar dano na cadeia transportadora de elétrons, já que nanopartículas de prata possuem alto potencial de redução e podem interferir facilmente em reações de oxido-redução.

A amostra tratada com a combinação de OEO e bio-AgNP (Figura 04 G) apresentou menor densidade celular que o controle de 6 h (Figura 04 B) e que a amostra tratada com bio-AgNP (Figura 04 E), confirmando o resultado da curva de crescimento e morte. Também houve redução da quantidade de EPS em comparação ao controle. As células expostas à combinação apresentaram protrusões superficiais (Figura 04 H) semelhantes às observadas quando ambos compostos foram aplicados individualmente; também foram observados estágios mais tardios de alteração, apresentando detritos celulares.

Portanto, os dados obtidos pela análise topográfica microscópica confirmaram a atividade antibacteriana dos três tratamentos (OEO, bio-AgNP e combinação de ambos), corroborando com os resultados de inibição de crescimento bacteriano mostrados nos ensaios de microdiluição e de cinética de população.

3.5 Ensaio de toxicidade a eritrócitos e células HEp-2

Os resultados do ensaio de MTT mostraram que o OEO foi tóxico para as células tumorais (HEp-2), pois afetou 50% ou mais das células quando em concentrações superiores a 0,075 mg/mL; sendo que a concentração citotóxica (CC_{50}) ficou entre 0,075 e 0,149 mg/mL (Figura 05 A). No entanto, o OEO foi menos tóxico para eritrócitos, sendo que o valor de CC_{50} foi 7,519 mg/mL (Figura 06 A). O valor de CC_{50} de bio-AgNP foi 97,22 μ M para HEp-2 (Figura 05 B); e foi observada baixa toxicidade para eritrócitos, mesmo considerando a maior concentração testada de nanopartículas de prata (250 μ M) (Figura 06 B).

4 Discussão

Esse estudo mostrou a potente atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano

(OEO), que inibiu o crescimento bacteriano rapidamente e em baixas concentrações, assim como reportado por outros estudos (Burt e Reinders, 2003; Souza et al., 2010; Alvarez et al., 2014; Betancourt et al., 2012). Busatta et al. (2007) relataram que OEO apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 0,23 e 0,46 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* sensível à metilina e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente. A CIM de óleo de orégano relatada por Betancourt et al. (2012) foi de 0,780 mg/mL frente à *Salmonella* spp. e 3,125 mg/mL contra *E. coli*. Os valores de CIM de OEO mostrados em nosso estudo variam de 0,298 a 1,193 mg/mL, e estão de acordo com os resultados apresentados na literatura. Os resultados de nossas análises mostraram que o OEO foi bactericida, em baixa concentração, contra todas as cepas bacterianas multirresistentes testadas; apresentando concentração bactericida mínima (CBM) de 0,298 mg/mL contra *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmico, 0,596 mg/mL frente aos isolados de *E. coli* produtores de ESBL e KPC, e CBM variando de 0,596 a 1,193 mg/mL frente aos dois isolados de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA).

O ensaio de cinética bacteriana mostrou que, em apenas 0,17 h (10 min) de tratamento, o OEO levou à redução de aproximadamente 5 log ($p < 0,05$) das três populações bacterianas testadas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e cepa de *E. coli* produtora de KPC); no entanto, imediatamente (0,008 h; ou seja, 30 s) após a exposição das bactérias ao óleo de orégano, já há inibição do crescimento populacional. Os estudos de Burt e Reinders (2003) mostraram que quando amostra de *E. coli* O157:H7, com densidade de 5×10^5 UFC/mL, foi tratada com 0,06% (v/v) de OEO, não restaram células viáveis em apenas 1 min de tratamento. Em estudo com *S. aureus* isolado de alimento, Barros et al. (2009) mostraram que CIM de OEO (0,06%, v/v) causou redução de 3 log no inóculo inicial (10^8 UFC/mL) após 2 h de tratamento. Em nosso estudo, utilizando inóculo similar (10^8 UFC/mL) e a mesma concentração de óleo de orégano (0,596 mg/mL; que corresponde a 0,06%, v/v), houve total redução de células viáveis em apenas 0,5 h (30 min) ($p < 0,05$), ocorrendo redução de 8 log na população de *S. aureus* ATCC 25923 (dado não mostrado). É provável que essa diferença no tempo de ação do OEO esteja relacionada à variação na composição química dos óleos essenciais, ou ainda devido a possíveis diferenças estruturais ou metabólicas entre as cepas testadas.

Alguns estudos relataram que os compostos terpenoides de OEO são mais ativos contra bactérias Gram positivas (Smith-Palmer et al., 1998; Lambert et al., 2001; Stojković et al., 2013). Nossos resultados indicaram que o OEO tem amplo espectro de ação, atuando contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, assim como relatado em outros estudos (Busatta et al., 2007; Rosato et al. 2010; Stojković et al., 2013). No entanto, nossos dados mostraram que esse antibacteriano é igualmente eficiente de acordo com CIM e tempo de ação para ambos grupos bacterianos ($p > 0,05$), corroborando com relatos de outros pesquisadores (Dorman e Deans, 2000; Rosato et al., 2010). Essa diferença no grau de susceptibilidade das bactérias aos óleos essenciais, pode ser devida à composição química desses óleos; pois fatores sazonais e geográficos contribuem para existir variação na concentração dos componentes bioativos como antibacterianos (Medini et al., 2009).

Vários estudos sugerem que os óleos essenciais interagem com a membrana celular bacteriana, resultando em inibição do crescimento já que essa estrutura é responsável por inúmeras funções em procariotos. O estudo de Bennis et al. (2004) mostrou alterações superficiais, tais como ondulações e rachaduras, em células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com timol. Lambert et al. (2001) sugeriram que o OEO inibe o crescimento bacteriano devido a danos à integridade da membrana celular, afetando consequentemente a homeostase de pH e o equilíbrio de íons inorgânicos citoplasmáticos. Suzuki et al. (2015)

observaram murchamento de células de *Staphylococcus epidermidis* tratadas com produtos contendo OEO, indicando extravazamento de conteúdo citoplasmático. Souza et al. (2010) observaram perda de material absorvente 260 nm e de íons de potássio em células de *S. aureus* tratadas com OEO, e com base nesses resultados os pesquisadores sugeriram que o óleo aumentou a permeabilidade da membrana celular. Nossa análise por MEV confirma a atividade antibacteriana do OEO com a redução na densidade celular e alterações morfológicas superficiais, em comparação ao controle bacteriano não tratado que apresentou alta densidade de células desprovidas de alterações, corroborando com os resultados de cinética bacteriana aos 0,5 h (30 min) de tratamento (dado não mostrado). As células de *S. aureus* ATCC 25923 expostas ao óleo de orégano, apresentaram protuberâncias superficiais, indicando injúrias à superfície celular e provável perda de conteúdo citoplasmático. *S. aureus* ATCC 25923 é uma cepa capaz de formar biofilme *in vitro* (Zmantar et al., 2010), sendo utilizada em vários estudos como controle positivo para formação de matriz exopolissacarídica (ESP). Em nosso estudo, as micrografias do controle incubado por 6 h mostraram a presença de matriz ESP estruturada, com os canais de água bem evidentes, indicando a formação de biofilme. O controle de 0,5 h (30 min) também apresentou material ESP, porém em menor quantidade; mas as células tratadas com OEO mostraram ausência desse material, corroborando com os estudos de Nostro et al. (2007) que relataram a ação antibiofilme do óleo de orégano contra *S. aureus*.

Os resultados dos ensaios de toxicidade a eritrócitos humanos mostraram que a concentração citotóxica (CC₅₀) do OEO foi 7,519 mg/mL. O óleo de orégano apresentou baixa toxicidade para eritrócitos, pois o valor de CC₅₀ ficou bem acima dos valores de CIM que variaram de 0,037 a 1,193 mg/mL. Outros estudos também relataram que OEO e seus componentes são pouco tóxicos para eritrócitos. Mancini et al. (2004) observaram ausência de atividade hemolítica do OEO frente a eritrócitos bovinos, e Cacciatore et al. (2015) relataram que derivados de carvacrol, no valor de CIM, não são hemolíticos para eritrócitos humanos. No entanto, o OEO foi tóxico para células HEp-2, corroborando com outros estudos que descrevem a atividade antitumoral do óleo de orégano e seus componentes isolados, inclusive contra células HEp-2 (Mehdi et al., 2011; Gautam et al., 2014; Sobral et al., 2014).

Devido a sua excelente atividade antibacteriana, o OEO tem potencial para substituir os antibióticos convencionais utilizados na indústria alimentícia, ou ainda é possível incorporá-lo a cosméticos e outros produtos (Alvarez et al., 2014; Suzuki et al., 2015). No entanto, a alta volatilidade e suas características organolépticas indesejáveis (sabor e aroma) podem limitar sua aplicação; deste modo, é necessário o desenvolvimento de estratégias para minimizar tais limitações (Burt, 2004; Alvarez et al., 2014; Hernández-Hernández, 2014).

Nesse estudo, as nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP) exibiram amplo espectro de ação antibacteriana, e esse dado está de acordo com resultados de outros pesquisadores (Busatta et al., 2007; Jain et al., 2009; Kim et al., 2011). No entanto, nossos resultados mostraram que bactérias Gram positivas são mais tolerantes a bio-AgNP, para as quais o valor de CIM é maior e o tempo de ação do composto é mais lento em comparação a bactérias Gram-negativas, assim como reportado em outros estudos (Jain et al., 2009; Dúran et al., 2010; Agnihotri et al., 2014). Kim et al. (2011) observaram que bactérias Gram negativas são mais suscetíveis a nanopartículas de prata em comparação à Gram positivas, por conta da maior atividade bactericida mostrada pela curva de crescimento e morte, grande perda de proteínas através da membrana celular, maior de inativação de lactato desidrogenase e alterações morfológicas celulares mais proeminentes.

Muitos estudos mostraram que a atividade antibacteriana das nanopartículas é

dependente do seu diâmetro, de forma que a atividade aumenta quanto menor o tamanho da partícula (Panacek et al., 2006; Ayala-Nunez et al., 2009; Agnihotri et al., 2014); e este fato contribui para a grande variação nos valores de CIM entre diferentes estudos de atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, limitando as comparações com nossos resultados.

Nossos resultados, obtidos por microscopia eletrônica, mostraram que a amostra de *S. aureus* ATCC 25923 tratada com bio-AgNP apresentou densidade celular reduzida e alterações morfológicas celulares, tais como protruções superficiais, contrastando com o controle de 6 h que apresentou enorme quantidade de células desprovidas de lesões, e confirmando a atividade antibacteriana do composto observada por microdiluição em caldo e cinética de população. Kim et al. (2011) observaram, com auxílio de MEV, que células de *S. aureus* e *E. coli* tratadas com nanopartículas de prata apresentaram protuberâncias em sua superfície (similares às observadas em nosso estudo), e ensaios colorimétricos para detecção de proteínas e outros constituintes celulares mostraram perda de material citoplasmático; esses dados sugerem que o composto à base de prata afeta a permeabilidade da célula bacteriana. Outros estudos relatam que íons de prata possuem afinidade por grupos tiol e possivelmente afetam enzimas respiratórias presentes na membrana plasmática; contudo, a prata participa efetivamente de reações de oxido-redução, o que indica que esse antibacteriano metálico tem potencial para danificar a cadeia transportadora de elétrons (Holt e Bard, 2005; Li et al., 2010). Além disso, nossas análises por MEV mostraram que as células bacterianas tratadas com bio-AgNP não apresentaram matriz ESP, em comparação ao controle não tratado (6 h); e corroborando com esses dados, Alzohairy et al. (2015), utilizando microscopia confocal de varredura à laser, observaram que nanopartículas de prata interferiram na formação de biofilme.

Os resultados do ensaio de toxicidade mostraram que bio-AgNP não foram tóxicas para eritrócitos humanos, mesmo na maior concentração testada (250 μM , que é equivalente a 37,5 $\mu\text{g/mL}$); portanto, não foi possível calcular o valor de CC_{50} de nanopartícula de prata para eritrócitos. A análise dos sobrenadantes, por espectrofotometria, indicou que tratamento com bio-AgNP não resultou em aumento de absorbância, demonstrando que pouca hemoglobina foi liberada das células vermelhas sanguíneas. Choi et al. (2011) observaram que 700 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de prata (de aproximadamente 100 nm) lisaram 50% dos eritrócitos, a CC_{50} é bem acima da maior concentração testada em nosso estudo. De acordo com o critério estabelecido no documento ASTM E2524-08 (2013), porcentagem de hemólise maior que 5% indica dano aos eritrócitos humanos; no entanto, em nosso estudo, a maior concentração testada de bio-AgNP causou apenas 1,4% de hemólise. O ensaio de MTT mostrou que bio-AgNP foram tóxicas para células HEP-2 apenas em altas concentrações ($\text{CC}_{50} = 97,22 \mu\text{M}$), que na maioria das vezes estão acima das concentrações necessárias para inibir o crescimento bacteriano. Alguns estudos relatam a atividade antitumoral de nanopartículas de prata, inclusive contra células HEP-2 (Devi, 2012; Antony et al., 2013), corroborando com nossos dados que mostram maior toxicidade de bio-AgNP para células HEP-2 do que para eritrócitos humanos.

Apesar de bio-AgNP apresentar boa atividade antibacteriana e baixa citotoxicidade, bactérias podem desenvolver resistência a essas nanopartículas por alterações genéticas simples (Graves et al., 2015). Deste modo, são necessários estudos que busquem estratégias para minimizar a possível evolução de resistência à prata.

A combinação de antibacterianos é uma estratégia para controlar a evolução de resistência (Fischbach, 2011; Bollenbach, 2015). Li et al. (2005) observou interação sinérgica de nanopartículas de prata combinadas a amoxicilina contra *E. coli*, e outros estudos relataram

interação sinérgica com outros compostos antibacterianos alternativos, tais como cinamaldeído (Ghosh et al., 2013), eugenol (Biasi-Garbin et al., 2015) e fenazina-1-carboxamida (Cardozo et al., 2013).

Outros estudos relataram interações sinérgica ou aditiva entre OEO e outros antibacterianos, tais como gentamicina contra *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 e *A. baumannii* ATCC 19606 (Rosato et al., 2010), amoxicilina, polimixina e lincomicina contra cepas de *E. coli* produtora de ESBL (Si et al., 2008). OEO também apresentou efeito antibacteriano sinérgico quando combinado a óleo essencial de *Thymus vulgare* (tomilho) (Stojković et al., 2013).

Alguns estudos mostram que, quando isolados, tanto o OEO (Nostro et al., 2004; Si et al., 2008; Amrouni et al., 2014) quanto as nanopartículas de prata (Cardozo et al., 2013; Singh et al., 2014; Subashini et al., 2014) apresentam atividade antibacteriana contra bactérias multirresistentes. No entanto, esse estudo mostrou, pela primeira vez, efeitos sinérgico e aditivo da combinação de OEO e bio-AgNP contra cepas bacterianas, incluindo multirresistentes. Em combinação, ambos compostos apresentaram atividade antibacteriana com concentrações bem abaixo dos níveis considerados tóxicos para células de mamíferos. A redução da CIM necessária de cada antibacteriano favoreceu a minimização dos efeitos organolépticos indesejáveis do OEO, possibilitando ampliar sua aplicação, desde que o aroma e sabores menos intensos aumentam sua aceitação. Além disso, o tratamento combinado inibiu o crescimento bacteriano mais rapidamente do que bio-AgNP utilizadas sozinhas.

Nossos resultados ressaltam a potente ação da combinação de OEO e bio-AgNP contra bactérias Gram negativas, incluindo as cepas produtoras de ESBL e carbapenemases. A combinação dos dois compostos também apresentou atividade contra bactéria Gram positiva, com FICI indicando sinergismo ou aditismo; os resultados de MEV confirmaram a atividade antibacteriana contra esse grupo, mostrando alterações morfológicas superficiais (protuberâncias) em células de *S. aureus* ATCC 25923, além de redução da densidade celular da população bacteriana e diminuição da deposição de matriz EPS que confirmam a atividade bactericida da combinação.

Em conclusão, a combinação de bio-AgNO e OEO apresentou efeito sinérgico ou aditivo contra cepas de bactérias multirresistentes de importância clínica, como *E. coli*, *A. baumannii* e MRSA; portanto, os resultados desse estudo sugerem que essa associação de antibacterianos tem potencial para ser aplicada na indústria (farmacêutica, alimentícia ou de cosméticos) e setores clínicos e hospitalares, pois atua como bactericida para cepas de tratamento limitado e possivelmente previne a seleção de cepas multirresistentes.

Agradecimentos

Esse estudo foi financiado por CNPq BIOTEC 402728/2013-0 e Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. Nos dois anos do mestrado, Sara Scandorieiro recebeu bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Agradecemos ao Dr. Carlos Nozawa por fornecer as células HEp-2, a Dra. Elza Mazaie Mamizuka, Dra. Eliana Carolina Vespero, Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni, Dra. Marcia Regina Eches Perugini que doaram as cepas bacterianas com perfil de resistência; e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina por realizar as micrografias apresentadas nos resultados desse estudo.

Referências

- Agnihotri, S., Mukherji, S., and Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*. 4:8, 3974-3983. doi:10.1039/c3ra44507k.
- Alexander, J. W. (2009). History of the medical use of silver. *Surgical infections*. 10:3, 289–292. doi:10.1089/sur.2008.9941.
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., Bernal-Mercado, A. T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G. A., *et al.* (2014). Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*. 5, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2014.00699.
- Alzohairy, M. A., Ansari, M. A., Cameotra, S. S., Khan, H. M., Khan, A. A. (2015). Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 33, 101–109. doi:10.4103/0255-0857.148402.
- Amrouni, S., Touati, M., Hadeif, Y., and Djahoudi, A. (2014). Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase. *Phytothérapie* 12:5, 309–313. doi: 10.1007/s10298-014-0842-x.
- Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., Saquib, Q., and Musarrat, J. (2014). Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*. 54:7, 688–699. doi:10.1002/jobm.201300748.
- Antony, J. J., Sithika, M. A. A., Joseph, T. A., Suriyakalaa, U., Sankarganesh, A., Siva, D., *et al.* (2013). In vivo antitumor activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Ficus religiosa* as a nanofactory in DAL induced mice model. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 108, 185–190. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.041.
- ASTM E2524-08(2013). Standard test method for analysis of hemolytic properties of nanoparticles. Available at: <http://www.astm.org/Standards/E2524.htm> [accessed October 17, 2015].
- Ayala-Núñez, N. V., Villegas, H. H L., Turrent, L. C. I., and Padilla, C. R. (2009). Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nanoscale does matter. *Nanobiotechnology* 5, 2–9. doi:10.1007/s12030-009-9029-1.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., and Basílio Júnior, I. D., *et al.* (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT - Food Science and Technology*. 42:6, 1139–1143. doi:10.1016/j.lwt.2009.01.010.
- Bass, S. N., Bauer, S. R., Neuner, E. A., and Lam, S. W. (2015). Mortality risk factors for critically III patients with carbapenem-resistant bacteremia: impact of combination antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59:7, 3748–3753. doi:10.1128/AAC.00091-15.
- Bassolé, I. H. N., and Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 17:4, 3989–4006. doi:10.3390/molecules17043989.

- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., and Remmal, A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*. 38:6, 454–458. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01511.x.
- Betancourt, L., Phandanavong, V., and Patiño, R. (2012). Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59, 21–31.
- Biasi-Garbin, R. P., Otaguiri, E. S., Morey, A. T., Silva, M. S., Morguette, A. E. B., Lancheros, C. A. C. *et al.* (2015). Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1155/2015/861497.
- Bollenbach, T. (2015). Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Current Opinion in Microbiology*. 27, 1–9. doi:10.1016/j.mib.2015.05.008.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:3, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Burt, S. A, and Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in applied microbiology*. 36:3, 162–167. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x.
- Busatta, C., Mossi, A. J., Rodrigues, M. R. A., Cansian, R. L., and Oliveira, J. V. (2007). Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:4, 610–616. doi:10.1590/S1517-83822007000400006.
- Bush, K. (2010). Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*. 14:3. doi:10.1186/cc8892.
- Dùran, N., Alves, O. L., Esposito, E., and Souza, G. I. *Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos*. Brazil patent PI 0605681-4 A (2006).
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., *et al.* (2015). Carvacrol Codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. *Plos One*. 10:4. doi:10.1371/journal.pone.0120937.
- Cantas, L., Shah, S. Q. A, Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., *et al.* (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiol.* 4, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2013.00096.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira, W. D., *et al.* (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12:12. doi:10.1186/1476-0711-12-12.
- Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., and Cestaro, B. (2000). Antioxidant properties of (*Oregano vulgare*) leaf extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 24, 453–465.

- Chin, N. X., Weitzman, I. and Della-Latta, P. (1997). In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with flucanazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:4, 850–852.
- Choi, J., Reipa, V., Hitchins, V. M., Goering, P. L., and Malinauskas, R. A. (2011). Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences*. 123, 133–143. doi:10.1093/toxsci/kfr149.
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R., Sallis, E. S., Antunes, T. A., Mattei, A., Rodrigues, M. R., *et al.* (2008). Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27:5, 704–709.
- CLSI (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Available at: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf> [accessed October 17, 2015].
- Devi, J. S. and Bhimba, B. V. (2012). Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* *in vitro*. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery*. 01:242. doi:10.4172/scientificreports.242.
- Dhillon, R. H. P., and Clark, J. (2012). ESBLs: A clear and present danger? *Critical Care Research and Practice*. 2012. doi:10.1155/2012/625170.
- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., and Häse, C. C. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:8, 8–11. doi:10.1128/AAC.46.8.2668.
- Dorman, H. J., and Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:2, 308–316. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
- Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:1, 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09.
- Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., Mandrell, R., *et al.* (2009). Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. *Journal of Food Science*. 74:7, 390–397. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01289.x.
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., Souza, G. I. H., and Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*. 3:8. doi:10.1186/1477-3155-3-8.
- Durán, N., Marcato, P. D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., and Rai, M. (2011). Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90:5, 1609–1624. doi:10.1007/s00253-011-3249-8.
- Durán, N., Marcato, P. D., De Conti, R., Alves, O. L., Costa, F. T. M., and Brocchi, M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of The Brazilian Chemical Society*. 21:6, 949–959. doi:10.1590/S0103-50532010000600002.
- Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., and Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with

- antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6, 103-109. doi:10.1016/j.nano.2009.04.006.
- Feng, Q., Wu, J., and Chen, G. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 52:4, 662–668.
- Fischbach, M. A. (2011). Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology*. 14:5, 519–523. doi:10.1016/j.mib.2011.08.003.
- Fontes, L. C., Neves, P. R., Oliveira, S., Silva, K. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., *et al.* (2011). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55:6, 3063–3064. doi:10.1128/AAC.00138-11.
- Gautam, N., Mantha, A. K., and Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed Research International*. 2014. doi:10.1155/2014/154106.
- Ghosh, I. N., Patil, S. D., Sharma, T. K., Srivastava, S. K., Pathania, R., and Navani, N. K. (2013). Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 4721–4731. doi:10.2147/IJN.S49649.
- Gilling, D. H., Kitajima, M., Torrey, J. R., and Bright, K. R. (2014). Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*. 116:5, 1149–1163. doi:10.1111/jam.12453.
- Graves, J. L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S. H., *et al.* (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Genetics*. 6, 1–13. doi:10.3389/fgene.2015.00042.
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., *et al.* (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:9, 3590–3595. doi:10.1021/jf980154m.
- Herman, A., and Herman, A. P. (2014). Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14, 946–957. doi:10.1166/jnn.2014.9054.
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., and García-Almendárez, B. E. (2014). Antimicrobial activity of mexican (*Lippia graveolens* H . B . K .) and european (*Origanum vulgare* L .) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2014/641814
- Holt, K., and Bard, A. (2005). The interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag^+ . *Biochemistry*. 44, 13214–13223.
- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga, V. F., Pinto, A. C., and Nakamura, C. V. (2012). Terpenes from copaifera demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55:7, 2994–3001. doi:10.1021/jm201451h.
- Jain, J., Arora, S., Rajwade, J. M., Omray, P., Khandelwal, S., and Paknikar, K. M. (2009).

- Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Molecular Pharmaceutics*. 6:5, 1388–1401. doi:10.1021/mp900056g.
- Kalemba, D., and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10:10, 813–829. doi:10.2174/0929867033457719.
- Kim, S. H., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choi, S. J., and Lee, D. S. (2011). Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 39:1, 77–85.
- Koga, V. L., Rodrigues, G. R., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., Brito, B. G. De, *et al.* (2015). Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12:6, 479–485. doi:10.1089/fpd.2014.1888.
- Kong, K.F., Schneper, L., and Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 118, 1–36. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:3, 453–462. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
- Li, P., Li, J., Wu, C., Wu, Q., and Li, J. (2005). Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16:9, 1912–1917. doi:10.1088/0957-4484/16/9/082.
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., and Chen, Y. Ben (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85:4, 1115–1122. doi:10.1007/s00253-009-2159-5.
- Lima, R., Seabra, A. B., and Durán, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 32:11, 867–879. doi:10.1002/jat.2780.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., *et al.* (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*. 5:4, 916–924. doi:10.1021/pr0504079.
- Losasso, C., Belluco, S., Cibir, V., Zavagnin, P., Mičetić, I., Gallochio, F., *et al.* (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Frontiers in Microbiology*. 5, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00227.
- Mancini, E., Camele, I., Elshafie, H. S., De Martino, L., Pellegrino, C., Grulova, D., *et al.* (2014). Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the Southern Apennines (Italy). *Chemistry & Biodiversity*. 11:4, 639–651. doi:10.1002/cbdv.201300326.
- Mandal, M. D., and Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1:2, 154–160. doi:10.1016/S2221-1691(11)60016-6.
- Medini, H., Elaissi, A., Farhat, F., Khouja, M. L., Chemli, R., and Harzallah-Skhiri, F. (2009). Seasonal and geographical influences on the chemical composition of *Juniperus phoenicea* L. essential oil leaves from the northern Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*. 6:9, 1378–1387. doi:10.1002/cbdv.200800202.

- Mehdi, S. J., Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N., Rizvi, M. M. A. (2011). Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells. *Biology and Medicine*. 3:2, 307–312.
- Naqvi, S. Z. H., Kiran, U., Ali, M. I., Jamal, A., Hameed, A., Ahmed, S., *et al.* (2013). Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 3187–3195. doi:10.2147/IJN.S49284.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., and De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6:12, 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451.
- NCCLS (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents*. Available at: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M26A_sample.pdf [accessed October 17, 2015].
- Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., *et al.* (2004). Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*. 230:2, 191–195. doi:10.1016/S0378-1097(03)00890-5.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. a., Pizzimenti, F. C., *et al.* (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 56:4, 519–523. doi:10.1099/jmm.0.46804-0.
- Nowack, B., Krug, H. F., and Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers. *Environmental Science & Technology*. 45:4, 1177–1183. doi:10.1021/es103316q.
- Palanisamy, N. K., Ferina, N., Amirulhusni, A. N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L. J., *et al.* (2014). Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology*. 12:2. doi:10.1186/1477-3155-12-2.
- Panacek, A., Kvittek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., *et al.* (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*. 110, 16248–16253. doi:10.1021/jp063826h.
- Patel, G., and Bonomo, R. A. (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology* 4, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2013.00048.
- Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 3, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2012.00009.
- Prado, T., Pereira, W. C., Silva, D. M., Seki, L. M., Carvalho, a. P. D. a, and Asensi, M. D. (2007). Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Letters in Applied Microbiology*. 46, 136–141. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x.
- Queenan, A. M., and Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 20:3, 440–458. doi:10.1128/CMR.00001-07.
- Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., and Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 112:5, 841–852. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x.

- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., and Remmal, A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*. 15:4, 286–292. doi:10.1080/10412905.2003.9712144.
- Rice, L. B. (2012). Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*. 87:2, 198–208. doi:10.1016/j.mayocp.2011.12.003.
- Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E., et al. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 17:28, 3289–3295. doi:10.2174/092986710792231996.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., and Milillo, M. A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine*. 14:11, 727–732. doi:10.1016/j.phymed.2007.01.005.
- Rubin, J. E., Ekanayake, S., and Fernando, C. (2014). Carbapenemase- producing Organism in Food , 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 20:7. doi: 10.3201/eid2007.140534.
- Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K. S., and Ravikumar, V. (2013). *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 108, 80–84. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.033.
- Sastry, M., Ahmad, A., Islam Khan, M., and Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science*. 85:2, 162–170.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., and Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22:1, 90–101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- Si, H., Hu, J., Liu, Z., and Zeng, Z. L. (2008). Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 53:2, 190–194. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00414.x.
- Silva, K. C., and Lincopan, N. (2012). Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 48:2, 91–99. doi: 10.1590/S1676-24442012000200004.
- Singh, K., Panghal, M., Kadyan, S., Chaudhary, U., and Yadav, J. (2014). Green silver nanoparticles of *Phyllanthus amarus*: as an antibacterial agent against multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology*. 12: 40. doi:10.1186/s12951-014-0040-x.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., and Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26:2, 118–122. doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x.
- Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C., and Sousa, D. P. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*. 2014. doi: 10.1155/2014/953451.
- Souza, E. L., Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., and Costa, A. C. V. (2009).

- Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40:2, 387–393. doi:10.1590/S1517-83822009000200032.
- Souza, E. L., Barros, J. C., Oliveira, C. E. V, and Conceição, M. L. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 137:2-3, 308–311. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.025.
- Souza, E. L., Oliveira, C. E. V, Stamford, T. L. M., Conceição, M. L., and Gomes Neto, N. J. (2013). Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44, 29–35. doi:10.1590/S1517-83822013005000001.
- Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., et al. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*. 65:2, 639–644. doi:10.2298/ABS1302639S.
- Subashini, J., Khanna, V. G., and Kannabiran, K. (2014). Anti-ESBL activity of silver nanoparticles biosynthesized using soil *Streptomyces* species. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Eng. 37:6, 999–1006. doi:10.1007/s00449-013-1070-8.
- Suzuki, É. Y., Soldati, P. P., Chaves, M. G. A. M., and Nádia, R. B. (2015). Essential oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: an alternative against microorganisms responsible for bad perspiration odor. *Journal of Young Pharmacists*. 7, 12–20. doi:10.5530/jyp.2015.1.4.
- Szabó, M. Á., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., et al. (2010). Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research*. 24:5, 782–786. doi:10.1002/ptr.
- Traub, W. H., and Kleber, I. (1975). In vitro additive effect of polymyxin B and rifampin against *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7:6, 874–876.
- Turlej, A., Hryniewicz, W., and Empel, J. (2011). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: An overview. *Polish Journal of Microbiology*. 60:2, 95–103.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., and Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:10, 4606–4610.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. (2010). A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiologica*. 33:2, 137–145.

Conflito de interesses: Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

Legendas das figuras

Figura 01. Curva de crescimento e morte da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 exposta ao OEO e bio-AgNP individualmente, e à combinação de ambos antibacterianos.

Figura 02. Curva de crescimento e morte da cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 exposta ao OEO e bio-AgNP individualmente, e à combinação de ambos antibacterianos.

Figura 03. Curva de crescimento e morte da cepa *Escherichia coli* 131, produtora de carbapenemase, exposta ao OEO e bio-AgNP individualmente, e à combinação de ambos antibacterianos.

Figura 04. Micrografia eletrônica de varredura do efeito antibacteriano de óleo essencial de orégano (OEO) e nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP) contra cepa *Staphylococcus aureus* 25923 após 0,5 h (30 min) e 6 h de tratamentos. (A) Controle negativo (não tratado) após 0,5 h (30 min) de incubação. (B) Controle negativo (não tratado) após 6 h de incubação. (C e D) Células tratadas com 0,596 mg/mL de OEO por 0,5 h (30 min) apresentando. (E e F) Células tratadas com 250 μ M de bio-AgNP por 6 h (G e H) Células tratadas com a combinação de OEO (0,298 mg/mL) e bio-AgNP (125 μ M) por 6 h. *Micrografias de menor aumento (A, B, C, E e G):* mostram redução em quantidade de matriz exopolissacarídica e densidade celular das amostras tratadas em comparação aos controles. *Micrografias de maior aumento (D, F e H):* mostram alterações morfológicas (protuberâncias) nas superfícies celulares e detritos de células. *Imagens inseridas em A e B:* possuem mesmo aumento que D, F e H; porém mostram células do controle sem alterações morfológicas. *Imagem inserida em H:* possui mesmo aumento que H e mostra células com protuberâncias superficiais. *Setas:* alterações morfológicas (protuberâncias na superfície celular) e detritos celulares. *Pontas de seta:* matriz exopolissacarídica.

Figura 05. Porcentagem de células viáveis em exposição a diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP). (A): OEO. (B): bio-AgNP.

Figura 06. Atividade hemolítica de óleo essencial de orégano (OEO) e nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP). (A): OEO. (B): bio-AgNP.

TABELA 01

Tabela 01. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados bacterianos clínicos.

<i>Staphylococcus aureus</i>		PEN	OXA	CIP	RIF	GEN	STR	TET	ERY	CLI	LNZ	SXT						
MRSA 101		R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S						
MRSA 107		R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R						
<i>Escherichia coli</i>		PTZ	CEP	CFZ	CTX	CAZ	CPM	AZT	IPM	MRP	ERT	NOR	CIP	LVX	GEN	AMI	SXT	NIT
ESBL 167	S	-	R	R	R	R	R	R	S	S	S	-	R	R	S	S	R	S
ESBL 169	S	R	-	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
ESBL 176	S	R	-	R	R	R	R	I	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ESBL 192	S	S	-	R	R	R	I	S	-	S	S	-	R	R	S	S	S	S
KPC 131	R	-	-	R	S	S	R	R	R	R	R	-	R	-	-	S	-	-
KPC 133	I	-	-	R	I	I	R	S	R	R	R	-	R	-	-	S	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>		PTZ	AMS	CTX	CAZ	CPM	AZT	IPM	MRP	ERT	CIP	LVX	GEN	AMI	TET	SXT		
CR 01		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		

AMI, amicacina; AMS, ampicilina + sulbactam; AZT, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CEP, cefalotina; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacino; CLI, clindamicina; CPM, cefepima; CTX, cefotaxima; ERY, eritromicina; ETP, ertapenem; GEN, gentamicina; IPM, imipenem, LNZ, linezolida; LVX, levofloxacino; MRP, meropenem; NIT, nitrofurantoína; NOR, norfloxacino; OXA, oxacilina; PEN, penicilina; PTZ, piperacilina + tazobactam; RIF, rifampicina; STR, estreptomicina; SXT, trimetoprima + sulfametoxazol; TET, tetraciclina.

R, resistente; S, sensível; I, intermediário; (-), não testado.

MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

ESBL, betalactamase de espectro estendido; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; RC, resistente a carbapenêmicos.

101, 107, 167, 169, 176, 192, 131, 133 e 01 são as identificações dos isolados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada – Universidade Estadual de Londrina.

TABELA 02

Tabela 02. Efeito antibacteriano de óleo essencial de orégano e de nanopartículas de prata biológicas, individualmente e em combinação.

Bactéria	OEO (mg/mL)			Bio-AgNP (µM)			FICI	Interação
	CBM	CIM (i)	CIM (c)	CBM	CIM (i)	CIM (c)		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,596	0,596	0,149	250,0	250,0	62,50	0.50	Sinergismo
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0,596	0,596	0,075	250,0	125,0	62,50	0.62	Aditismo
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,596	0,596	0,298	62,50	62,50	15,62	0.75	Aditismo
<i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC 13076	0,298	0,298	0,037	62,50	62,50	31,25	0.62	Aditismo
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0,596	0,596	0,075	62,50	62,50	15,62	0.37	Sinergismo
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,596	0,596	0,075	125,0	125,0	62,50	0.62	Aditismo
<i>S. enterica</i> Typhimurium UK-1*	0,298	0,298	0,149	125,0	125,0	62,50	1.00	Aditismo
MRSA N315	0,596	0,596	0,075	250,0	250,0	125,0	0.62	Aditismo
MRSA 101	1,193	0,596	0,596	500,0	250,0	62,50	1.25	Indiferente
MRSA 107	1,193	1,193	0,596	500,0	250,0	62,50	0.75	Aditismo
<i>E. coli</i> ESBL 167	0,596	0,596	0,149	125,0	125,0	15,62	0.37	Sinergismo
<i>E. coli</i> ESBL 169	0,596	0,596	0,149	125,0	125,0	15,62	0.37	Sinergismo
<i>E. coli</i> ESBL 176	0,596	0,596	0,149	125,0	125,0	31,25	0.50	Sinergismo
<i>E. coli</i> ESBL 192	0,596	0,596	0,149	125,0	125,0	31,25	0.50	Sinergismo
<i>E. coli</i> KPC 131	0,596	0,596	0,075	125,0	125,0	31,25	0.37	Sinergismo
<i>E. coli</i> KPC 133	0,596	0,596	0,075	125,0	125,0	62,50	0.62	Aditismo
<i>A. baumannii</i> CR 01	0,298	0,298	0,149	125,0	125,0	15,62	0.62	Aditismo

OEO, óleo essencial de orégano; bio-AgNP, nanopartículas de prata biológicas.

CBM, concentração bactericida mínima individualmente.

CIM (i), concentração inibitória mínima individualmente; CIM (c), concentração inibitória mínima em combinação.

ATCC, American Type Culture Collection.

*, ATCC 68169.

MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

ESBL, betalactamase de espectro estendido; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

CR: resistente a carbapenêmicos.

101, 107, 167, 169, 176, 192, 131, 133 e 01 são as identificações dos isolados no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada – Universidade Estadual de Londrina.

FICI, índice de concentração inibitória fracionada.

FICI foi interpretado como descrito a seguir: $\leq 0,5$ (interação sinérgica); $> 0,5$ a $1,0$ (interação aditiva); $> 1,0$ a $< 4,0$ (in diferente); ≥ 4 (antagonismo).

FIGURA 01

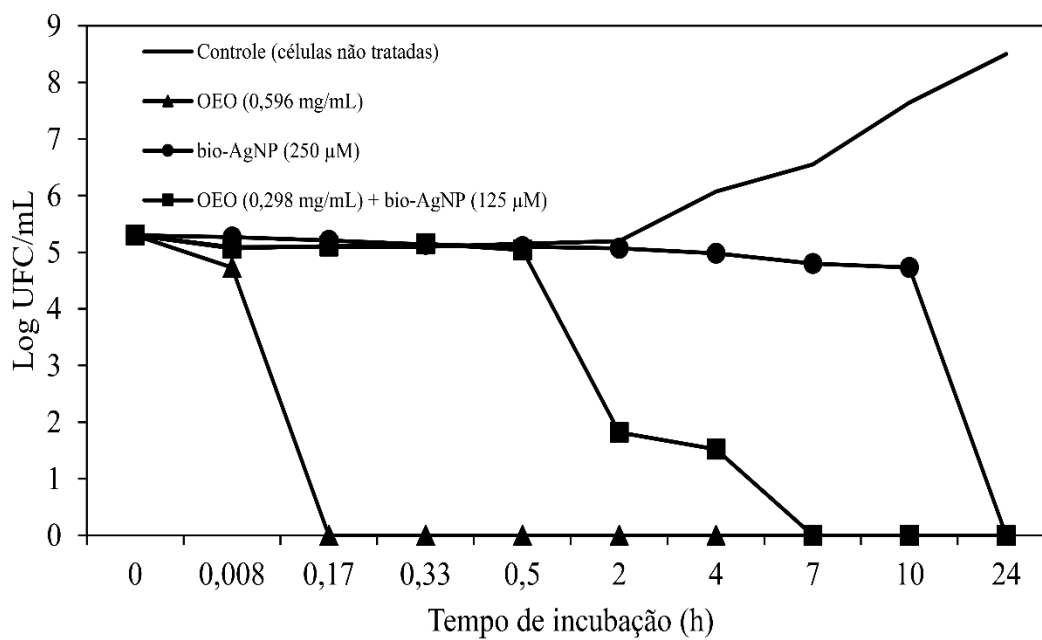


FIGURA 02

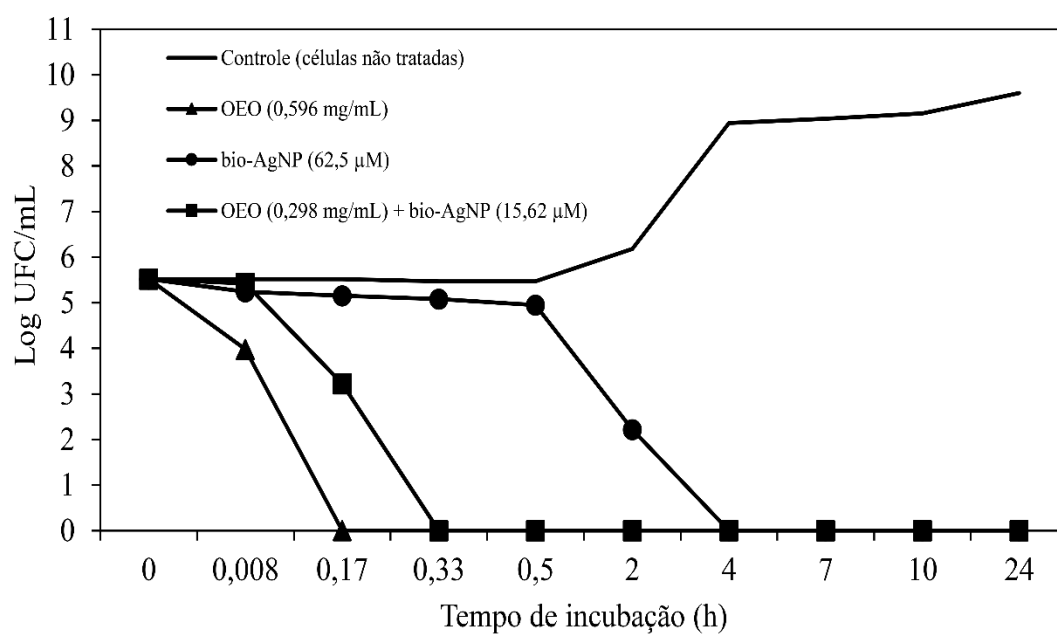


FIGURA 03

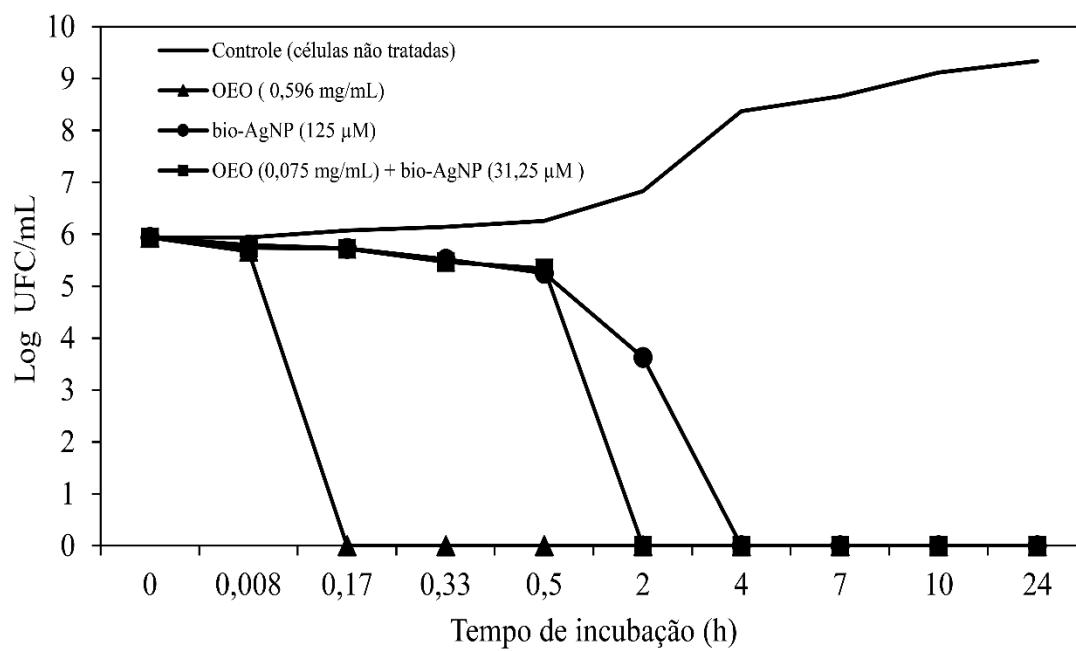


FIGURA 04 A e B

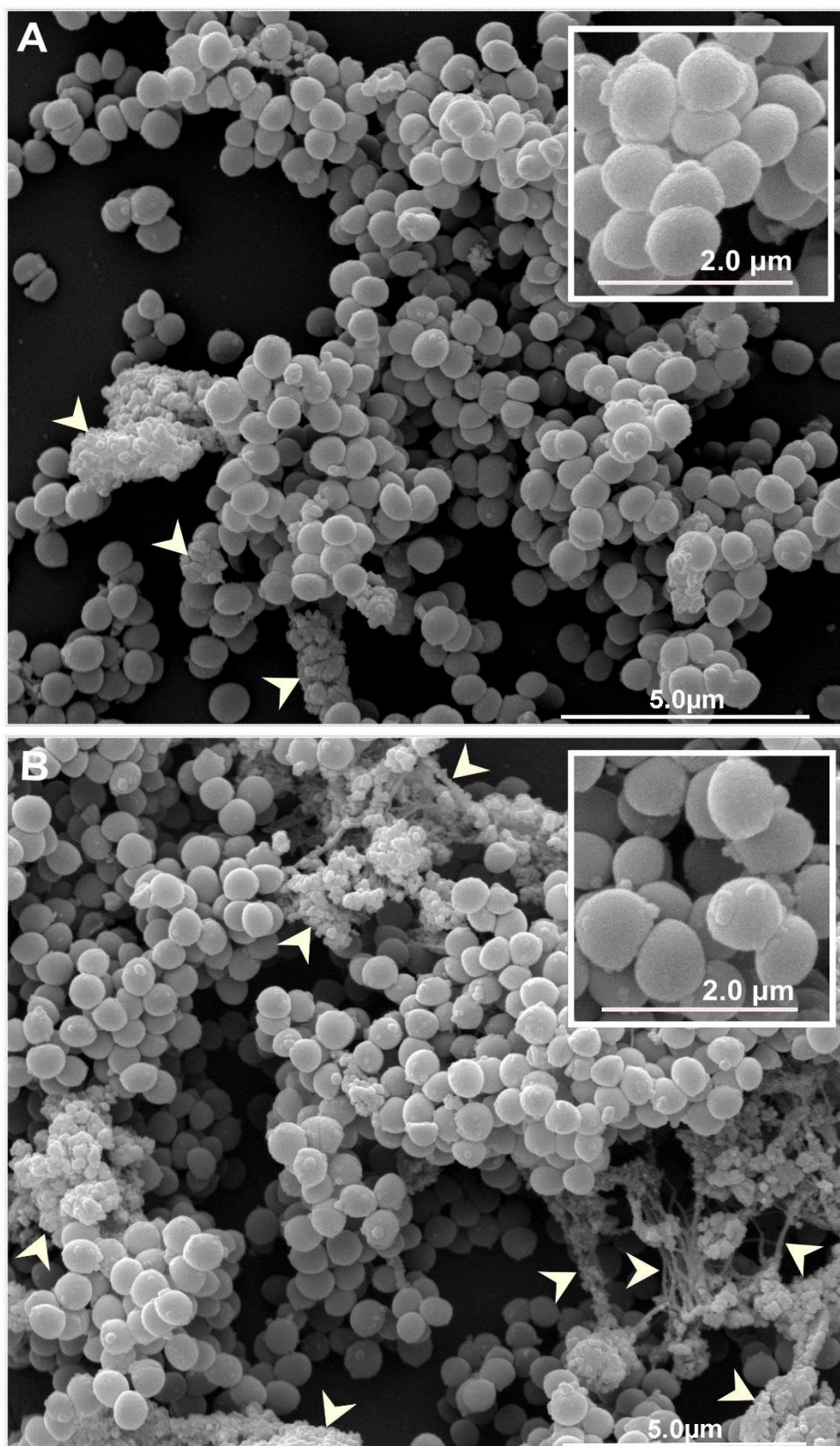


FIGURA 04 C e D

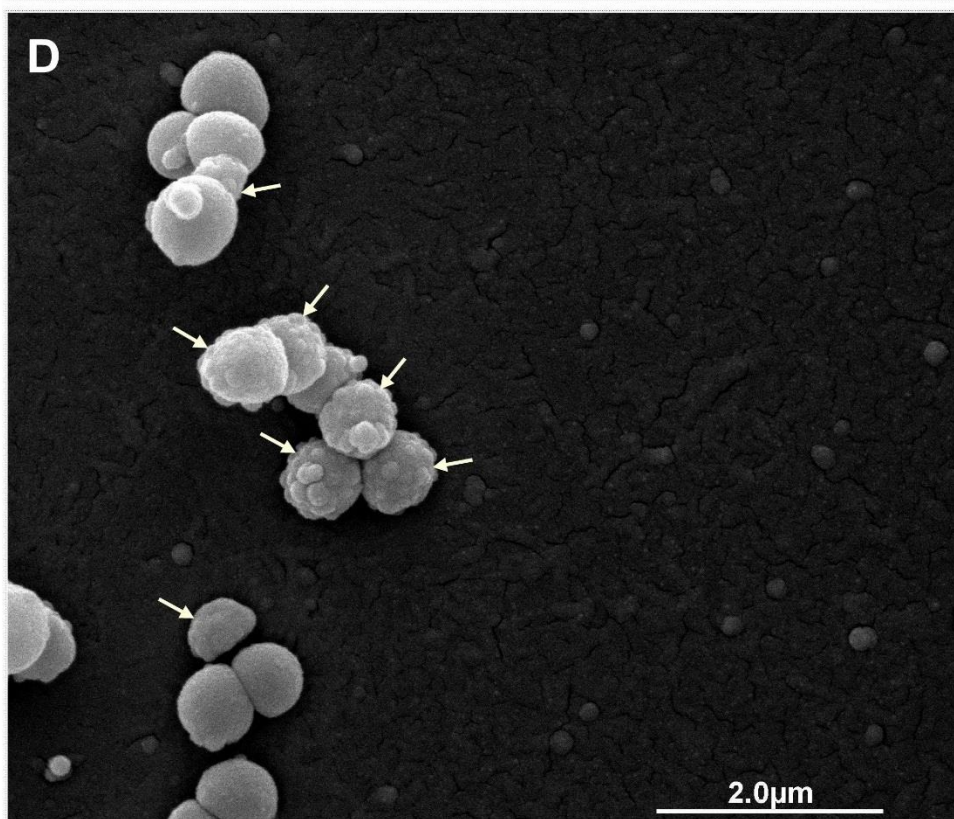
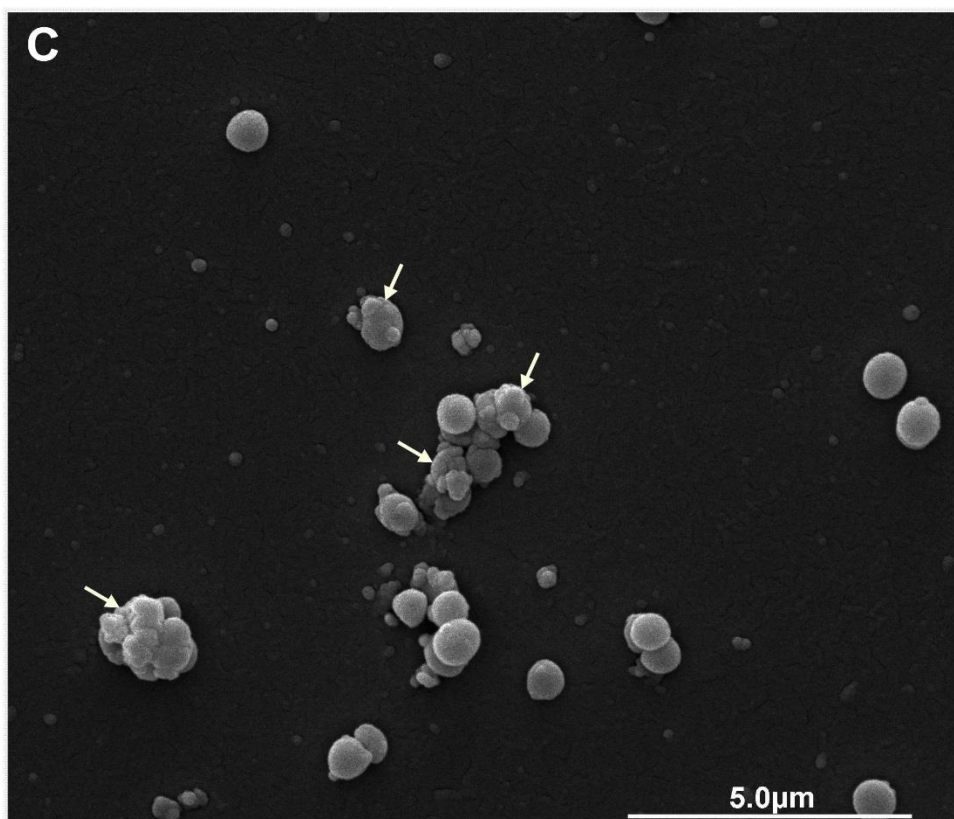


FIGURA 04 E e F

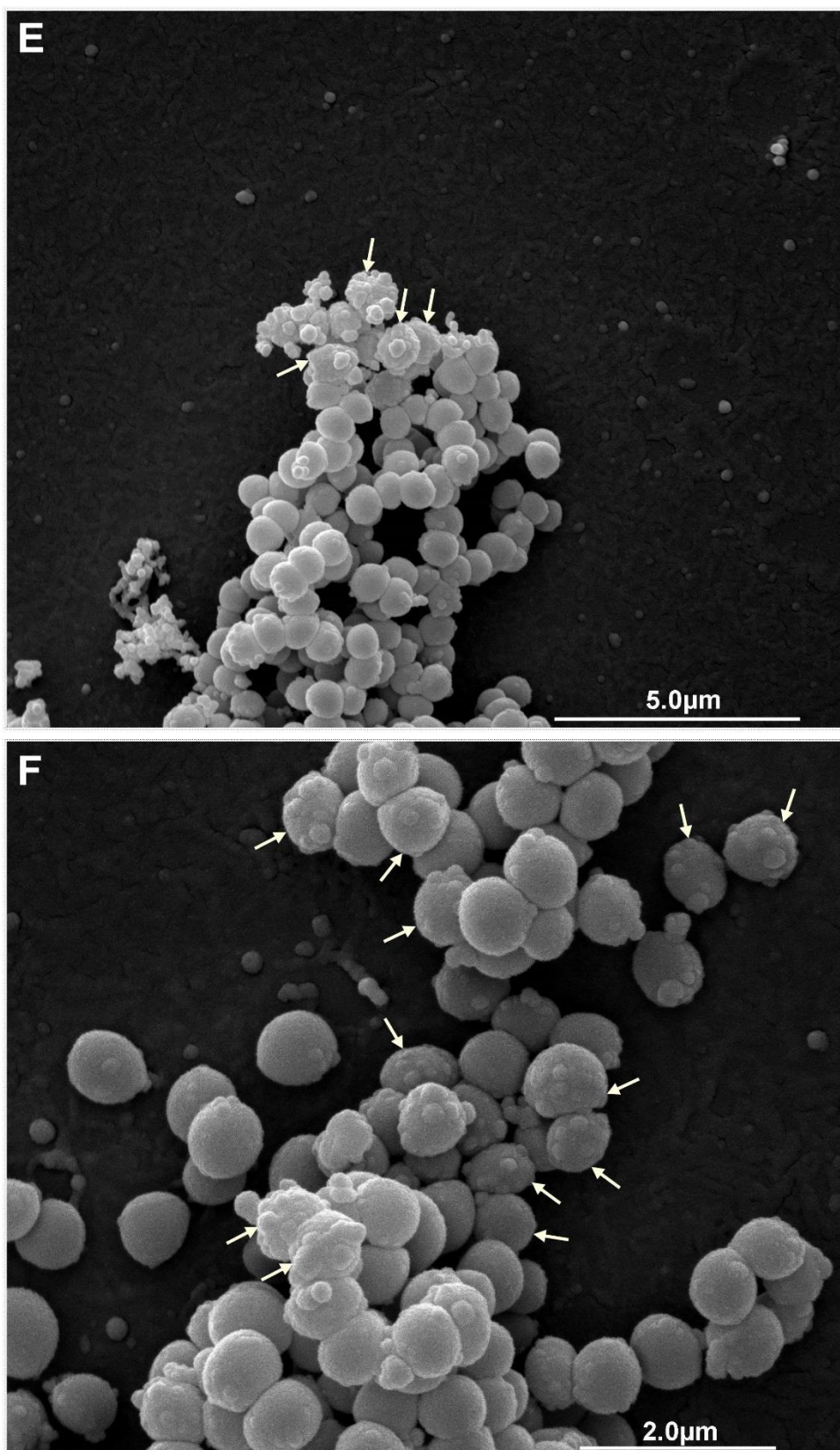


FIGURA 04 G e H

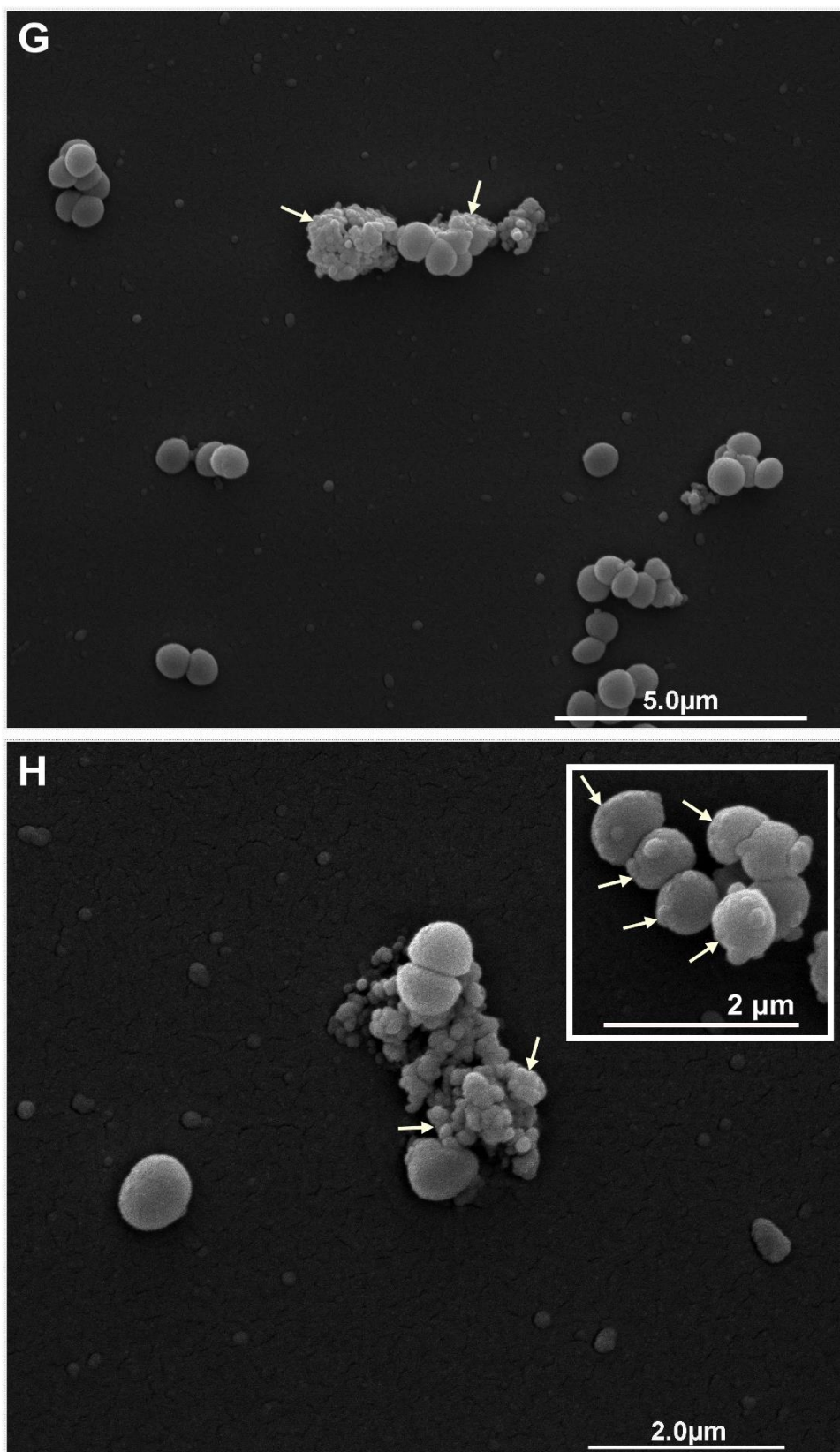
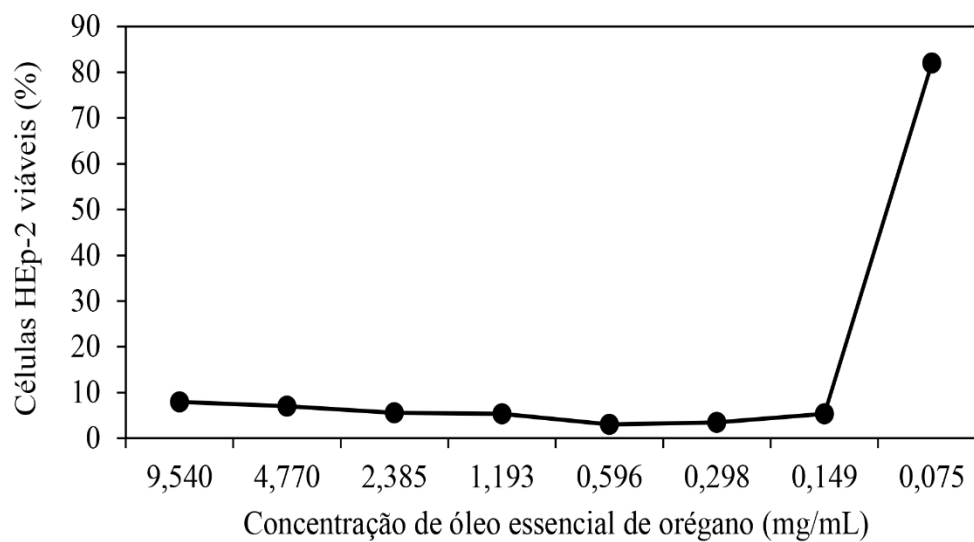


FIGURA 05

(A)



(B)

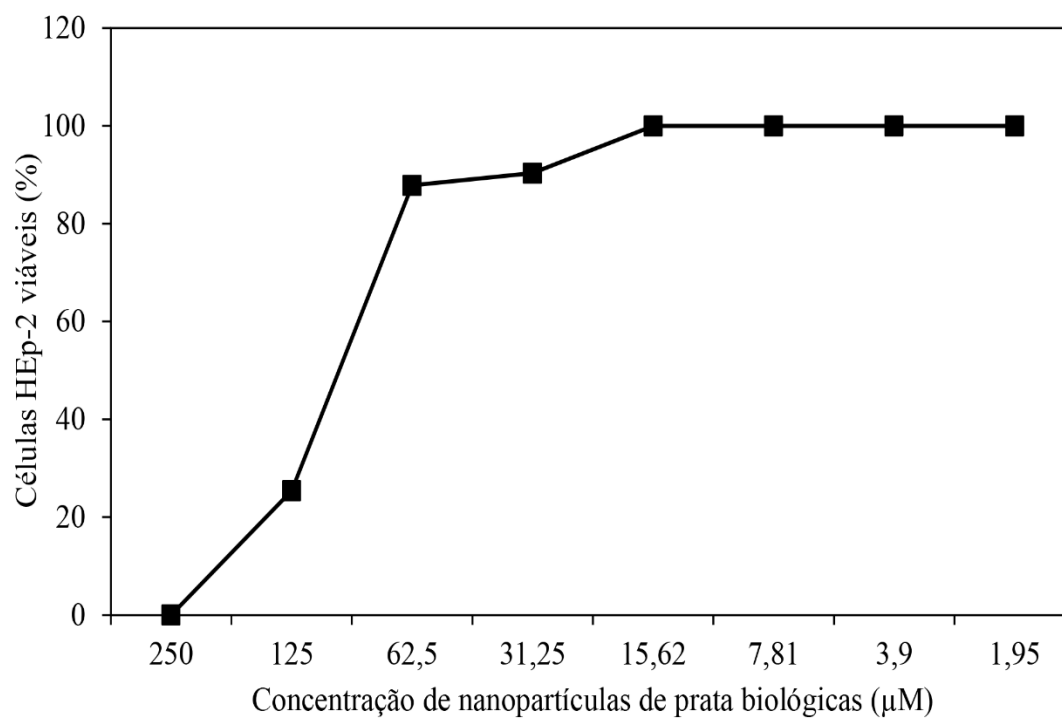
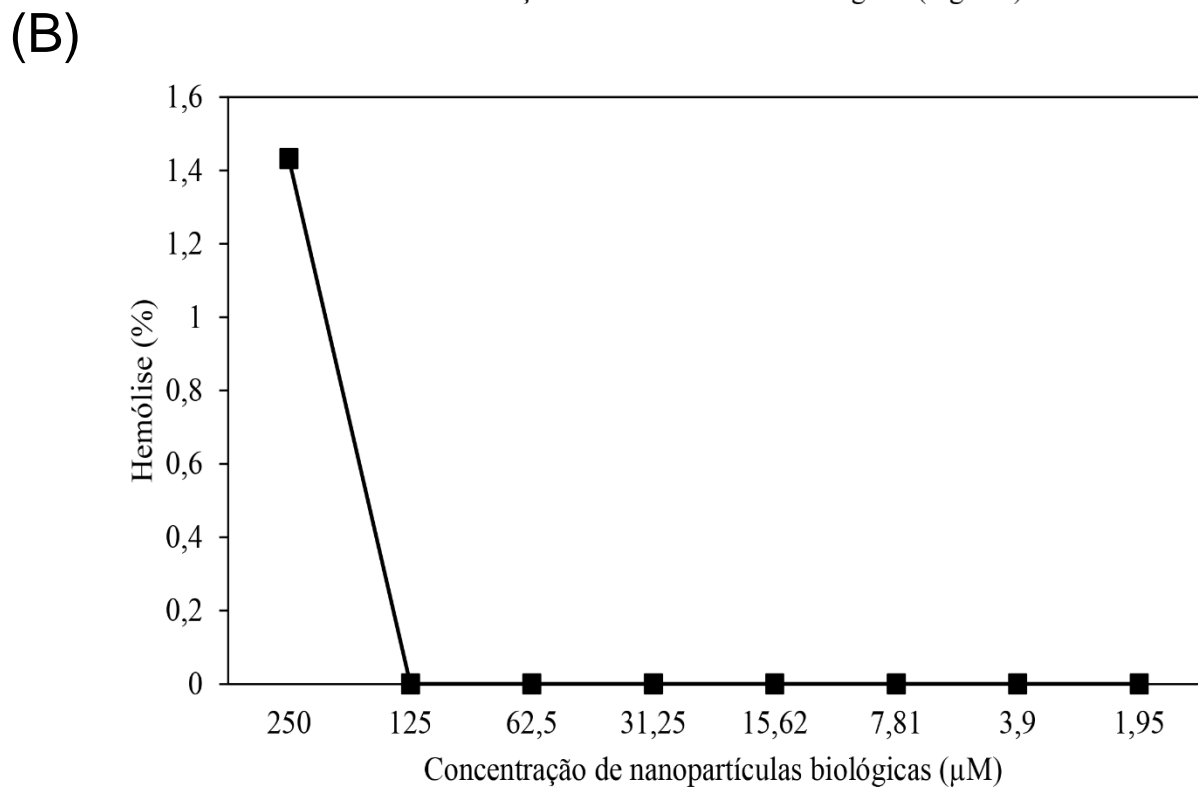
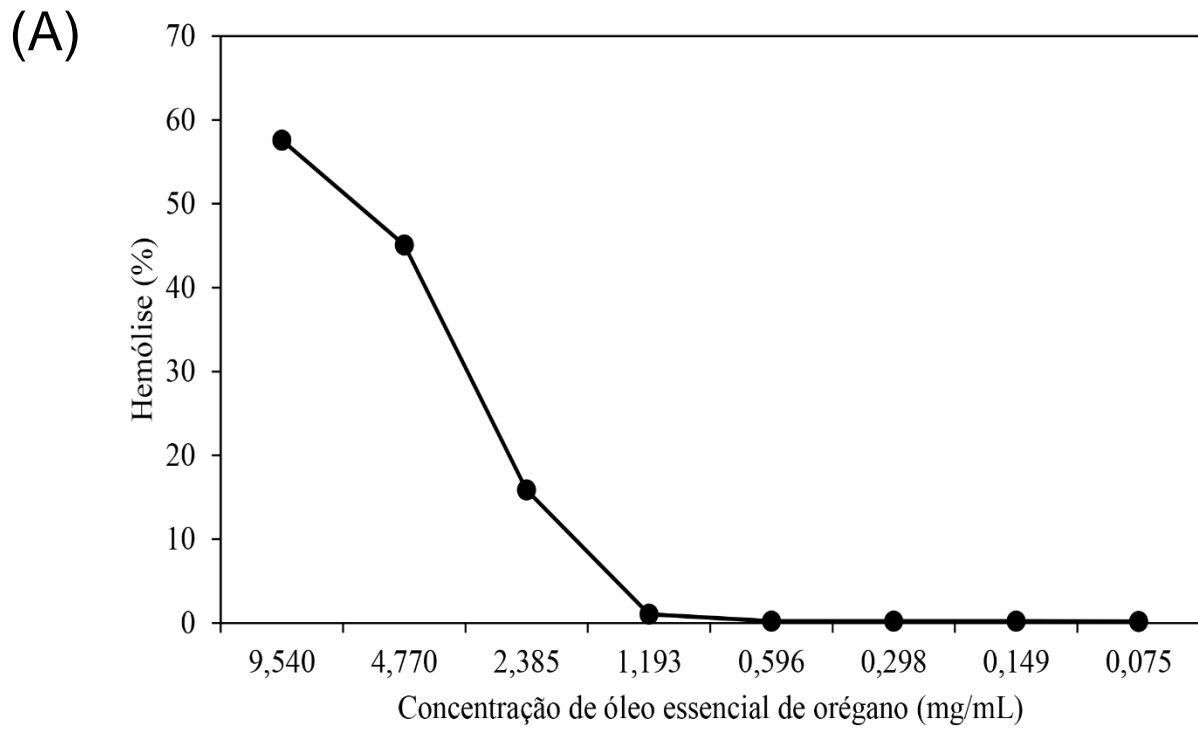


FIGURA 06



6 CONCLUSÃO

O óleo essencial de orégano (OEO) e as nanopartículas de prata biológicas (bio-AgNP) apresentaram atividade antibacteriana contra todas as cepas Gram positivas e Gram negativas testadas, inclusive aquelas multirresistentes. Os dois compostos em combinação apresentaram efeito antimicrobiano sinérgico ou aditivo.

A ação antimicrobiana tanto dos compostos separados como combinados foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura que mostrou a presença de vesículas na superfície das células bacterianas tratadas, alterações estas que estavam ausentes nas amostras que não receberam tratamento. Como os compostos estudados, isolados e em combinação, causaram alterações morfológicas celulares semelhantes, sugere-se que o OEO e as bio-AgNP possuem mecanismos de ação parecidos, a princípio danificando a superfície celular e interferindo na deposição de matriz exopolissacarídica.

Os resultados deste trabalho sugerem que o OEO e as bio-AgNP são excelentes alternativas terapêuticas, principalmente contra bactérias produtoras de betalactamases e carbapenemases como *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*. A combinação desses compostos elimina microrganismos que possuem pouca ou nenhuma opção de tratamento e possivelmente previne a seleção de cepas multirresistentes; mostrando potencial de aplicação em múltiplas áreas como setores hospitalares, clínicos e industriais.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 05 – Transformação da unidade de concentração mg/mL para % (v/v) do óleo essencial de orégano utilizado neste estudo

Conversão de concentrações	
mg/mL	% (v/v)
9,540	1
4,770	0,5
2,385	0,25
1,193	0,12
0,596	0,06
0,298	0,03
0,149	0,01
0,075	0,008
0,037	0,004

Densidade do óleo essencial de orégano = 0,954 g/mL

Fonte: Próprio autor (2015).

ANEXO B

Tabela 06 – Transformação da unidade de concentração μM para $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de prata sintetizadas através de redução de íons de prata pelo fungo *Fusarium oxysporum*

Conversão de concentrações	
μM	$\mu\text{g/mL}$
500	75
250	37,5
125	18,75
62,5	9,37
31,25	4,69
15,62	2,34
7,81	1,17
3,90	0,58
1,95	0,29

Fonte: Próprio autor (2015).