



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC

**BIOPROSPECÇÃO DO SESQUITERPENO ZERUMBONA, PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES CUTÂNEAS.**

CARLOS DANNIEL FREITAS PINHEIRO

MANAUS - AM

2017

CARLOS DANNIEL FREITAS PINHEIRO

**BIOPROSPECÇÃO DO SESQUITERPENO ZERUMBONA, PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES CUTÂNEAS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde.

ORIENTADOR: Dra. Patricia Puccinelli Orlandi

CO-ORIENTADOR: Dr. Gemilson Soares Pontes

MANAUS - AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Pinheiro, Carlos Dannel Freitas

P654b Bioprospecção do Sesquiterpeno Zerumbona, para o tratamento de Infecções Cutâneas. / Carlos Dannel Freitas Pinheiro. 2017

86 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patricia Puccinelli Orlandi
Coorientador: Gemilson Soares Pontes

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Infecções cutâneas. 2. Óleo Essencial. 3. Zerumbona. 4. Amazônia. 5. Antimicrobiano. I. Orlandi, Patricia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CARLOS DANNIEL FREITAS PINHEIRO

**BIOPROSPECÇÃO DO SESQUITERPENO ZERUMBONA, PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES CUTÂNEAS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde.

ORIENTADOR: Dra. Patricia Puccinelli Orlandi

CO-ORIENTADOR: Dr. Gemilson Soares Pontes

Data da aprovação: em: _____/_____/_____ Manaus-AM

Banca Examinadora

Nome do Membro

Instituição

Nome do Membro

Instituição

Nome do Membro

Instituição

DEDICATÓRIA

Ao meu tio/amigo Júlio Cesar Pires (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

“Tudo posso naquele que me fortalece”. Obrigado meu Deus e todos seres de luz que me acompanham. Pela saúde, disposição e por ser circundado de pessoas maravilhosas, em todas as fases de minha existência.

Agradeço ao meu querido Pai, Carlos Cleomir de Souza Pinheiro, por todo o apoio, carinho, amor e presença, fatos decisivos na minha jornada científica.

A o amor da minha vida, minha mãe, Solange Maria Almeida Freitas, por todo ensinamento, pela vida dedicada á me tornar um homem honesto e com compromisso com a sociedade. Meus pais, exemplo de cidadãos e de amor incondicional. Tudo que sou, devo a vocês.

Meu irmão Carlos Matteus Freitas Pinheiro (Nhem), verdadeiro amigo para todas as horas. Que me aturou nessa árdua jornada.

Ao meu Co-orientador/amigo Dr. Gemilson Soares Pontes, pela confiança, pelo apoio e amizade. Um verdadeiro exemplo de profissional. Sou muito grato!

Ao meu amigo/sócio Amaral Neto, pelo apoio e compreensão nessa difícil jornada. Bah! Tchê!

Ao meu amigo/irmão, Thiago Moreira, por todo apoio e parceria, dando uma mão sempre que fosse preciso. Muito obrigado!

Ao Laboratório de Virologia/INPA, por ter abraçado esta pesquisa. Aos amigos de Laboratório (Eduardo e Regiane Costa) pois ninguém realiza pesquisa sozinho. Foram decisivos na execução desse projeto.

Aos meus primos Geybson e Júnior, por todo o apoio e parceria. Vocês são meus irmãos!

Aos meus queridos amigos que me apoiaram incondicionalmente para realização deste trabalho e ficaram sempre do meu lado, torcendo.

A Dr.^a Patrícia Puccinelli Orlandi e FIOCRUZ/AM, pela parceria e apoio nessa pesquisa.

A secretaria do PPGBIOTEC-UFAM, pela paciência e ajuda nos termos burocráticos.

A empresa Biozer da Amazônia, por fomentar grande parte desta pesquisa, apoiando o desenvolvimento sustentável na região amazônica.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

EPÍGRAFE

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

Mahatma Ghandhi

RESUMO

Alterações patológicas cutâneas tais como impetigo, acne, erisipela, celulite e furúnculo são causados por agentes microbianos e afetam mais de 80% da população mundial. A maioria destas patologias é tratada topicamente com medicamentos que não apresentam custo-efetividade satisfatório. O presente estudo tem como objetivo principal avaliar o potencial terapêutico do sesquiterpeno zerumbona, principal princípio ativo do óleo essencial do *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, contra infecções cutâneas. Para a obtenção da Zerumbona, primeiramente o óleo essencial foi submetido a hidrodestilação e seguido pelo processo de recristalização. Na sequência, análises cromatográficas e espectroscópicas foram realizadas para verificação do grau de pureza da Zerumbona obtida. A atividade antimicrobiana da Zerumbona contra os agentes microbianos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* e *Candida albicans*, foi verificada por meio dos métodos de difusão cavidade-placa e microdiluição. Para determinar a atividade bactericida da Zerumbona em relação ao tempo, foi realizada a cinética de morte microbiana. O óleo essencial obtido apresentou um alto teor de Zerumbona (87,95%), que após passar pelo processo de recristalização, o grau de pureza da substância aumentou para 98,79%, apresentando uma excelente atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (CIM \geq 250 μ g/mL e CBM \geq 500 μ g/mL), *P. acnes* (CIM \geq 125 μ g/mL e CBM \geq 250 μ g/mL) e a levedura *C. albicans* (CIM \geq 100 μ g/mL e CFM \geq 200 μ g/mL). A substância natural apresentou efeito bactericida entre 6 e 12 horas para *S. aureus* e em 30 horas para *P. acnes*. A zerumbona foi capaz de inibir a formação de biofilme (*S. aureus*) a partir de \geq 500 μ g/mL. O potencial citotóxico e antioxidante foi avaliado através de ensaios *in vitro*, em cultura de células. A Zerumbona não apresentou efeitos citotóxicos em células eucarióticas normais (VERO). A Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) apresentou excelente atividade antioxidante (100 μ g/mL equivalente á 0,65 nM/mL Trolox). Os resultados apresentados no referido trabalho, elucidam o potencial antimicrobinado da Zerumbona, frente aos microrganismos mais frequentes em infecções cutâneas. Tais dados, podem auxiliar no desenvolvimento de fitoterápicos de uso tópico, direcionados a infecções de pele, a partir do princípio biotativo Zerumbona. Isto poderá servir de base para a geração de esquemas terapêuticos mais seguros, eficazes e de baixo custo.

Palavras Chave: Infecções Cutâneas. Óleo Essencial. Zerumbona. Amazônia. Antimicrobiano.

ABSTRACT

Pathological skin changes such as impetigo, acne, erysipelas, cellulitis and boils are caused by microbial agents and affect more than 80% of the world's population. Most of these pathologies are topically treated with drugs that do not have satisfactory cost-effectiveness. The present study has as main objective to evaluate the therapeutic potential of the sesquiterpene zerumbone the main active ingredient of the essential oil from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, against skin infections. For obtaining of zerumbone, the essential oil was submitted of hydrodistillation, will be subjected to chromatographic and spectroscopic analysis for verification of the degree of purity as the presence of zerumbone. For evaluation of antibacterial activity of zerumbone, an adaptation of cavity-plate and agar dilution methods were used to test different concentrations of zerumbone against main causative agents of cutaneous pathologies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* e *Candida albicans*. For determine the bactericidal activity of zerumbone in relation to time, the Time kill curve were performed. The obtained essential oil had a high zerumbone content (87.95%), after recrystallization process, the substance purity increased to 98.79%, presenting an excellent antimicrobial activity against *S. aureus* (MIC $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ and MIB $\geq 500 \mu\text{g/mL}$), *P. acnes* (MIC $\geq 125 \mu\text{g/mL}$ and MIB $\geq 250 \mu\text{g/mL}$) and yeast *C. albicans* (MIC $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ and MFC $\geq 200 \mu\text{g/mL}$). The natural substance presented bactericidal effect between 6 and 12 hours for *S. aureus* and 30 hours for *P. acnes*. Zerumbone was able to inhibit biofilm formation (*S. aureus*) from of $\geq 500 \mu\text{g} / \text{mL}$. The potential antioxidant and cytotoxic of zerumbone will be analyzed *in vitro* through cell culture assays. Zerumbone showed no cytotoxic effects on normal eukaryotic cells (VERO). Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) showed excellent antioxidant activity ($100 \mu\text{g} / \text{mL}$ equivalent to $0,65 \text{nM/mL}$ Trolox). The results obtained elucidate the antimicrobial potential of zerumbone against the most frequent microorganisms in cutaneous infections. These data can help for the development of new phytotropics of topical use, directed to skin infections, with from bioactive principle Zerumbone. This can serve as a basis for therapeutic schemes generation, more effective and cost-effective.

Key Words: Skin Infections. Essential Oil. Zerumbone. Amazon. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Mapa da distribuição geográfica da família Zingiberaceae	3
Fig. 2	Flor da espécie vegetal <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith. Suas flores usadas tradicionalmente como ornamentais em diversos países. Possui um líquido viscoso que é utilizado na produção de cosméticos. (Acervo Pessoal)	4
Fig. 3	Rizomas do gengibre amargo. Similar ao gengibre comum, mas suas propriedades organolépticas e farmacológicas são totalmente diferentes. Apresenta ramificações em todo o corpo do rizoma (Acervo pessoal)	5
Fig. 4	Herbários com depósito de exsicata da planta <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith. Os pontos amarelos representam a localização de cada herbário ao redor do mundo.....	6
Fig. 5	Resumo das propriedades farmacológicas do composto Zerumbona descritas na literatura	7
Fig. 6	Diferenças morfológicas de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Bactérias gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptidoglicano. Já as bactérias gram-negativas são caracterizadas pela presença do espaço periplasmático e uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), fator que aumentar o potencial de virulência desse grupo bacteriano. (Adaptada de ANVISA)	8
Fig. 7	Sistema tegumentar humano e anexos. (Adaptado de American Cancer Society)	10
Fig. 8	Formação da acne vulgar. Proliferação do <i>Propionibacterium acnes</i> (<i>P. acnes</i>) região sebácea resultando em inflamação local e formação de pústulas características (Adaptado de Open Stax College)	12
Fig. 9	Úlceras na face com eritema no centro das lesões	14
Fig. 10	Infecções mucosais ocasionadas por <i>Candida</i> -sp. Infecção Monocutânea cavidade oral; B. Infecção na cavidade vaginal, ambas causadas por <i>Candida</i> sp.	17
Fig. 11	1-Plasmídeo, pequeno fragmento do DNA bacteriano contém genes de resistência bacteriana. 2-Enzimas ligando-se aos antibióticos, degradando-os. 3-Enzimas inativando o potencial de ação dos antimicrobianos. 4-Bomba de efluxo, a substância entra no meio intracelular bacteriano, no entanto é expulso por este mecanismo de resistência	18
Fig. 12	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> . No tempo de retenção 18 (37,8 min) está presente o composto majoritário zerumbona, apresentando um percentual de área de 87,95%	31
Fig. 13	Cromatograma Líquido de Alta Eficiência (CLAE) dos cristais obtidos o óleo essencial. Tempo de retenção 1, com o percentual de área de 98,79%, referente ao composto Zerumbona, de acordo com a curva padrão estabelecida na patente nº PI-0505343-9/28/11/2007	32
Fig. 14	Atividade antimicrobiana da zerumbona, obtida do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> . Técnica de microdiluição em ágar adaptada de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2009)	34

Fig. 15	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da zerumbona frente <i>P. acnes</i> . Método Diluição em ágar com a Zerumbona. (A) Controle; (B) 125µg/mL (CIM); (C) 250µg/mL (CBM)	34
Fig. 16	Cinética de morte de <i>S.aureus</i> , em diferentes concentrações de Zerumbona, no período de 24 h	35
Fig. 17	Inibição do crescimento do microrganismo-teste (<i>S. aureus</i> isolado clínico e Padrão) na CIM e CBM	35
Fig. 18	Inibição do crescimento bacteriano (<i>P. acnes</i>) nas concentrações de 125 µg/mL (CIM) e 250 µg/mL (CBM) de zerumbona, em função do tempo	36
Fig. 19	Inibição do crescimento do microrganismo-teste (<i>P. acnes</i>) na CIM e CBM ...	36
Fig. 20	Interferência na formação de biofilme de <i>S. aureus</i> (isolado clínico e padrão) em diferentes concentrações de Zerumbona	37
Fig. 21	Viabilidade celular relativa. Concentrações testadas para verificar a toxicidade da Zerumbona em células normais de linhagem contínua	39
Fig. 22	Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox (TEAC), medida dos sobrenadantes das culturas celulares, na presença da Zerumbona.....	39

LISTA DE TABELAS

Tab. 1	Resultado da atividade antibacteriana da Zerumbona, obtida através da técnica de microdiluição	33
Tab. 2	Resultado da atividade antifúngica da Zerumbona, obtida através da técnica de microdiluição	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µg/ml	microgramas por mililitros
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CG	Cromatografia gasosa

CIM	Concentração Mínima Inibitória
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsufóxido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GCMS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
h	Horas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LPS	Lipopolissacarídeos
mL	Mililitros
O.E	Óleos essenciais
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPM	Rotação por minute
SFB	Soro Fetal Bovino
TSA	Ágar Saboraud Dextrose
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Referencial Teórico	3
2.1	Família Zingiberaceae	3
2.2	<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith (Gengibre Amargo)	4
2.3	Zerumbona obtida do Óleo essencial do <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith .	6
2.4	Bactérias gram-positivas e negativas	7
2.5	Infecções cutâneas	9
2.5.1	Principais Infecções cutâneas	12
2.5.1.1	Acne vulgar	12
2.5.1.2	Furúnculo	13
2.5.1.3	Impetigo não bolhoso	14
2.5.1.4	Septicemia causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.5.1.5	Candidíase cutânea	16
2.5.2	Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos	18
2.5.3	Medicamentos Fitoterápicos	19
3	Objetivos	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	Material e Métodos	23
4.1	Obtenção do <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith	23
4.2	Técnicas de extração	23
4.2.1	Hidrodestilação	23
4.2.2	Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massa	23
4.2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE	24
4.2.4	Cepas bacterianas	24
4.2.5	Padronização do Inóculo	25
4.2.6	Determinação da atividade antimicrobiana	25
4.2.6.1	Microdiluição em placa de 96 poços	25
4.2.6.2	Método de difusão cavidade-placa	26
4.2.6.3	Cinética de morte microbiana	26
4.2.6.4	Ação antibiofilme da zerumbona	27
4.2.6.5	Interferência na formação de biofilme	27

4.2.6.6	Degradação do biofilme	27
4.3	Atividade antifúngica	28
4.3.1	Cepa fúngica	28
4.3.2	Padronização do inoculo	28
4.3.3	Determinação da atividade antifúngica	28
4.3.4	Ensaio preliminares dos mecanismos de ação	29
4.3.5	Ensaio proteção do sorbitol	29
4.3.6	Ensaio preliminares dos mecanismos de ação	29
4.3.7	Ensaio <i>in vitro</i>	29
4.3.8	Avaliação da citotoxicidade da zerumbona em células de linhagem contínua	29
4.3.9	Atividade antioxidante	30
5	Resultados	31
5.1	Teores da Zerumbona presentes no óleo essencial de <i>zingiber zerumbet</i> (L.) Smith	31
5.2	Atividade antibacteriana da Zerumbona	32
5.2.1	Cinética de morte microbiana	35
5.3	Atividade antibiofilme da Zerumbona	37
5.4	Atividade antifúngica da Zerumbona	38
5.5	Avaliação da atividade citotóxica da Zerumbona em células normais	38
5.6	Atividade antioxidante	39
6	Discussão	41
7	Conclusões	47
	Referências	48

1 INTRODUÇÃO

As infecções cutâneas causadas por bactérias patogênicas gram-positivas é um grave problema mundial, principalmente em decorrência do surgimento constante de cepas multi-resistentes (KHAN; KHAN, 2016). Grande parte dessas infecções é causada pela bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável pela maior parte das infecções de pele (DEL RIO et al., 2009). Cepas resistentes de *S. aureus* apresentam toxinas que inibem o sistema imune, conduzindo a infecções de formas mais crônicas, inflamações prolongadas e cicatrização demorada, podendo evoluir para bacteremia e conseqüentemente, septicemia (KEYNAN et al., 2013; THANGAMANI et al., 2015).

Além deste microrganismo, podemos citar outras espécies que são frequentemente encontradas em infecções cutâneas, como: *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* e a levedura *Candida albicans*. Esses microrganismos oportunistas geram grandes prejuízos aos sistemas de saúde públicos, pois apresentam dificuldade em seus tratamentos e são responsáveis por infecções de diferentes graus de severidade (FRIEDMAN et al., 2013; THANGAMANI et al., 2015).

Grande parte dos antimicrobianos comerciais disponíveis para o tratamento de infecções cutâneas tem perdido gradativamente sua eficácia, devido ao constante aumento da resistência, desencadeada principalmente pelos seguintes mecanismos: alteração da permeabilidade da membrana, produção de enzimas que degradam os fármacos e bombas de efluxo (WAGENLEHNER et al., 2005; KUETE et al., 2013; NORTH JR, 2016). Esta realidade tem se tornado um problema de saúde pública global, o que motiva uma incessante busca científica por novas formulações terapêuticas, com base em biomoléculas ativas oriundas de fontes vegetais, principalmente aquelas provenientes da biodiversidade Amazônica (AZEVEDO et al., 2014; SARRANZI et al., 2015).

Pesquisas por substâncias naturais, com propriedades antibacterianas, são cada vez mais frequentes no Brasil e em diversos países detentores de flora diversificada (TORBATI et al., 2013; PATRA et al., 2015; SHARIFI-RAD, 2015). No entanto, é necessário o conhecimento farmacológico, etnobotânico, químico e agrônômico, pois em concentrações inadequadas ou em associação com outras drogas, podem causar efeitos tóxicos irreversíveis (VEIGA JR, 2005).

A Floresta Amazônica abriga metade das espécies vegetais do mundo, sendo uma importante fonte de insumos para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos inovadores, que atendam às exigências desse crescente mercado (RIBAS & SMITH, 2009). Entretanto,

para que produtos oriundos de pesquisas sejam regularizados, faz-se necessário atender as determinações legais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Essa instituição reguladora prevê diferentes formas de se comprovar a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos (RDC nº 48/04). Entre elas, há a possibilidade de se utilizar as informações disponíveis sobre a tradição de uso da planta para as indicações propostas. Tal fato vem despertando o interesse de diversos pesquisadores que buscam desde o histórico de uso tradicional a novas bases científicas para o uso na indústria farmacêutica.

A espécie medicinal *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, vem sendo usado na medicina tradicional asiática há cerca de dois mil anos (LE COINTE, 1947). Como muitas outras espécies, esta foi introduzida no Brasil no período colonial, se adaptando muito bem ao clima quente e úmido da região Amazônica. No Japão os rizomas são utilizados em conserva e na arte culinária, pois apresentam efeitos medicinais relacionados a doenças hepáticas e renais (CORREA, 1968; ELLIOTT; BRIMACOMBE, 1987; SABU, 2003; BHUIYAN et al., 2009). A espécie *Z. zerumbet* contém o sesquiterpeno zerumbona, substância que apresenta diversas atividades farmacológicas, como: anti-inflamatório, antioxidante, gastroprotetora, antinociceptivo e antibacteriana (PINHEIRO, 2005; YOB et al., 2011; SIDAHMED et al., 2015).

Resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstram a atividade anti-inflamatória e analgésica da zerumbona (substância majoritária do óleo essencial) *in vivo* e em ensaios clínicos de fase 1 (LADEIA, 2015), fato que permitiu a idealização desse projeto, que visa caracterizar o espectro da ação antimicrobiana de forma mais ampla da zerumbona, para fins terapêuticos, em termos de infecções cutâneas. Nesse sentido, é imprescindível o estudo com plantas medicinais, pois além de contribuir com a comunidade científica, poderá trazer benefícios diretos a todas as classes sociais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FAMÍLIA ZINGIBERACEAE

A família Zingiberaceae possui cerca de 53 gêneros e por volta de 1200 espécies. Está presente em todas as regiões dos trópicos (figura 1). Esta família é bem representada pelo gênero *Zingiber*, que é originário do sul e sudoeste da Ásia (KHATUN et al., 2003).

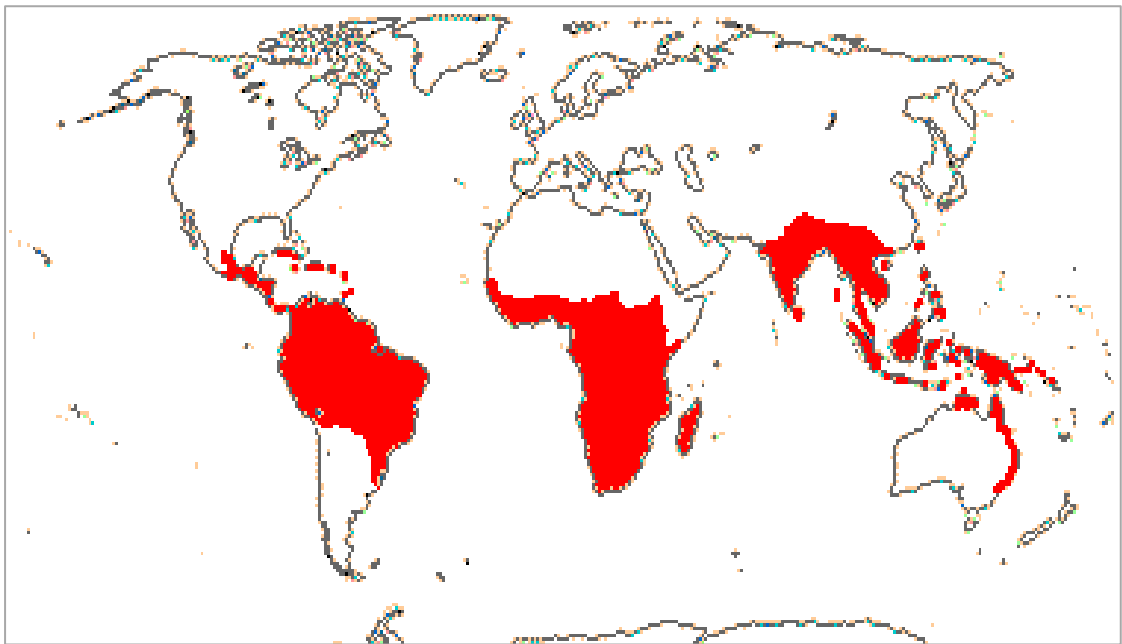


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da família Zingiberaceae

Fonte: Discoverlife, 2015.

As espécies que pertencem ao gênero *Zingiber* são ervas rizomatosas, originárias do sudoeste e norte da Ásia. Nessas regiões, diversas espécies são cultivadas e produzidas em larga escala, pois além de atenderem o comércio local, exportam grande parte dessa matéria prima para países ocidentais, que consomem grandes quantidades de gengibre. O *Zingiber zerumbet* (gengibre amargo) e *Zingiber officinale* (gengibre) são bastante utilizadas na medicina tradicional, em diversos condimentos alimentares, e na forma ornamental. (GOVINDARAJAN, 1982; CHEN et al., 1986; JAMAL et al., 2006; ANDREO; JORGE, 2011).

2.2 *Zingiber zerumbet* (L.) SMITH (GENGIBRE AMARGO).

O *Z. zerumbet* é uma planta perene rizomatosa e bastante ramificada, possui caules eretos com uma média 90 cm de altura. Suas folhas são dísticas, com glabras a pubescentes na parte abaxial, sendo as basilares reduzidas a simples bainhas superiores, terminam com limbo séssil, lanceolado, 25-28 cm de comprimento, 2-3 cm de largura. Suas flores são hermafroditas, zigomorfas, dispostas em espigas elipsoides, como podem ser observados na figura 2 (LE COINTE, 1947; CORREA, 1968).

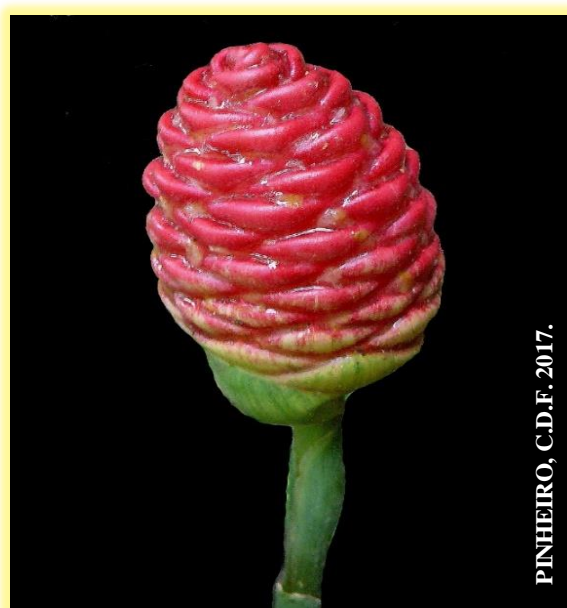


Figura 2. Flor da espécie vegetal *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Suas flores usadas tradicionalmente como ornamentais em diversos países. Possui um líquido viscoso que é utilizado na produção de cosméticos.

Os rizomas do *Z. zerumbet* apresentam corpo alongado, um pouco achatado, como ramos fragmentados irregularmente de três a 16 cm de comprimento, de três a quatro centímetros de largura e dois centímetros de espessura (figura 3). Externamente sua coloração vai do amarelo ouro ao marrom brilhante (BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA, 1983). Além disso, outra característica marcante é o seu odor característico e seu intenso sabor amargo, fato que deu origem ao seu nome popular (gingibre amargo), segundo Pinheiro (2005). Apesar dos rizomas desta espécie vegetal serem morfologicamente similares ao *Zingiber officinale* (gingibre comum), apresentam propriedades químicas e farmacológicas completamente diferentes (YOB et al., 2011).



Figura 3. Rizomas do gengibre amargo. Similar ao gengibre comum, mas suas propriedades organolépticas e farmacológicas são totalmente diferentes. Apresenta ramificações em todo o corpo do rizoma.

Em relação ao uso terapêutico dessa espécie, são os rizomas que estão associados a diversas terapias de uso tradicional. Além do uso regular como aromatizante e condimento na culinária, em diversos países da Ásia, essa parte rizomatosa da planta é utilizada na medicina popular asiática no tratamento de diversas enfermidades, tais como: náuseas, asma, perda de apetite, dispepsia, diarreia, cólicas, câibras, dores de estômago, entorse, infestação por vermes em crianças, tosse, resfriado, sinusite, dor de garganta, enxaqueca, dor de dente, diabetes, inflamações, febre e úlceras (SULTANA; RIPA; HAMID, 2010 e BUTT; SULTAN, 2011).

O uso tradicional desta espécie na medicina popular vem estimulando os estudos com os rizomas do *Z. zerumbet*. Alguns desses trabalhos apresentam a diversidade farmacológica do composto majoritário, a zerumbona (2, 6, 10 - Ciclundecatrien-1-one (2E, 6E, 10E) -, 2, 6, 9, 9-tetrametil), um composto sesquiterpeno monocíclico relatado como o componente farmacologicamente ativo nos óleos essenciais, obtidos a partir dos rizomas desta espécie vegetal (WAHAB et al., 2009).

O gengibre amargo apresenta uma vasta distribuição geográfica, pois é bem adaptado aos climas tropicais, como pode ser observado no mapa abaixo (figura 4). No Brasil é encontrado na região do Tarumã-Mirim e no Puraquequara, áreas rurais da cidade Manaus, Amazonas (KOGA et al., 2016).



Figura 4. Herbários que armazenam a planta *Zingiber zerumbet* L. Smith. Os pontos amarelos representam a localização de cada herbário ao redor do mundo.

Fonte: Discoverlife, 2015.

2.3 ZERUMBONA OBTIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Zingiber zerumbet* (L.) SMITH.

Os óleos essenciais (OE) são fontes de matéria prima para diferentes tipos de indústrias, tais como a farmacêutica, de alimentos e perfumaria. A maioria destes óleos são constituídos de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, estéres e outras substância de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). A obtenção desses óleos é na maioria das vezes pelo método de arraste a vapor. Folhas, caules, flores, sementes e rizomas, são as matérias-primas para a produção dos óleos (BIZZO et al., 2009).

O sesquiterpeno monocíclico Zerumbona obtido dos rizomas do gengibre amargo (figura 5), é o composto majoritário do óleo essencial, sua porcentagem variando de entre 12,6% a 99,99% de pureza (SRIVASTAVA et al., 1997; PINHEIRO, 2005; YU et al., 2008; DAI et al., 2013). Essas grandes variações entre os percentuais de obtenção desse princípio ativo estão diretamente relacionadas aos fatores climáticos, tipos de solo e período de colheita (VENSKUTONIS et al., 1996).

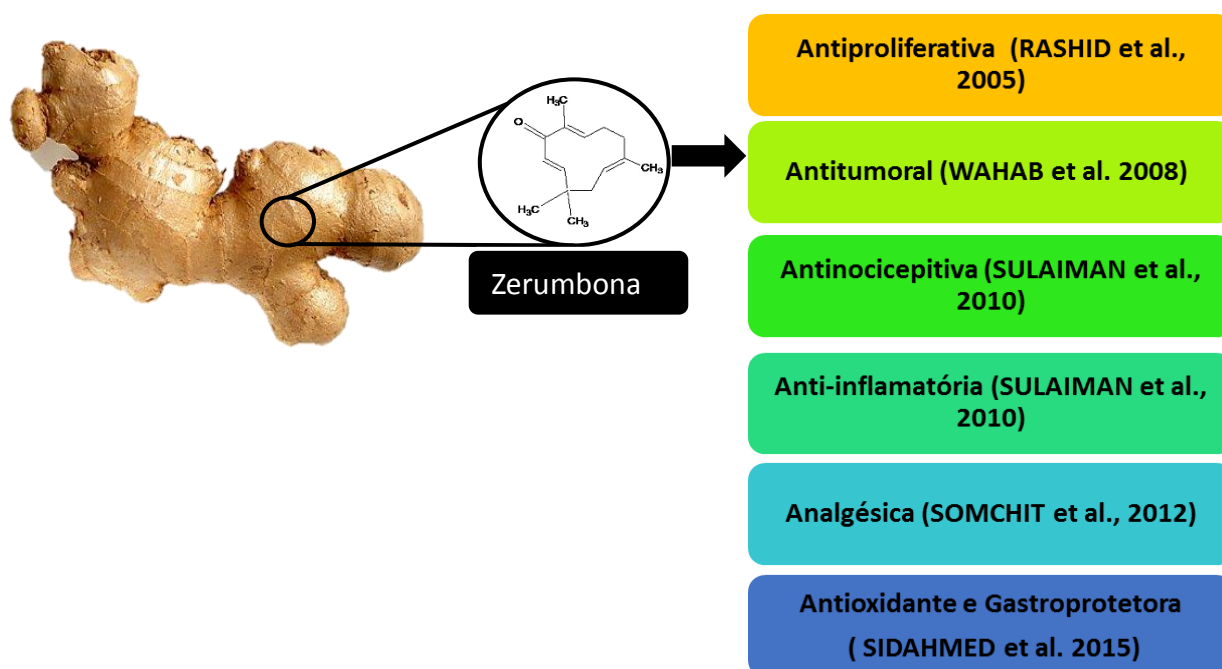


Figura 5. Resumo das propriedades farmacológicas do composto Zerumbona descritas na literatura.

Atualmente, diversos estudos estão sendo direcionados à propriedades farmacológicas da Zerumbona, tais como: antinociceptiva, anti-inflamatória, gastroprotetora, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (MURAKAMI et al., 2002; HUANG et al., 2005; TAKADA et al., 2005; PERISMAL et al., 2010; SIDAHMED et al., 2015). Tais resultados descritos na literatura evidenciam o potencial farmacológico da zerumbona e vem despertando o interesse industrial por startups, que são empresas inovadoras, que vem desenvolvendo vários produtos a partir desse princípio ativo (KOGA et al., 2016).

2.4 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E NEGATIVAS.

O reino monera é composto por dois grandes grupos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essas bactérias apresentam diversas formas: cocos, bacilos e espiraladas. Essas formas podem se agrupar em arranjos, que irão depender do plano de divisão celular (DAVIS, 1979). Esses microrganismos dependem de fatores químicos e físicos para o seu crescimento, como a presença ou ausência de oxigênio e nutrientes básicos para sua replicação (FERREIRA, 2001). As células bacterianas são desprovidas de organelas no seu interior, sendo denominados seres procarióticos. São compostas basicamente de parede celular, membrana plasmática e citoplasma, onde estará disperso o material genético (MURRAY, 2006).

Essas bactérias estão presentes no nosso cotidiano, uma vez que fazem parte da microbiota normal do nosso organismo, dos vegetais, solo e estão presentes em diversos substratos. E ao contrário do que se pensa, grande parte desses microrganismos são benéficos ao homem e ao meio ambiente. Além disso, apresentam uma grande importância econômica, pois a partir de substratos ou até mesmo o próprio microrganismo, são usados na elaboração de bebidas, alimentos, fármacos e em diversas atividades biotecnológicas (SHOKRYAZDAN et al., 2014; DI CERBO et al., 2016).

No entanto, as bactérias patogênicas ao homem, são responsáveis por uma diversidade de infecções, que vão desde uma simples acne ou até mesmo uma septicemia. Tais enfermidades são causadas tanto por bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas (DONKER et al., 2012; LINHARES et al., 2013).

As bactérias gram-positivas são caracterizadas pela presença de uma camada espessa de peptidoglicano e ácidos teicóicos presentes na parede celular, diferentemente da morfologia celular das bactérias gram-negativas (TORTORA, 2005), como podem ser observados na figura 10. Tais características auxiliam na identificação bacteriana, através da técnica de coloração de gram. Dentre os gêneros de importância médica das bactérias gram-positivas, destacam-se o *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (KLINE; LEWIS, 2016).

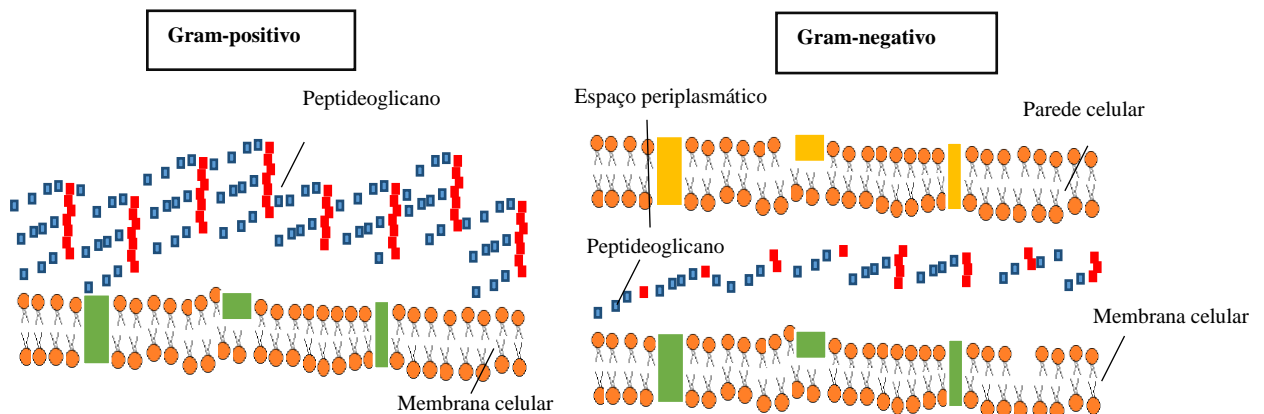


Figura 6. Diferenças morfológicas de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Bactérias gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptidoglicano. Já as bactérias gram-negativas são caracterizadas pela presença do espaço periplasmático e uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), fator que aumentar o potencial de virulência desse grupo bacteriano. (Adaptação do Site-ANVISA).

Cepas bacterianas desses gêneros são frequentes em infecções hospitalares, pois além de fazerem parte da microbiota normal, algumas cepas possuem a característica de formarem biofilmes, como *Staphylococcus aureus*, podendo colonizar diversos substratos, como os materiais cirúrgicos e isso se torna uma via de acesso para esses microrganismos (PERLROTH et al., 2008). Algumas cepas dessa espécie apresentam resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado, gerando uma preocupação global, como *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) (KLEVENS et al., 2007; DELEO et al., 2010)

Já as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa, que consiste de lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos, substâncias que apresentam papel importante, pois aumentam o fator de virulência e diminuem a fagocitose por células apresentadoras de antígenos (OPLUSTIL et al., 2004). Além disso, possuem uma fina camada de peptideoglicano e um espaço periplasmático, que fica entre a membrana externa e a interna. Esse grupo bacteriano apresenta uma família que é composta por espécies que podem causar diversas doenças ao homem, causando graves infecções, até mesmo em ambientes hospitalares (SOULI et al., 2009).

A família Enterobacteriaceae é composta por microrganismos ubíquos, ou seja, estão presentes em vários substratos, como: no solo, na água e na vegetação, além de fazerem parte da microbiota normal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos (TORTORA, 2010). Essa família constitui a maior e mais heterogênea família de bacilos gram-negativos (MURRAY et al., 2002). Essas bactérias causam uma variedade de doenças, tais como infecções intestinais, bacteremia, podendo avançar para uma septicemia, causadas geralmente por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (MARCHAIM et al., 2011).

2.5 INFECÇÕES CUTÂNEAS.

A pele é o maior órgão do corpo humano, composta pela epiderme que apresenta epitélio estratificado, logo abaixo encontra-se a derme constituída por tecido conjuntivo e subjacente a hipoderme, tecido conjuntivo frouxo e adiposo (figura 7). A pele recobre a superfície externa do corpo e apresenta-se como uma barreira física e química contra microrganismos oportunistas como o *Staphylococcus aureus* (LOWY, 1998). O tecido cutâneo também protege o organismo contra a perda de água por dessecação, garantindo o equilíbrio de fluidos e minerais no organismo (homeostasia), liberam secreções através de glândulas exócrinas, mantém a regulação térmica e possuem receptores que comunicam o corpo com o ambiente externo (OVALLE, et al., 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2013; LOWE et al., 2015).

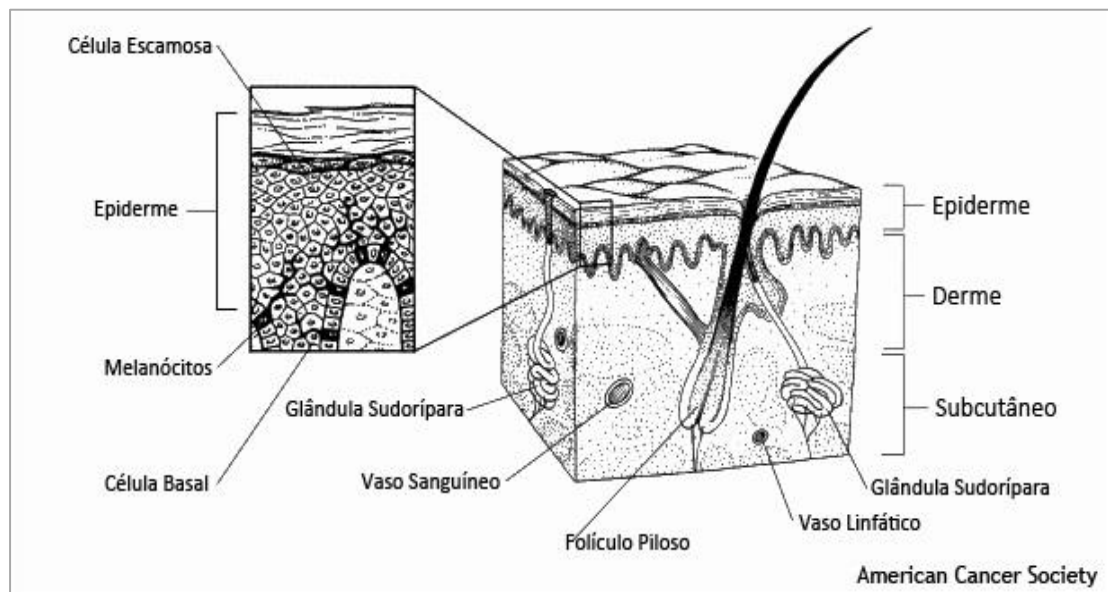


Figura 7. Sistema tegumentar humano e anexos. (Adaptado de American Cancer Society).

O sistema tegumentar humano é colonizado principalmente por bactérias gram-positivas, que fazem parte da microbiota normal, como por exemplo bactérias do gênero *Staphylococcus* (GELATTI et al., 2009). Estas bactérias não apresentam um alto grau de virulência. No entanto, espécies oportunistas tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* e a levedura *Candida albicans* podem causar infecções em diferentes níveis no tecido cutâneo (FRIEDMAN et al., 2013; THANGAMANI et al., 2015). As infecções cutâneas representam cerca de 9% das consultas médicas, e podem variar de quadros leves a graves, como a septicemia, podendo resultar em óbito (SAMPAIO, 2007; CAMPOS, 2008; DEL RIO, 2009).

No final da década de 50, surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* resistente aos antimicrobianos presentes na época, como a penicilina (KLUKA, 2011). Para contornar essa situação foi desenvolvido um antimicrobiano sintético, a meticilina, que é um beta-lactâmico, que age impedindo a síntese de peptidoglicano, componente principal da parede celular bacteriana (GELATTI et al., 2009). No entanto, surgiram cepas resistentes a esses antibióticos, denominadas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) (MANAREY et al., 2004). Com o passar do tempo a resistência se expandiu a tal ponto que algumas cepas são resistentes a praticamente a todos os antimicrobianos disponíveis no mercado (KHAN; KHAN 2016).

A espécie bacteriana *Staphylococcus aureus* é o principal microrganismo encontrado em infecções cutâneas, fato é relacionado principalmente aos seus mecanismos de virulência e

resistência aos antimicrobianos (FOURNIER; PHILPOTT, 2005; KEYNAN; RUBISTEIN, 2013). Entre os mecanismos de virulência, podemos destacar a secreção de toxinas que dificultam a ação do sistema imunológico levando a um processo lento de cicatrização que podem progredir para uma infecção generalizada, uma vez que não for tratada corretamente (MONTGOMERY et al., 2013).

Outra espécie do gênero *Staphylococcus*, o *Staphylococcus epidermidis* que é principal responsável pela rosácea, uma doença de pele comum, caracterizada pela vermelhidão no rosto, muitas vezes confundida com queimaduras (WILKIN, 2002). Esta doença acomete cerca de 45 milhões de pessoas em todo o mundo, e se não for tratada pode gerar uma série de complicações, como a baixa autoestima pelo paciente (WHITFELD, 2011).

A espécie bacteriana *Propionibacterium acnes* é encontrada em culturas de tecidos cutâneos com rosácea (BOJAR; HOLLAND, 2004). No entanto *P. acnes* é o principal agente etiológico da acne, doença que atinge cerca de 80% a 90% dos adolescentes e 5 a 30% dos adultos (SAKAMOTO et al., 2010). Apesar de aparentemente não apresentar riscos diretos à saúde, estão ligadas a distúrbios psicossociais que afetam a autoestima, levando à depressão e até mesmo ao suicídio (STERN et al., 2011).

Outro microrganismo frequentemente observado em infecções cutâneas, principalmente por pacientes portadores com *diabetes mellitus* e HIV, é a levedura *Candida albicans*. A candidíase cutânea, doença ocasionada por esse fungo, ocorre com frequência em regiões quentes e úmidas, principalmente de climas tropicais, pois essas condições são favoráveis para o seu desenvolvimento (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade da busca constante de novos antimicrobianos em decorrência principalmente ao progressivo aumento da resistência bacteriana aos fármacos comerciais disponíveis, fato que tem prejudicado a custo-efetividade de diversos tratamentos para infecções microbianas.

2.5.1 PRINCIPAIS INFECÇÕES CUTÂNEAS.

2.5.1.1 Acne vulgar

A acne vulgar é uma doença dermatológica que é comum entre os adolescentes, no entanto em alguns casos pode permanecer até a fase adulta. Cerca de 80% da população mundial é acometida por esta doença, podendo gerar um desconforto entre os pacientes, como marcas permanentes na face, alterando a autoestima, fato que pode interferir na vida social (HALVORSEN et al., 2011; ELSAIE, 2016). A acne é caracterizada pelo entupimento do folículo

sebáceo, que apresenta fisiopatologia decorrente de diversos fatores, tais como: genético, hormonal, hiperprodução sebácea, hiperqueratinização folicular. Esses fatores favorecem o aumento da colonização de bactérias gram-positivas, como *Propionibacterium acnes* no ducto glandular, como pode ser observado na figura 8 (SIMPSON; CUNLIFFE, 2004; COSTA et al., 2007; SILVA et al., 2014; SUH et al.; KWON 2015).

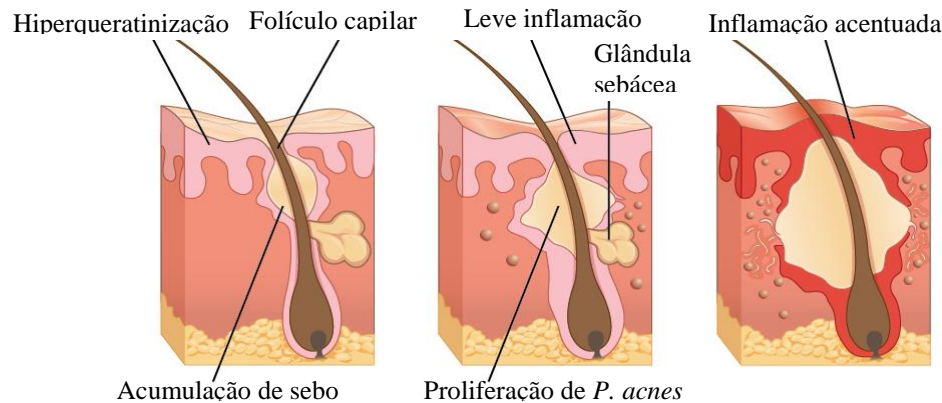


Figura 8. Formação da acne vulgar. Proliferação do *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), região sebácea resultando em inflamação local e formação de pústulas características. (<http://rejuvimed.com/acne.php>).

O *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) é o principal agente etiológico da acne. Cerca de 50 % das infecções da face são desencadeadas por este microrganismo (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2010). Esta espécie bacteriana é gram-positiva, fastidiosa, anaeróbica, caracterizada microscopicamente por bacilos curtos e imóveis (SIMPSON et al., 2011; ALEXEYEV; JAHNS, 2012). *P. acnes* utiliza carboidratos como fonte de energia, produzindo ácido propiônico como produto final de fermentação, característica que determinou o nome científico desta espécie (MARTIN DWORKIN, 2006). O *P. acnes* é uma bactéria oportunista, que se prolifera mediante ao aumento de sebo nesses folículos, produzindo ácidos graxos livres que causam irritação a parede folicular distendida (VAZ et al., 2003; GRICE; SEGRE, 2011).

O tratamento da acne pode ser realizado através de antimicrobianos, tanto por via oral ou formulações dérmicas. No entanto, esses medicamentos alteram a microbiota normal da pele, causando efeitos colaterais expressivos. Além disso, estudos realizados por Dessinioti et al. (2010) mostram que o uso dos antimicrobianos convencionais são eficazes nas primeiras aplicações, pois em seguida esses microrganismos adquirem resistência, diminuindo a efetividade do produto. Isso vem contribuindo para o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibacterianos disponíveis no mercado. Esta situação tem desencadeado uma busca constante por novos

princípios ativos com atividade antimicrobiana, principalmente os derivados de produtos naturais (VIYOCH, 2006; ZU et al., 2010; SINHA et al., 2014).

2.5.1.2 Furúnculo

O furúnculo é uma doença de pele, ocasionada pela infecção do folículo capilar, levando a formação de abscessos, comprometendo os tecidos subcutâneos adjacentes e que em sua grande maioria, ocasionados pela espécie bacteriana *Staphylococcus aureus* (DAHL, 1987). Outras espécies do gênero *Staphylococcus* são encontrados nessas infecções cutâneas como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus pyogenes* (EL-GILANY, 2009). Essa infecção cutânea é caracterizada pela formação de um eritema, bastante doloroso, em decorrência do processo inflamatório, que quando se rompe libera um conteúdo necrótico e purulento (DEMOS et al., 2012).

O aparecimento de furúnculos em várias regiões do corpo é denominado furunculose. Os locais de maior prevalência são as regiões intertriginosas, como: as axilas, nádegas e as coxas, e a face (IBLER, 2014). Esses sintomas podem persistirem por semanas e até meses, apresentando uma difícil resolução clínica. Isso prejudica a vida social do paciente, pois além de fortes dores, afeta a estética corporal, levando a baixa autoestima (ONDERDIJK, 2013).

No trabalho realizado por El-Gilany et al. (2009), com um número de 74 pacientes, divididos em com furunculose recorrente e não recorrente, apontam que o contato físico direto com pacientes infectados, principalmente familiares, é fator de risco para o desenvolvimento de furunculose. Infecções cutâneas estabelecidas na literatura como as dermatites atópicas, úlceras nos membros inferiores e feridas crônicas, aumentam a susceptibilidade da colonização bacteriana nesses tecidos, tornando esses indivíduos mais propensos ao aparecimento de furúnculos (HOEGGER, 2004). Outro aspecto discutido é a deficiência da proteína Lectina Ligante de Manose (MBL), está apresenta um papel fundamental no sistema imunológico, uma vez que é a proteína central da ativação da via de lectinas do sistema complemento (CARVALHO, 2005; DEMIRCA Y et al., 2005). Tal situação prejudica a ação dos neutrófilos aumentando à predisposição a furunculose (KARS et al., 2005; GILAD et al., 2006).

Uma preocupação em relação a essa doença é o surgimento de *S. aureus* MRSA, pois estas cepas bacterianas possuem um alto grau de resistência, apresentando geralmente uma furunculose persistente (MORAN, 2006; MOELLERNING, 2008; JENKINS et al., 2015). Estas bactérias representam um grave problema de saúde pública em vários países, inclusive o Brasil, pois a

dificuldade no tratamento e a potencial evolução para infecções graves em decorrência do alto grau de virulência apresentados por estes microrganismos (FRAZEE et al., 2005).

2.5.1.3 Impetigo não bolhoso

O impetigo não bolhoso é uma doença de pele causada por bactérias, geralmente por *Staphylococcus aureus*. Essa doença é caracterizada por lesões superficiais na pele, com pústulas e eritema no centro da lesão, formando crostas ao redor do ferimento (figura 9), características básicas que auxiliam na resolução do quadro clínico (PEREIRA, 2014).



Figura 9. Impetigo-Úlceras na face, com eritema no centro das lesões.

Fonte: Pereira, 2014.

O impetigo é uma infecção cutânea muito comum, afetando principalmente crianças maiores de dois anos de idade, mas podem acometer adultos (CHILLER et al., 2001). Essa infecção superficial pode ser derivada de um ferimento preexistente, picadas de insetos, pela falta de higiene, desnutrição ou até mesmo o simples ato de coçar. Abrindo uma porta de entrada para a proliferação desses microrganismos (MANCINI, 2000; RODRIGUES et al., 2010).

Os pacientes acometidos com impetigo devem manter os ferimentos limpos, fazer assepsia no local com água morna, sabão comum, com o auxílio de antissépticos, tais recomendações são realizadas por grande parte dos dermatologistas (PEREIRA, 2014). No entanto, os estudos realizados por Koning et al. (2012) não recomendam o uso de antissépticos, nessas lesões. Uma vez que os usos desses produtos podem auxiliar na resistência bacteriana.

A antibioticoterapia é usada no tratamento do impetigo, tanto por via oral como o uso tópico. Todavia, cepas resistentes de *S. aureus*, vem dificultando o tratamento desta doença, devido

principalmente a produção de enzimas que degradam os antibióticos, como as beta-lactamases (KLUYTMANS-VANDENBERGH et al., 2006; DEL GIUDICE et al., 2010). O aumento significativo de cepas produtoras de beta-lactamases nos últimos anos tem gerado grande preocupação em relação ao tratamento desta e de outras infecções cutâneas (BANGERT et al., 2012; PETRY et al., 2012; TONG et al., 2015).

2.5.1.4 Septicemia causada por *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por espécies bacterianas gram-positivas, apresentando uma morfologia de cocos, estes por sua vez se dividem em planos perpendiculares, formando frequentemente agrupamentos irregulares, como cachos de uvas (OWENS; NICKERSON, 1989; KONEMAN et al., 2008). Este gênero é formado por 33 espécies de importância médica, destacando-se *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) como a espécie de maior interesse médico (CASSETARI et al., 2005; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

O *S. aureus* está presente na microbiota normal dos seres humanos, podendo ser encontrado fossas nas nasais, intestino e a pele (CAVALCANTI, 2005). No entanto, quando as barreiras naturais do organismo sofrem algum trauma, como uma lesão cutânea, isso propicia a entrada desse microrganismo no tecido, podendo levar a uma infecção simples ou até mesmo atingir diversos órgãos, ocasionando uma septicemia (VAN HAL et al., 2012; CREECH et al., 2015).

Septicemia ocasionada por *S. aureus* é muito frequente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), pois estes pacientes estão muito vulneráveis, considerando que este microrganismo possui mecanismos de adesão, formando biofilmes em materiais cirúrgicos, como sondas e cateteres (FOSTER, 1998; ARCHER et al., 2011). Uma vez que o *S. aureus* atinge a corrente sanguínea, este microrganismos pode atingir e danificar diversos órgãos vitais como: o coração, pulmão, rins e até mesmo o cérebro (DAVIS, 2005; PARKER; PRINCE, 2012).

Por apresentar estruturas de adesão e fixação, como as adesinas, o *S. aureus* é capaz de colonizar diversas superfícies. Esta bactéria é frequente em infecções ósseas, ou até mesmo em próteses, isso dificulta o tratamento, levando a um longo período de antibioticoterapia (CRAMTON et al., 1999; KRISTIAN et al., 2004; PRABHAKARA et al., 2011). A dificuldade no tratamento de infecções causadas pelo *S. aureus*, ocorre devido ao surgimento de cepas multi-resistentes (MANAREY et al., 2004; ROBB; BENDIG, 2010).

Esses microrganismos possuem mecanismos que driblam a ação dos antibióticos, como a produção de enzimas, que degradam as moléculas com o potencial antimicrobiano (HERIGON et al., 2010). Essa situação é observada em diferentes espécies bacterianas, como em cepas de *S. aureus* (JANG et al., 2004; THOMASON et al., 2007; PARK et al., 2008; KLEIN; CHAN, 2010;

TOMMASI et al., 2015). Tal fato vem impulsionando o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que essa situação é uma preocupação de caráter mundial (MOHAMED et al., 2016; VUONG et al., 2016).

2.5.1.5 Candidíase cutânea

A candidíase é uma doença causada por leveduras do gênero *Candida*, com maior incidência da espécie *Candida albicans*, com cerca de 60% das espécies isoladas de análises clínicas (NIEWERTH; KORTING, 2002; DUGGAN et al., 2015). Espécies desse gênero apresentam um pseudomicélio e se reproduzem por brotamento. Suas colônias apresentam uma coloração branca, caracterizadas por uma membrana de superfície rugosa ou lisa (MENDES et al., 2005). Essas leveduras apresentam uma grande importância clínica, uma vez que causam frequentes infecções ao homem (BARBEDO et al., 2010).

As micoses causadas por *C. albicans* apresentam três tipos de manifestações clínicas: monocutâneas, cutânea e sistêmica. A monocutânea, conhecida como “sapinho” acomete a cavidade vaginal e oral, sendo a forma mais comum em seres humanos, como podem ser observadas na figura 10 (KONEMAN et al., 2008). Cerca de 30% das mulheres apresentam uma colonização assintomática por *Candida* na cavidade vaginal, no entanto, cerca de 70% dessas mulheres já apresentaram algum sintoma durante a vida (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Apesar de fazer parte da microbiota normal, é um agente etiológico oportunista, onde alterações do pH no canal vaginal, lesões ou até mesmo cirurgias invasivas, propiciam a proliferação desse fungo (RIBEIRO et al., 2004; MAYER et al., 2013).



Figura 10. Infecções mucosais ocasionadas por *Candida*-sp. A Infecção monocutânea na cavidade oral; B. Infecção na cavidade vaginal, ambas causadas por *Candida* sp.

Fonte: Armstrong et al., 2016.

As infecções cutâneas causadas por essas leveduras ocorrem geralmente em regiões intertriginosas, como: axilas, virilha, nos seios, e nádegas. Em neonatos é muito frequente, pois o uso de fraldas pode gerar erupções, causadas por esse fungo (RUHNKE, 2002). Outro ponto a ser discutido é a prevalência em pessoas com algum distúrbio genético, relacionados às funções de leucócitos e do sistema endócrino (PAPPAS et al. 2009). Apesar de ser um microrganismo comensal, o desequilíbrio imunológico resulta na proliferação deste microorganismo e, conseqüentemente, em danos ao hospedeiro (DIEKEMA, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2010).

Apesar de não serem muito observadas, essas infecções podem se agravar, principalmente em pacientes imunodeprimidos, levando uma infecção sistêmica, atingindo vários órgãos, como: o coração, pulmões, fígado, rins e até mesmo os olhos (MENEZES et al., 2004; NOBILE; JOHNSON, 2015). Nos trabalhos realizados por Larbcharoensub et al. (2010) e Ariff et al. (2011), os autores mostram que essas infecções micóticas podem ocorrer a partir dos tratos gastrointestinais, respiratórios ou válvulas cardíacas, podendo alcançar as meninges, levando o paciente a uma meningite.

O tratamento para candidíase é a base de antifúngicos de administração sistêmica, tais como fluconazol e cetoconazol, ou de administração tópica tais como, nistatina, terconazol, tioconazol e miconazol (BERGER; SHELBERNE, 2013). O tratamento pode ser de dose única ou durar quatorze dias, dependendo do tipo de manifestação clínica (SOGINIG, 2012).

2.5.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A frequência com que os microrganismos estão adquirindo resistência está cada vez mais rápida e isso ocorre principalmente em decorrência de um fenômeno genético, relacionado com alteração de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem à ação das drogas, como podem ser observadas na figura 11 (GOLL; FARIA, 2014).

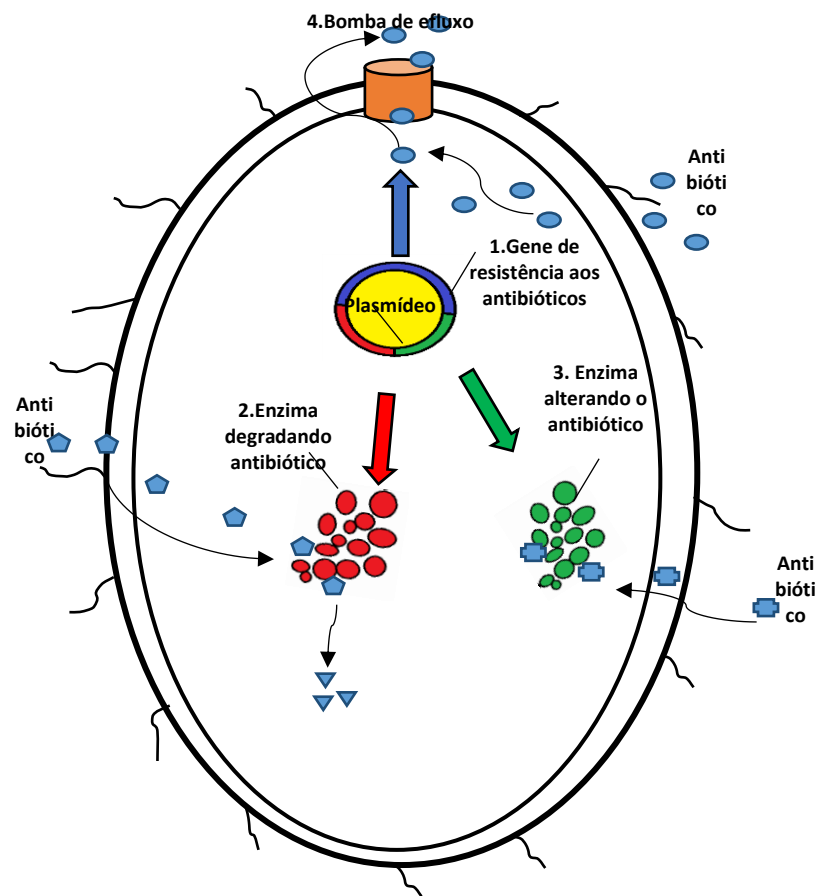


Figura 11. Mecanismos clássicos de resistência bacteriana aos antibióticos. 1- Plasmídeo, pequeno fragmento do DNA bacteriano contém genes de resistência bacteriana. 2-Enzimas ligando-se aos antibióticos, degradando-os. 3-Enzimas inativando o potencial de ação dos antimicrobianos. 4-Bomba de efluxo, a substância entra no meio intracelular bacteriano, no entanto é expulso por este mecanismo de resistência.

Estes mecanismos de ação podem ser: interferência na síntese da parede celular; inibição da síntese de proteína; interferência na síntese de ácido nucléico; diminuição da permeabilidade ao agente antimicrobiano e destruição da estrutura da membrana celular (TENOVER, 2006; ANVISA, 2016).

Apesar da vasta quantidade de antibióticos comerciais, a velocidade com que a resistência bacteriana aumenta é muito maior do que o surgimento de novas drogas eficientes. O grande número de microrganismos gram-positivos e gram-negativos multi-resistentes de importância clínica representa um grande desafio terapêutico (ROSSI et al., 2005). Nas últimas décadas o enfoque dado para o controle de infecções causadas por bactérias gram-negativas, pode ter contribuído para o surgimento de bactérias gram positivas multirresistentes, principalmente *Staphylococcus* resistentes a metilina (MRSA) (LOWY et al., 1998; SANTOS et al., 2002; SHENG et al., 2013).

Essa situação vem dificultando os tratamentos de diferentes enfermidades, como as infecções cutâneas, causadas por esses microrganismos multi-drogas resistente (MORAN et al., 2006; FURUKAWA et al., 2008; TONG et al., 2015). Isso vem dificultando os tratamentos, tornando-os mais longos e dolorosos ao paciente, além de gerar altos custos aos sistemas públicos de saúde (GELLATI et al., 2009; RAZERA et al., 2009). Dessa forma, fica evidente a importância de estudo científicos, como base para novas alternativas terapêuticas.

2.5.3 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Desde a antiguidade, as plantas são classificadas como comestíveis, as que aliviavam as dores e combatiam as doenças. Este fato é evidenciado em diversas culturas onde o homem passou a dominar o conhecimento de plantas e ervas, e este conhecimento foi passado de geração em geração.

As plantas passaram por um longo processo evolutivo, e diversos mecanismos foram adaptadas para competir e se defender de herbívoros. Dessa forma, passaram a produzir suas defesas químicas, produzindo metabólitos secundários que atuam em alvo específico dos seus predadores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em contrapartida, essas biomoléculas podem ser utilizadas no tratamento de diversas doenças que acometem o homem, inclusive contra infecções cutâneas (FERREIRA, et al., 2010). O conhecimento tradicional sobre as propriedades medicinais das plantas tem sido essencial para o desenvolvimento de pesquisas científicas como as realizadas por Garros et al. (2006) e Kacerovská et al. (2008), que demonstram a importância da utilização de extratos vegetais, para o tratamento *in vivo* de lesões cutâneas. Assim o conhecimento tácito é essencial nas pesquisas que utilizam produtos naturais, pois servem de base para os pesquisadores elucidarem quais moléculas possuem efeitos benéficos ou nocivos ao organismo (DUAILIBE et al., 2005; BARBOSA et al., 2009).

Os fitoterápicos são caracterizados pela ação de moléculas bioativas, compostos exclusivamente de matérias-primas de origem vegetal, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (CARVALHO et al., 2008). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) normatiza os produtos fitoterápicos. Para atingir esse objetivo, a ANVISA determinou o registro dos fitoterápicos, de acordo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das

espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2004).

O mercado de fitoterápicos é crescente em todo o mundo, pois os produtos naturais têm como característica principal os poucos efeitos colaterais, sendo requeridos cada vez mais como uma alternativa terapêutica. Isso vem representando uma boa parcela na indústria de medicamentos, que movimenta bilhões de dólares em todo o mundo. No Brasil este setor é promissor, pois o país apresenta uma grande biodiversidade ainda não explorada (SIMÕES, 2002; BRASIL, 2004; KLEIN et al., 2010; DE LIMA et al., 2013).

Em contrapartida, os poucos investimentos governamentais e a falta de pesquisa e desenvolvimento nesse setor, atrasam o crescimento de fitoterápicos no Brasil. Outro ponto a ser abordado é a parceria com de instituições privadas com o meio acadêmico. Ao contrário dos países desenvolvidos, poucas parcerias são encontradas em pesquisa e desenvolvimento, e muitos trabalhos não passam de uma patente, sem qualquer perspectiva de lançar um produto ou processo no mercado (ALVES, 2013; BHAGAVATHULA; ELNOUR, 2016).

É importante ressaltar que atualmente, mesmo com um conhecimento tradicional bem consolidado, e com estudos descritos na literatura em relação da eficácia de fitoterápicos disponíveis no mercado, grande parte dos profissionais da saúde não usa essa alternativa terapêutica. Contudo, para que haja uma utilização responsável, faz-se necessário a promoção de estudos científicos que permitam a utilização de produtos fitoterápicos de forma eficiente e segura, pois o uso arbitrário desses medicamentos, em sua grande maioria indicados por terceiros, pode resultar em graves consequências à saúde. Essa prática é comumente evidenciada pela mídia, que exalta o uso de medicamentos naturais, sem o cuidado necessário. Tal fato pode levar a efeitos colaterais severos, pois apesar de ser um produto natural seus compostos ativos se administrado em concentrações inadequadas podem causar sérios danos a saúde do indivíduo ou até mesmo resultar em óbito (VEIGA JR. et al., 2005; VARELA; AZEVEDO, 2014).

Diante do contexto apresentado acima, este estudo tem como principal objetivo fornecer base científica relacionada ao potencial terapêutico do sesquiterpeno zerumbona, visando o desenvolvimento futuro de fitoterápicos para o tratamento tópico de infecções cutâneas. Desta forma, além do benefício científico, este estudo também tem um apelo social uma vez que a sociedade será beneficiada, pois a maioria das pomadas, cremes ou loção utilizada no tratamento de muitas patologias dermatológicas não apresentam custo-benefício satisfatório.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial antimicrobiano do sesquiterpeno zerumbona como princípio bioativo para o tratamento de infecções cutâneas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter o princípio ativo zerumbona, para a realização dos ensaios biológicos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da zerumbona obtida do *Zingiber zerumbet* para as seguintes espécies microbianas: *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*;
- Avaliar a eficácia da zerumbona como agente antimicrobiano por meio da avaliação da atividade bactericida em função do tempo;
- Verificar o potencial antioxidante da zerumbona *in vitro*;
- Avaliar a atividade citotóxica da zerumbona sobre células de linhagem contínuas;
- Avaliar a atividade anti-biofilme da zerumbona.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO do *Zingiber zerumbet* (L.) SMITH.

Os rizomas de *Z. zerumbet* foram coletados em área rural da cidade de Manaus/AM, situado na BR-174, Km 21, ramal do Pau-Rosa, conforme a localização geográfica, nos pontos P01 a P04 Latitude 2; Latitude 24132,03789 S e Longitude: 600931,40854 W. Em seguida uma exsicata foi enviada ao herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), para sua identificação. Esta foi comparada com a exsicata identificada pelo Prof. Dr. Paul Maas (Departament of Plant Ecology and Evolucionary Biology; Herbarium University of Utrecht), que está depositada no herbário sob n° 186913.

4.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.

4.2.1 Hidrodestilação

A extração do óleo essencial (O.E) foi realizada no Laboratório Temático de Química e Produtos Naturais/INPA. Para a obtenção O.E foram utilizados os rizomas da espécie vegetal, usando a técnica de extração por hidrodestilação. Após a identificação do material botânico, foi realizada a higienização, em seguida este material foi triturado e seco em temperatura ambiente. Foi utilizado o aparelho Clevenger, acoplado há um balão de 2000 mL, utilizando a proporção de 1:4 do material triturado em água destilada, sendo aquecido em uma manta aquecedora. A extração foi feita durante 6 h contadas a partir da ebulição da amostra. O óleo essencial foi coletado do condensador. Todo o sistema é protegido da luz por meio de papel alumínio e o óleo essencial foi armazenado em frascos âmbar, de acordo com a metodologia de Matos (1980). Os óleos essenciais foram submetidos à recristalização e submetidos às análises cromatográficas e espectroscópicas, para a determinação dos teores de zerumbona.

4.2.2 Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massa

As identificações dos constituintes do óleo essencial foram realizadas calculando os tempos de retenção obtidos nas análises da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) correlacionando-os com os tempos de retenção dos n-alcenos (C9-C30), encontrando-se assim os índices de retenção dos constituintes presentes nos óleos essenciais. Os índices foram comparados com os dados disponíveis na biblioteca NIST/WILEY, juntamente com a literatura Adams (ADAMS, 2007). Para o cálculo dos índices foi utilizado a fórmula de Kovatz (IR_k) descrita a seguir (AL-TAMEME, et al., 2015):

$$IR_k = 100.n ((TR_{sub} - TR_{hidant}) / (TR_{hidpost} - TR_{hidant})) + 100.n^{\circ} C_{hidant}$$

Onde:

- IR_k = Índice de retenção de Kovatz
- n = Diferença entre o número de carbonos imediatamente anterior e posterior à substância que se quer determinar.
- TR_{sub} = Tempo de retenção da substância que se deseja encontrar.
- TR_{hidant} = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior a substância que se deseja encontrar.
- $TR_{hidpost}$ = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior a substância que se deseja encontrar.
- C_{hidant} = Número do carbono anterior à substância que se deseja encontrar.

4.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE

Após o processo de recristalização do O.E (n° PI-0505343-9/28/11/2007), os teores de zerumbona foram determinados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE, no equipamento Accela High Speed LC (Thermo Scientific®), coluna Hypersil Gold (50 x 2,1 mm) e fase móvel metanol água (85:15, v/v) a 1 mL/min. A identificação foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos e confirmada pelo espectro de absorção no UV (~252 nm) (PINHEIRO, 2005).

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.4 Cepas bacterianas

Para a atividade antibacteriana foram utilizadas cepas padrões das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 80958, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 e isolados clínicos de *S. aureus*. A atividade antimicrobiana da zerumbona foi avaliada pelo o método difusão por cavidade-placa e microdiuição (MCCUTCHEON, et al., 1992; BAUER, et al., 1966; HABSAD, 2000; HERNÁNDEZ, 2000; CLSI, 2012).

4.2.5 Padronização do Inóculo

As cepas bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) em um tubo de ensaio estéril (LORIAN; 1979; WALUSCHKA, 1979). A cepa de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, foi incubado a uma temperatura de 37°C por 120 horas em condições de anaerobiose. As demais cepas testadas foram incubadas na mesma temperatura por 24 horas, em aerobiose.

Após esse período, por meio de espectrofotometria, foi determinada a turbidez adequada dos inóculos, que foi ajustada para corresponder ao tubo n° 0,5 da escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) no intuito de se obter concentrações bacterianas finais de 1×10^5 UFC/mL, as quais foram utilizadas para determinação da atividade antimicrobiana da zerumbona.

4.2.6 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da zerumbona foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) por meio de uma adaptação da técnica de difusão por cavidade-placa e microdiluição de acordo com as normas preconizadas pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).

4.2.6.1 Microdiluição em placa de 96 poços

Em resumo, realizou-se a diluição seriada dos cristais de sesquiterpeno zerumbona em microplaca de polietileno de 96 poços, iniciando a partir da concentração de zerumbona de 2000 µg/mL. As concentrações testadas foram, 2000; 1000; 500; 250 e 125 µg/mL. Após a diluição, 100µL dos inóculos bacterianos (1×10^5 UFC/mL) foram adicionados aos poços contendo as concentrações de zerumbona acima descritas. Tween 20 (10%) que corresponde ao veículo de dissolução dos cristais utilizados, assim como meio de cultura apenas com inóculo, foram utilizados como controle.

As placas de microdiluição foram então incubadas em estufa com plataforma de agitação orbital (shaker) a 150 RPM/37°C durante 120 horas em condições anaeróbicas (jarra anaeróbica), para a cepa *P. acnes* e para demais cepas bacterianas, no período de 24 horas em condições aeróbicas. Após esse período, a placa foi submetida análise de espectrometria (600 nm) para a avaliação do crescimento bacteriano com base na turbidez da amostra. Em seguida, uma alíquota de 50µL de cada poço foi coletada e semeada em placas contendo ágar BHI, que foram posteriormente incubadas, nas condições descritas acima. Ao fim do período

de incubação, as placas foram analisadas quanto ao crescimento bacteriano por meio da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) para determinação da CIM e CBM. Todos os testes foram realizados o mínimo de três ensaios em triplicata.

4.2.6.2 Método de difusão cavidade-placa

Foram feitos orifícios equidistantes em placas de Petri, com meio ágar triptona de soja (TSA), para a cepa de *P. acnes* e meio ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) para as demais cepas bacterianas testadas. Diferentes concentrações da zerumbona foram incorporadas ao meio (2000; 1000; 500; 250 e 125 µg/mL). Em seguida 3-4 microlitros dos inóculos previamente preparados (aproximadamente 10^5 UFC) foram dispensados nos orifícios. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 37°C durante 7 a 10 dias em condições de anaerobiose, para *P. acnes* e em condições aeróbicas (24 horas, 37°C) para as demais cepas testadas. Após este período, foi realizada a leitura das placas.

4.2.6.2.3 Cinética de morte microbiana

Para avaliar a eficácia da atividade bactericida da zerumbona em função do tempo foi realizada a curva da cinética de morte microbiana apenas para as cepas bacterianas de *P. acnes* e *S. aureus*, devido ter sido mais sensíveis à atividade antimicrobiana da zerumbona. Em resumo, um inóculo bacteriano equivalente a 1×10^5 UFC/mL foi cultivado em aerobiose ou anaerobiose a 37°C por 120 horas ou 18/24 horas, em 3 mL de caldo BHI em estufa com rotação orbital de 150 RPM, na presença da zerumbona nas concentrações correspondentes a CIM e CBM.

Uma alíquota de 100µL dos inóculos foi coletada, centrifugadas (21.952 G/5min) e ressuspendidas em solução salina nos seguintes intervalos de tempo de incubação: 0; 30; 60; 120 e 150 horas, para *P. acnes*. E para a cepa de *S. aureus*, nos intervalos de tempo 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 h. Essas alíquotas foram então serialmente diluídas em solução salina e semeadas em placas de ágar BHI, que foram posteriormente incubadas nas condições descritas acima. Após esse período, o número viável de células bacterianas foi estimado por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), presentes na placa, multiplicado pelos fatores de diluição. A contagem das colônias foi realizada em triplicata e a curva da cinética de morte microbiana foi construída de acordo com o método que utiliza \log_{10} UFC/mL versus o tempo (KUMAR et al., 2014). A atividade bactericida foi definida pela redução de 99,9% ($\geq 3\log_{10}$) do número total de UFC/mL do inóculo original.

4.2.6.2.4 Ação antibiofilme da zerumbona

Para este teste, foram selecionadas as cepas bacterianas que tiveram seu crescimento inibido pela zerumbona e que são formadoras de biofilmes.

4.2.6.2.5 Interferência na formação de biofilme

Após a padronização, uma alíquota de 100µL (1×10^5 UFC/mL) do inóculo bacteriano foi cultivado em 100µL do meio de cultura (BHI) contendo diferentes concentrações de zerumbona (2000; 1000; 500; 250 e 125 µg/mL) em microplaca de 96 poços, para verificar a interferência na formação do biofilme.

A placa de 96 poços foi incubada em estufa com rotação orbital a 150 RPM, na temperatura de 37°C, no período de 24/48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi aspirado e lavado 3 vezes com PBS e em seguida, foi adicionado 150µL de metanol, com posterior incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação, o metanol foi descartado e foi adicionado 150µL de violeta de genciana (2%), seguida por incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a placa foi lavada com água destilada, para retirada do excesso de corante. Após a lavagem, 100µL ácido acético (33 %) foi adicionado. Após 20 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro ELISA ~630 nm.

4.2.6.2.6 Degradação do biofilme

Para verificar a degradação do biofilme já formado, 200µL do inóculo bacteriano (1×10^5 UFC/mL) foram adicionados em microplaca de 96 poços que foi incubada por um período de 48 horas, para que pudesse ocorrer a formação do biofilme. Após a formação do biofilme, o sobrenadante foi aspirado e os poços foram tratados (200µL) contendo diferentes concentrações de zerumbona de (2000; 1000; 500; 250 e 125µg/mL).

A placa de 96 poços foi incubada em estufa com rotação orbital a 150 RPM, na temperatura de 37°C, no período de 48 horas. Como controle negativo, foi utilizado Tween 20 (10%) que corresponde ao veículo de dissolução utilizado ou apenas meio BHI. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os poços submetidos ao ensaio de coloração de gram, descrito acima.

4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.3.1 Cepa fúngica

Para a atividade antifúngica utilizou-se a cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 36232. Tal atividade, avaliada através do método de microdiluição, de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI (2012).

4.3.2 Padronização no inóculo

A levedura *Candida albicans* (ATCC 36232) foi cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose - ASD (Difco® - France), durante 24 horas a 35°C. Após esse período, foram selecionadas duas colônias com diâmetro de 1mm e suspensas em 5ml de PBS estéril. Em seguida, a suspensão foi agitada no vórtex por 15 segundos, após esse período foi coletada uma alíquota de 10µL e levada para câmara de Neubauer, onde realizou-se a contagem de Unidades formadoras de Colônias (UFC), com intuito de obter uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ células/mL, conforme descrito previamente (KONEMAN et al., 2008; CLSI, 2012).

4.3.3 Determinação da atividade antifúngica

A zerumbona foi testada nas seguintes concentrações: 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025mg/mL, com a solução estoque contendo dimetilsufóxido (DMSO) à 10%, diluído em meio de cultura RPMI. Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a zerumbona foi diluída de forma seriada, mediante emprego da técnica da microdiluição (CLSI, 2012).

A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços. Meio de cultura sem zerumbona e com DMSO (10%) foram utilizados como controles. Os testes para determinação da CIM foram realizados em triplicata. Em cada um dos poços das placas de microdiluição, foram inseridos 100 µL de meio RPMI. Em seguida, 100 µL das concentrações da zerumbona, derivado das diluições seriadas. Posteriormente, 10 µL da suspensão dos microrganismos ($2,5 \times 10^3$ células/mL) são inseridas em todos os poços. As placas foram incubadas a 35° C, por 24 horas. A CIM corresponde à última diluição da na qual não foi verificada a presença de precipitado microbiano ou turvação no meio de cultura após o período de incubação.

4.3.4 Ensaios preliminares dos mecanismos de ação

4.3.5 Ensaio proteção do sorbitol

Com o objetivo de avaliar a interferência da zerumbona na formação da parede celular fúngica foi avaliada a influência do sorbitol, que é um osmoprotetor, no crescimento de uma levedura oportunista. Valores da CIM foram determinados utilizando a levedura *Candida albicans* (ATCC 36232), pelo método de microdiluição padrão, descrito acima. Foram preparadas placas em duplicata, contendo diferentes concentrações de zerumbona (8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg/mL), mais 0,8M de sorbitol, em cada poço, como suporte osmótico. Após incubação a 35° C, as CIM foram lidas em 24 h. Este ensaio foi realizado com o mínimo de três repetições em duplicatas e os valores médios foram calculados (FROST et al., 1995).

4.3.6 Ensaio do efeito ergosterol

A CIM da zerumbona frente à levedura *Candida albicans* (ATCC 36232) foi determinada seguindo as diretrizes do CLSI M27-A2 (NCCLS, 2002), na presença ou ausência de diferentes concentrações (200-800 µg/mL) de ergosterol (Sigma Chemical Co.) adicionando ao meio de ensaio, em linhas diferentes da mesma placa. A CIM foi lida após um período de 24 h, de acordo com o controle do crescimento de fungos (LUNDE, et al., 2000).

4.3.7 ENSAIOS *in vitro*

4.3.8 Avaliação da citotoxicidade da zerumbona em células de linhagem contínua

O ensaio MTT (3-4,5-dimetil, tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide) foi utilizado para determinar a citotoxicidade da zerumbona, em células eucarióticas de linha contínua. Para este ensaio, foram utilizadas células da linhagem VERO, gentilmente cedidas pela Fiocruz, Manaus/AM.

O objetivo deste experimento, foi verificar se a zerumbona apresenta alguma ação citotóxica para células eucarióticas de linhagem contínua. As células ($2,6 \times 10^4$ por poço) foram cultivadas em 0,2 mL de meio (DMEM enriquecido com 10 % SFB e streptomomicina e fungisona a 1%) em uma placa de 96 poços, por 48 horas a 37° C em 5% CO₂ até a formação da monocamada.

Após o período de incubação, o meio foi descartado, as células foram tratadas com zerumbona em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,1 µg/mL) e incubadas por 24 e 48 horas a 37° C em 5% CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e 100 µL de meio completo sem vermelho de fenol foram adicionados aos poços (não tratada e tratada) e incubadas por 4 horas a 37° C em 5% CO₂. Após esse período de incubação, o tampão de lise, MTT, foi adicionado aos poços (0,1 ml por poço) e incubadas por mais 10 minutos a 37 ° C em 5% CO₂. No final da incubação, a densidades ótica foram medidas, utilizando-se um espectrofotômetro em um filtro de 570 nm. A viabilidade relativa das células foi calculada em porcentagem, por meio da seguinte fórmula: $(A_{570} \text{ de amostras tratadas}) / (A_{570} \text{ de amostras não tratadas}) \times 100$. Essas análises foram expressas por meio do programa Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.3.9 Atividade Antioxidante

O potencial antioxidante do *Z. zerumbet* foi avaliado por meio dos sobrenadantes das culturas de células (VERO) tratadas com as diferentes concentrações de zerumbona. Foi testada a capacidade antioxidante total, observando o comportamento *in vitro*, na cultura de células e *in natura* da substância. Para avaliar a capacidade antioxidante total, foi utilizado um kit comercial Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay kit ab65329 (Abcam, USA). Seguindo as recomendações do fabricante, foi preparada a curva padrão adicionando 0, 4, 8, 12, 16 e 20µL de Trolox em poços individuais (microplaca de 96 poços). Em seguida o volume final dos poços foi ajustado a 100µL, utilizando água destilada. Na sequência, a solução de trabalho foi preparada, usando uma 1/49 Cu²⁺ em diluente do ensaio. Após isso, foram adicionados 100µL da solução de trabalho nos poços com o padrão (Trolox) e nas amostras (100µL dos sobrenadantes: 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200µg/mL). A placa foi coberta e incubada por 1h e 30 minutos. Após esse período de incubação, foi feita a leitura no espectrofotômetro (~630 nm) e plotagem dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 TEORES DA ZERUMBONA PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Zingiber zerumbet* (L.) SMITH

A análise da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) do óleo essencial, extraídos dos rizomas de *Z. zerumbet* demonstrou que composto majoritário do óleo é a zerumbona, com um teor de 87,93% (figura 12).

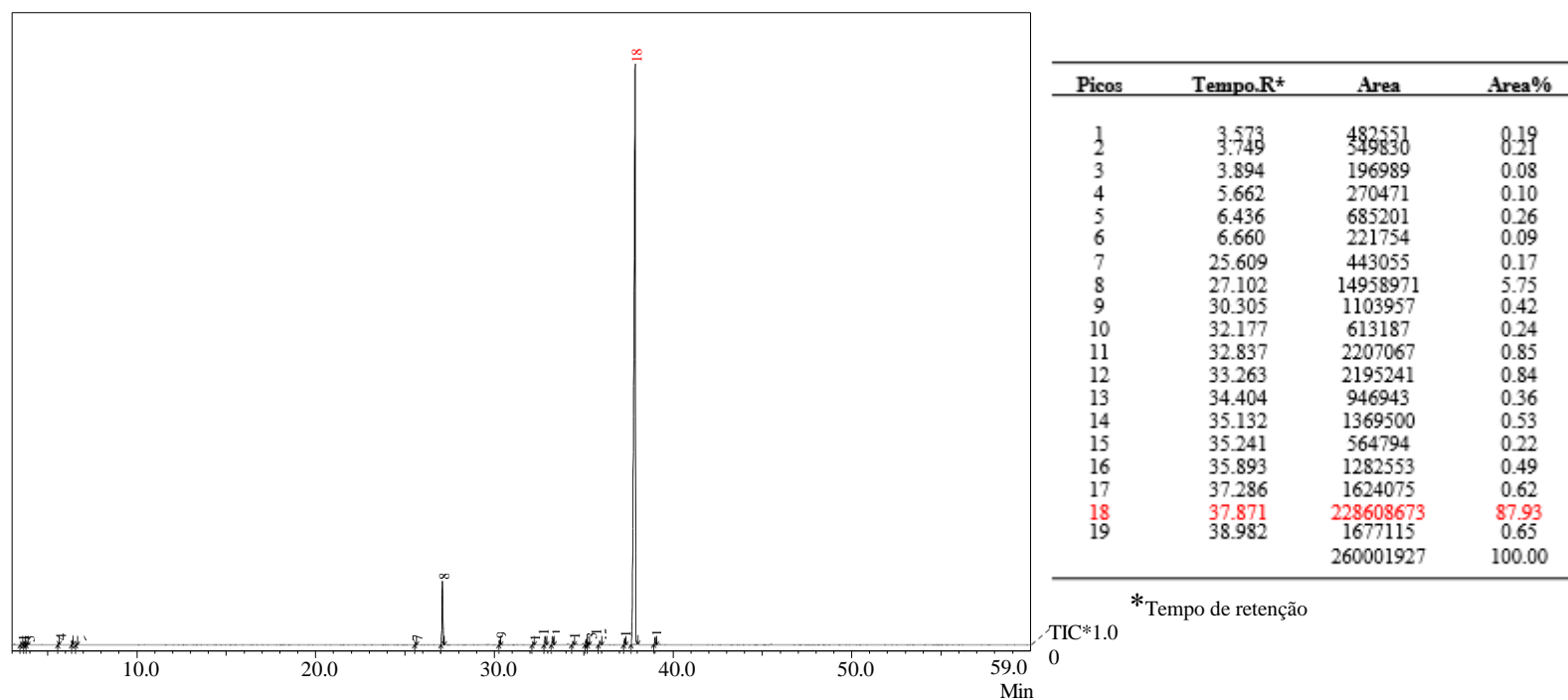


Figura 12. Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Z. zerumbet*. No tempo de retenção 18 (37,8 min) está presente o composto majoritário zerumbona, apresentando um percentual de área de 87,95%.

Para purificação da zerumbona, o óleo essencial foi submetido a recristalização, de acordo com a patente nº PI-0505343-9/28/11/2007. Em seguida foi observado o grau de pureza dos cristais zerumbona, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando banda de absorção em UV de ~252 nm, de acordo. Após o processo de recristalização do O.E, obteve-se um grau de pureza de 98,79% de zerumbona, como pode ser observado na cromatografia abaixo (figura 13).

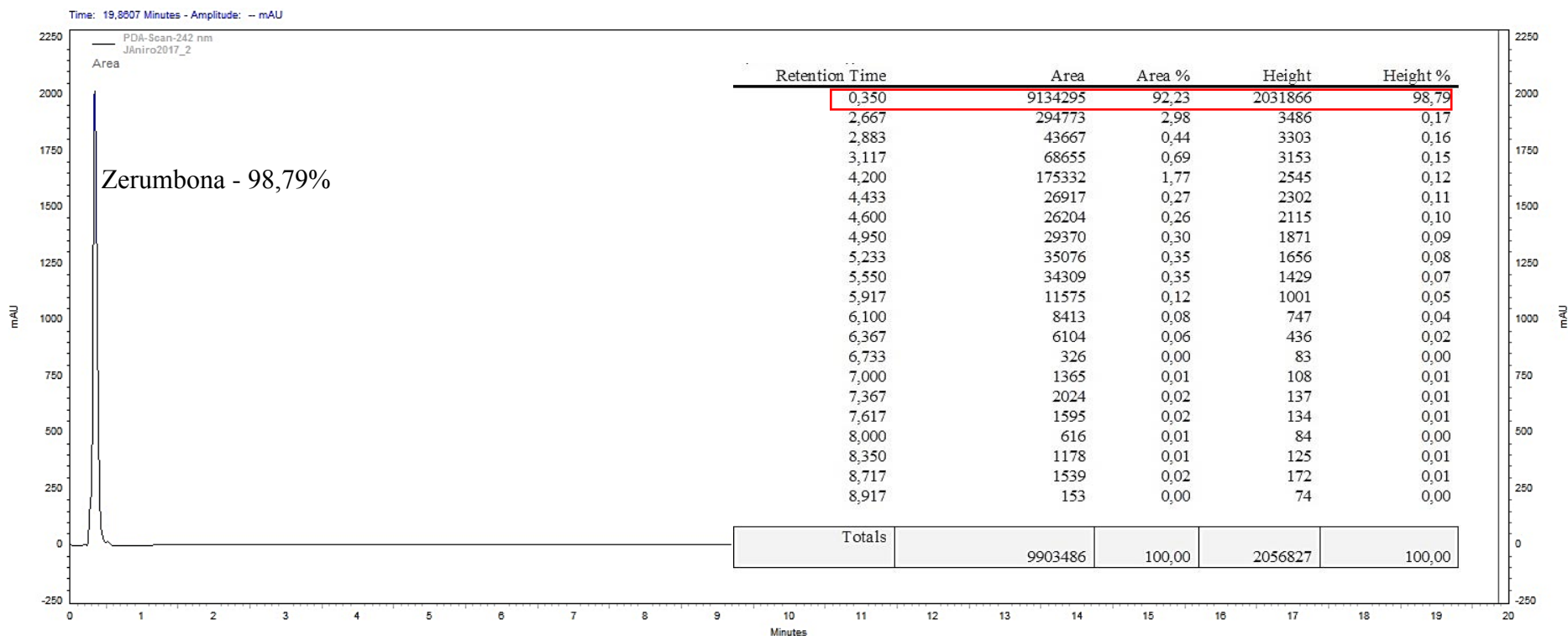


Figura 13. Cromatograma Líquido de Alta Eficiência (CLAE) dos cristais obtidos o óleo essencial. Tempo de retenção 1, com o percentual de área de 98,79%, referente ao composto zerumbona, de acordo com a curva padrão estabelecida na patente nº PI-0505343-9/28/11/2007.

5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA ZERUMBONA

Inicialmente, testes preliminares utilizando a técnica de microdiluição em ágar demonstraram que a zerumbona possuía ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, evidenciada por CIM $\geq 250\mu\text{g/mL}$ e CBM $\geq 500\mu\text{g/mL}$. Os resultados também confirmaram que a atividade antimicrobiana da zerumbona é mais eficiente contra bactérias gram positivas do que gram-negativas, visto que esta biomolécula não inibiu o crescimento das enterobactérias (Figura 14).

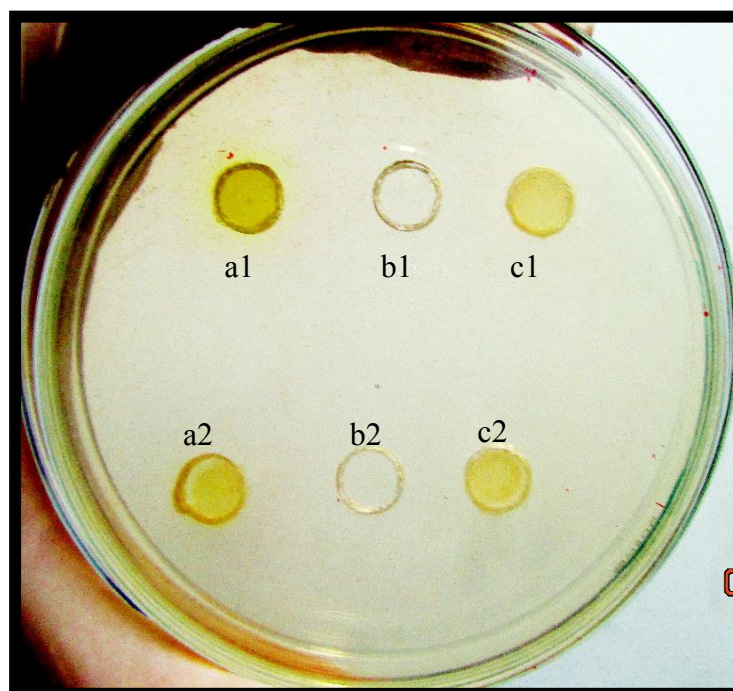


Figura 14: Atividade antimicrobiana da zerumbona contra cepas gram-positivas e negativas a). Inóculos bacterianos 1×10^5 UFC/mL (3- 4 uL) foram semeados em orifícios de placas de ágar Muller Hinton contendo zerumbona na concentração de $500\mu\text{g/mL}$. a1/a2: ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigenica ST-Butantã; b1: *Staphylococcus aureus* (isolado clínico) / b2: *Staphylococcus aureus* ATCC 80958; c1/c2: *Pseudomonas aeruginosa*-CDC EDL-1284. Ausência de crescimento bacteriano em b1 e b2 (CBM).

A atividade antimicrobiana da zerumbona contra *P. acnes*, foi ainda mais eficiente do que a observada contra as cepas de *S. aureus*, visto que a zerumbona apresentou CIM $\geq 125\mu\text{g/mL}$ e CBM $\geq 250\mu\text{g/mL}$ contra a cepa padrão (ATCC 11827) de *P. acnes* testada (Figura 3).

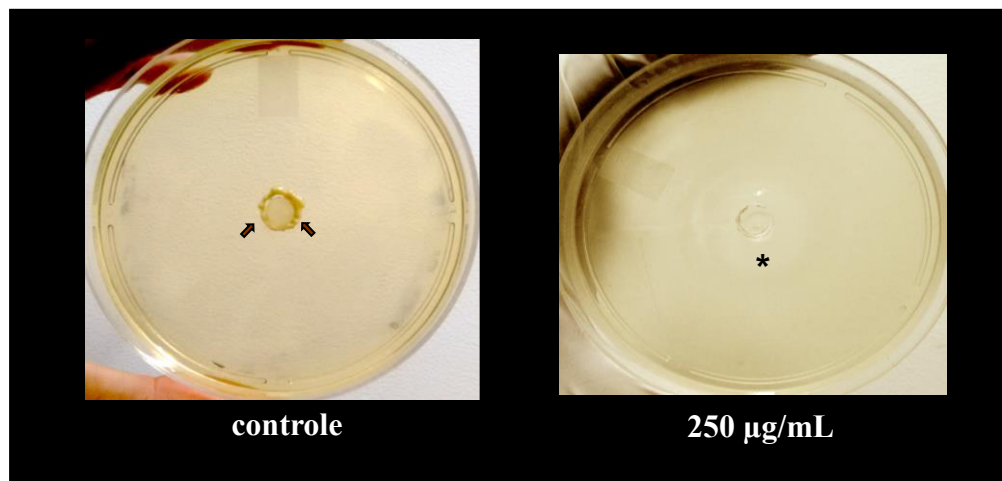


Figura 15. Concentração Bactericida Mínima (CBM) da zerumbona frente *P. acnes*. Método Diluição em ágar com a Zerumbona. Setas indicam crescimento bacteriano. *: ausência de crescimento bacteriano

Em seguida, com intuito de confirmar e verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos por meio da microdiluição em ágar foi realizado o teste de microdiluição em caldo de acordo com o que recomenda o CLSI. Os resultados confirmaram os mesmos valores de CIM e CBM demonstrados pela microdiluição em Ágar, evidenciando que ambos os métodos apresentavam sensibilidade e precisão similares.

Diante disso, os testes subsequentes que demonstraram ausência de atividade antimicrobiana da zerumbona contra a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, foram feitos apenas por meio da microdiluição em caldo considerando fatores como precisão, praticidade e economia de reagentes. Assim, os dados apresentados pelo presente estudo demonstram que a zerumbona apresenta atividade antimicrobiana contra os agentes etiológicos de infecção cutânea *S. aureus* e *P. acnes*, porém não foi verificada ação antimicrobiana contra *S. epidermidis* (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana da zerumbona contra bactérias gram positivas causadoras de infecções cutâneas

CEPAS	Concentrações (µg/mL)				
	62,5	125	250	500	1000
<i>S. aureus</i> (padrão)	+	+	+*	-**	-
<i>S. aureus</i> (isolado clínico)	+	+	+*	-**	-
<i>P. acnes</i>	+	+*	-**	-	-
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+

Nota: (+): Crescimento bacteriano (-): Ausência de crescimento bacteriano

(*): Concentração Inibitória Mínima-CIM

(**): Concentração Bactericida Mínima-CBM

5.2.1 Cinética de morte microbiana

Como a biomolécula zerumbona demonstrou considerável ação antimicrobiana contra as cepas *S. aureus* (padrão e isolado clínico) e *P. acnes*, esta atividade foi avaliada e caracterizada em função do tempo, por meio do teste de cinética de morte microbiana. Os resultados demonstram que no 1º intervalo de tempo (2h) de exposição à zerumbona, houve uma redução de (44%) na concentração de 250 µg/mL e de (66%) na concentração de 500 µg/mL em relação ao inóculo original, para ambas as cepas testadas. A atividade bactericida (redução de $\geq 99,99\%$ ou $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL) foi evidenciada no intervalo de tempo entre 6 e 12 horas de exposição às duas concentrações de zerumbona utilizadas (Figura 16).

Após 12 horas de exposição, foi verificado que a zerumbona começou a perder seu efeito antimicrobiano, havendo um aumento do crescimento bacteriano até o intervalo de tempo de 24 horas, onde este crescimento se estagnou (figura 16). Estes dados demonstram que ação antimicrobiana da zerumbona ocorre durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano. Uma vez que a bactéria entra em sua fase estacionária, a zerumbona passa a perder seu efeito inibitório/bactericida. Experimentos adicionais seriam necessários para verificar se adição de mais zerumbona no intervalo de tempo 12 horas poderia promover maior redução do crescimento bacteriano.

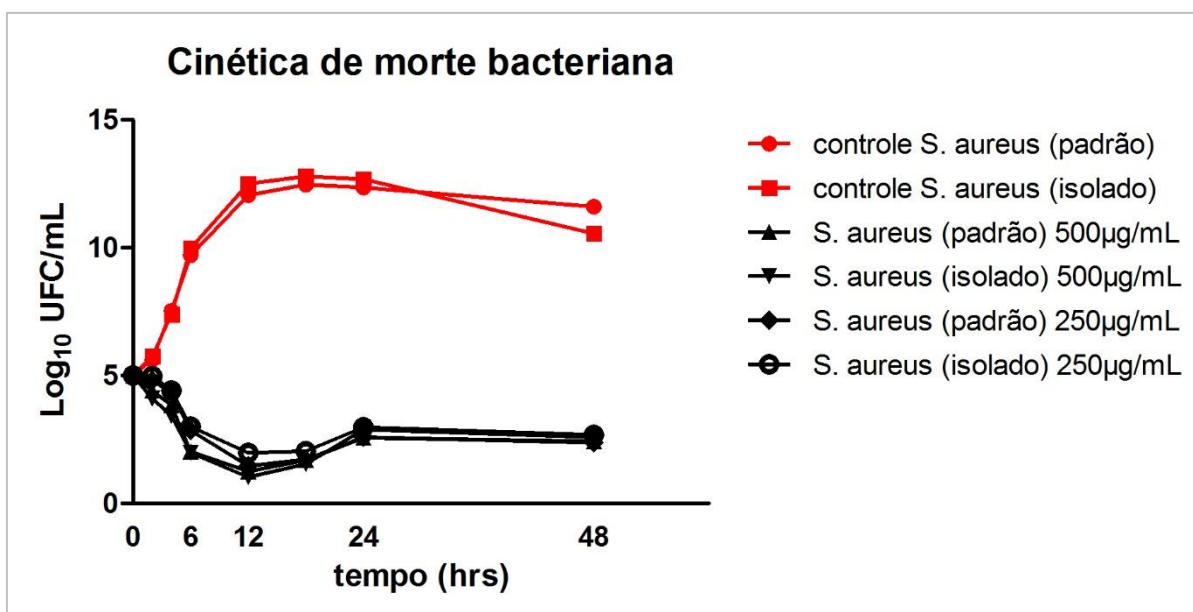


Figura 16. Avaliação da atividade antimicrobiana em função do tempo. Cepas de *S. aureus* tratadas com zerumbona nas concentrações 250 e 500 µg/mL em diferentes intervalos de tempo.

Em relação a *P. acnes*, foi observado que a zerumbona exerceu sua atividade bactericida durante o primeiro intervalo de tempo testado (30 horas), promovendo uma redução de aproximadamente 99,9% ($\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL) das colônias bacterianas em relação ao inóculo inicial, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (CBM). A atividade bactericida para a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (CIM) foi atingida após 60 horas de exposição a zerumbona, como demonstrado na figura abaixo (Figura 17).

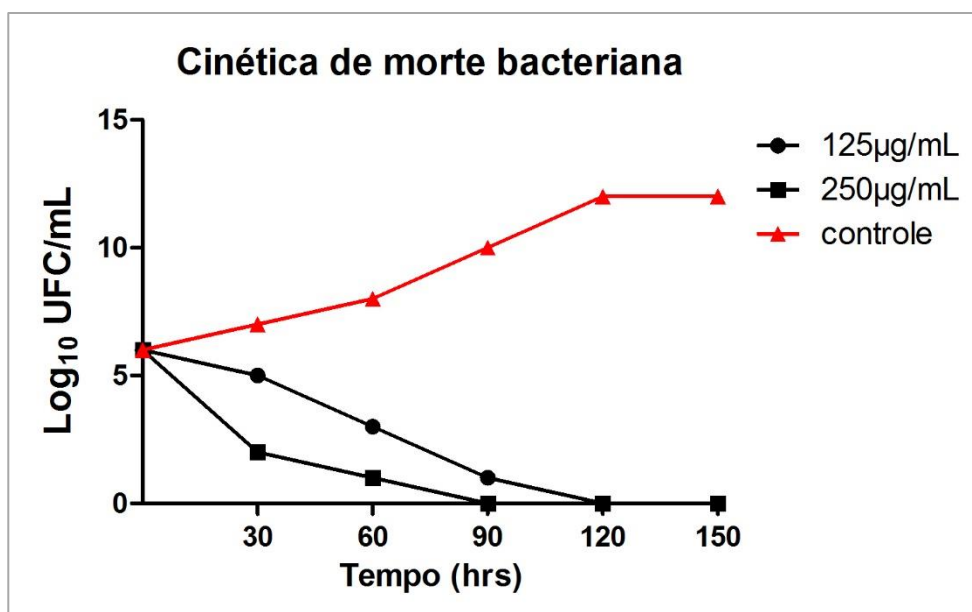


Figura 17. Inibição do crescimento bacteriano (*P. acnes*) nas concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$ (CIM) e 250 $\mu\text{g/mL}$ (CBM) de zerumbona, em função do tempo.

5.3 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA ZERUMBONA

Como mencionado anteriormente, para determinar a atividade antibiofilme da zerumbona, foi realizado ensaios de inibição de formação de biofilme e de degradação do biofilme formado. Para estes ensaios, foram selecionadas apenas as cepas de *S. aureus* uma vez que somente estas cepas demonstraram ser capazes de formar biofilme. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se a zerumbona foi capaz de inibir a formação de biofilme nas concentrações de 500, 1000 e 2000 μ g/mL. Na concentração de 500 μ g/mL foi observado uma redução de 55,8 % no biofilme formado pelo isolado clínico e de 48,04% pela cepa padrão, em comparação com o controle. A redução máxima observada ocorreu na concentração de 2000 μ g/mL, que foi capaz de reduzir a formação de biofilme em 79,24% e 72,45%, no isolado clínico e cepa padrão, respectivamente, figura 18.

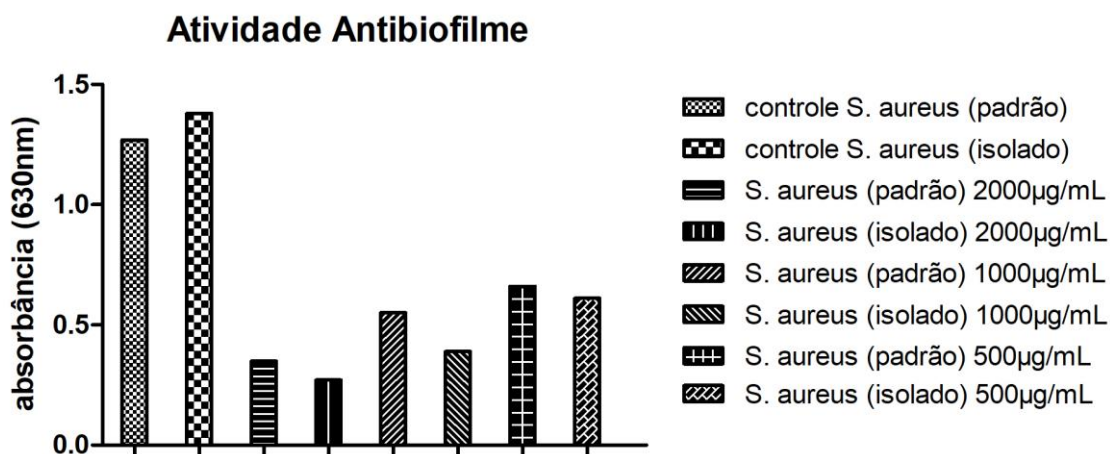


Figura 18. Inibição da formação de biofilme de *S. aureus* pela zerumbona. Isolado clínico e cepa padrão de *S. aureus* foram expostos as concentrações de 500, 1000 e 2000 μ g/mL de zerumbona. Leitura dos resultados foi feita por espectrofotometria (600nm)

5.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ZERUMBONA

A atividade antifúngica da zerumbona foi avaliada de acordo com as diretrizes preconizadas pelo CLSI, utilizando a técnica de microdiluição, como mencionado anteriormente. A zerumbona apresentou CIM de $\geq 100\mu\text{g/mL}$ e Concentração Fungicida Mínima (CFM) equivalente a $\geq 200\mu\text{g/mL}$ contra a cepa *Candida albicans* ATCC 36232(Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antifúngica da zerumbona

CEPA FÚNGICA	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)				
	50	100	200	400	800
<i>Candida albicans</i> ATCC 36232	+	+*	-**	-	-

Nota: (+): Crescimento fúngico (-): Ausência de crescimento fúngico

(*): Concentração Inibitória Mínima-CIM

(**): Concentração Fungicida Mínima-CFM

Após constatar que a zerumbona apresentava atividade antifúngica contra a cepa *Candida albicans* ATCC 36232, investigou-se possíveis mecanismos de ação por meio dos ensaios de proteção de sorbitol (para verificar se os mecanismos de ação da zerumbona estavam relacionados à interferência da formação da parede celular) e o efeito do ergosterol (para avaliar se atividade antifúngica da zerumbona estava relacionada a interação com membrana celular).

Os resultados obtidos demonstraram que o mecanismo de ação da atividade antifúngica da zerumbona não está relacionado com a formação da parede celular fúngica e nem tampouco com a degradação da membrana celular. Testes adicionais serão necessários para determinar os mecanismos de ação da atividade antifúngica da zerumbona.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA ZERUMBONA

Para avaliar o efeito citotóxico da zerumbona sobre células eucarióticas de linhagem contínua, foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT. O composto bioativo zerumbona, não apresentou efeito citotóxico considerável até a concentração de $100\mu\text{g/mL}$, como pode ser observado na figura 21.

Nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o percentual de viabilidade celular foi de 100, 97 e 92%, respectivamente, após 24 horas de tratamento. No período de 48 horas, houve pouca mudança na viabilidade celular na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95%) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (85%). Tais resultados demonstram que provavelmente a zerumbona não apresenta efeito citotóxico em células humanas normais. Contudo, testes adicionais com células não-cancerígenas de linhagem humana são necessários para melhorar caracterizar o efeito citotóxico da zerumbona. .

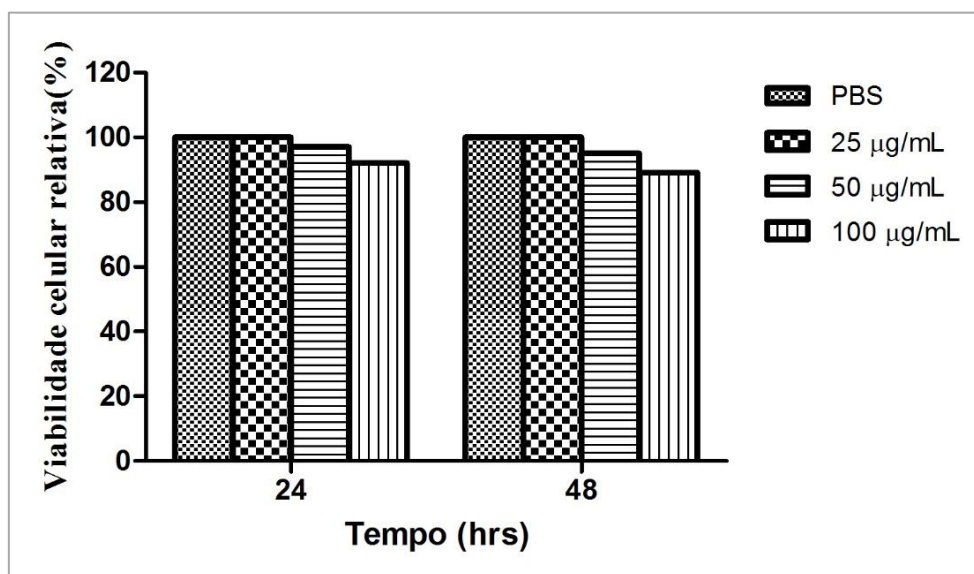


Figura 19. Viabilidade celular relativa. Concentrações testadas para verificar a toxicidade da zerumbona em células normais de linhagem contínua.

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante da zerumbona, foi avaliado pela Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox (TEAC). O TEAC é um ensaio colorimétrico, que avalia a capacidade da substância-teste em capturar o íon Cu^{2+} e converter em Cu . Neste ensaio a zerumbona apresentou uma excelente atividade na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (400mM Trolox), resultado que aumentou quando a concentração foi elevada a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (650mM Trolox). Estes dados demonstram que zerumbona apresenta a

capacidade antioxidante ao induzir a produção de pequenas moléculas (GSH, ascorbato, Vitamina E, etc.) e proteínas (albumina, transferina, etc) antioxidantes. Vale ressaltar que esta concentração não apresentou efeitos citotóxicos em células normais de mamíferos, como demonstrado no teste de citotoxicidade.

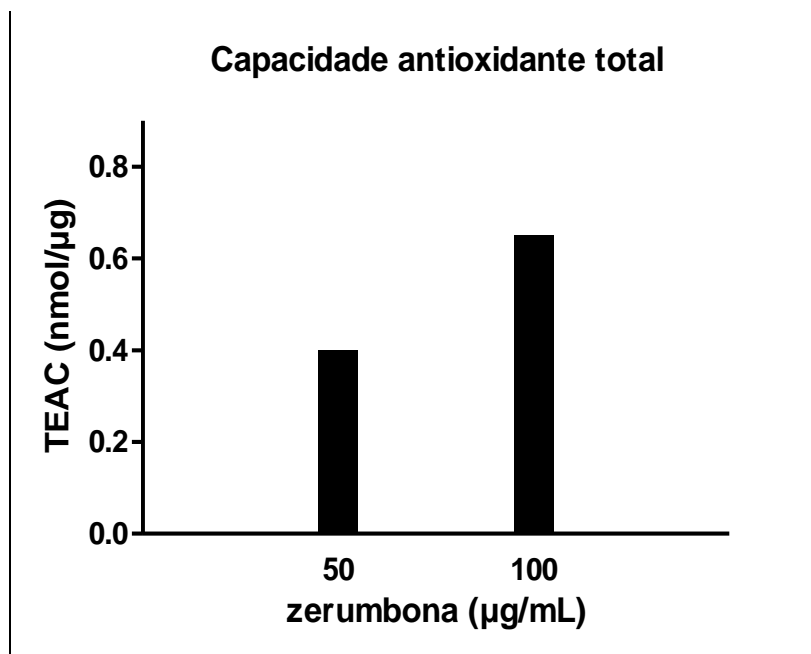


Figura 20. Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox (TEAC), medida dos sobrenadantes das culturas celulares, na presença da zerumbona.

6 DISCUSSÃO

A pesquisa por biomoléculas naturais ativas com potencial antimicrobiano tem se tornado a principal alternativa na luta contra o crescente aumento de resistência a antimicrobianos comerciais disponíveis (BRESOLIN e CECHINEL FILHO, 2010; HANEEF et al., 2013; SOLIMINI; JÜTTE et al., 2017).

Extratos obtidos de diferentes partes da planta, como os óleos essenciais, são usados empiricamente há séculos para o tratamento de diversas doenças, até mesmo as causadas por microrganismos. No entanto, é necessário identificar o composto bioativo responsável pela ação farmacológica, uma vez que em um extrato há dezenas de substâncias presentes (VEIGA-JUNIOR; WAGENLEHNER et al., 2005; KUET et al., 2013). Todavia, o isolamento de uma substância costuma ser dificultoso, pois na maioria das vezes, esses compostos se apresentam em pequenas quantidades. Diferentes métodos podem ser utilizados para o fracionamento de um óleo essencial (cromatografia delgada, cromatografia em coluna, cromatografia gasosa e líquida), mas cada extrato apresenta uma peculiaridade específica, sendo necessário identificar o melhor método de purificação, em relação ao grau de pureza e o rendimento obtido (COLLINS et al., 1990; ANSEL et al., 2000; FANGUEIRO, 2014).

O óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet* obtido neste estudo pelo método de hidrodestilação, apresentou como composto majoritário o sesquiterpeno zerumbona, com o teor de 87,95%. Dai e colaboradores (2013) analisaram a composição química do óleo essencial obtidos dos rizomas do *Z. zerumbet* em Nghe, uma província do Vietnã. Neste trabalho destacaram-se como os principais componentes o z-citral (26,1%), canfeno (16,13%), sabineno (14,6%) e a zerumbona com o teor de 1,2%. Batubara e colaboradores (2013) avaliaram o perfil cromatográfico do O.E do *Z. zerumbet* oriundo da Indonésia, obtendo um teor de zerumbona de 11,05%, o segundo componente de maior predominância neste óleo essencial, atrás somente do sabineno (32,96%). Resultado semelhante foi obtido por um grupo da Malásia e do Japão que obtiveram um teor de zerumbona de 36,12% e 48,13%, respectivamente (Yu et al., 2008; Sulaiman et al., 2010).

Esses dados demonstram que a hidroestilação realizada neste estudo foi mais eficiente em obter maior teor de zerumbona na composição O. E., em comparação com estudos anteriores. Contudo, é importante ressaltar que essas diferenças na composição química dos óleos essenciais relacionadas ao teor de zerumbona podem ser atribuídas a

diversos fatores, tais como clima, período de colheita e a qualidade do solo (PIRBALOUTI et al., 2013; FORMISANO, 2015). O clima amazônico de alta umidade e elevadas temperaturas, funcionando como uma “estufa natural”, pode ser responsável pelo elevado teor de zerumbona encontrado no O.E descrito neste estudo (NOBRE; BHUIYAN; ROUT et al., 2009; YOB et al., 2011).

Isolar e purificar uma substância de um extrato natural nem sempre é uma tarefa simples. Em um estudo realizado na Malásia, por Baby e colaboradores (2009), o óleo essencial obtido dos rizomas do *Z. zerumbet*, utilizando o método de hidrodestilação, obtiveram um óleo com um elevado teor de zerumbona (68,9%). Em seguida, esse óleo foi submetido ao processo de recristalização e os cristais foram submetidos a análises de identificação cromatográficas e espectroscópicas. No entanto, o autor não descreve o grau de pureza obtido nos cristais, apenas descreve que a massa molecular obtida, corrobora com os dados da literatura.

Li e Song (2017) avaliaram o efeito da zerumbona comercial (Sigma®, New York, NY, USA) com o grau de $\geq 98\%$ de pureza, como uma alternativa terapêutica no tratamento de úlceras gástricas, induzidas em ratos (ratos SD, 48 semanas). Os autores apresentam a zerumbona como uma possível alternativa terapêutica no tratamento de úlceras gástricas. Vale ressaltar que a zerumbona comercial utilizada pelos autores, apresenta o grau de pureza igual ao obtido no presente estudo. No entanto, o valor comercial é muito elevado, podendo inviabilizar a elaboração de fármacos.

O óleo essencial obtido foi submetido ao processo de recristalização, obtendo cristais de com um elevado teor de zerumbona (98,79%) de acordo com a metodologia utilizada na patente de nº PI-0505343-9/28/11/2007, descrita por Pinheiro (2007). Neste estudo, Pinheiro (2007) obteve um alto grau de pureza da zerumbona (99,95%), com baixo custo benefício, através da adaptação do método de recristalização, processo que é amplamente utilizado na purificação de biomoléculas, derivadas de O.E (ANSEL et al., 2000; FANGUEIRO, 2014).

Dentre os diversos potenciais farmacológicos da zerumbona, a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana são possivelmente as atividades mais passíveis de agregar valor econômico a esta biomolécula. Este estudo demonstrou importante atividade antimicrobiana da zerumbona contra as cepas bacterianas *S. aureus* (isolado clínico e cepa padrão) e *P. acnes*, principais agentes etiológicos de infecções cutâneas. A zerumbona apresentou a CIM na concentração de $\geq 125\mu\text{g/mL}$ e $\geq 250\mu\text{g/mL}$ contra *P. acnes* e *S. aureus* respectivamente. A CBM foi verificada na concentração de

$\geq 250 \mu\text{g/mL}$ frente ao *P. acnes* e $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ para as cepas e *S. aureus* testadas. A zerumbona não apresentou atividade antibacteriana contra *S. epidermidis* nas concentrações testadas.

Na literatura, não há uma classificação consensual estabelecida sobre os valores da CIM e CBM de extratos, frações ou substâncias isoladas de plantas para determinar sua eficácia antimicrobiana (BARBOSA, 2010). No entanto, alguns autores classificam a atividade antimicrobiana desses agentes naturais como forte, moderada e fraca, quando apresentam CIM até 500, entre 500 e 1500 e acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Bagramian et al., 2009; Sartoratto et al., 2004). Já Webster e colaboradores (2008) afirmam que agentes antimicrobianos com valor de CIM até 1000 $\mu\text{g/mL}$ podem ser empregados na terapêutica de processos infecciosos.

Segundo essas classificações a biomolécula zerumbona apresenta atividade antimicrobiana forte frente às cepas *S. aureus* e *P. acnes* testadas e contra a levedura *Candida albicans* (ATCC 36232) visto que apresentou valores de CIM que variaram entre 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$ para estes agentes etiológicos e podendo representar uma alternativa profilática e de tratamento para infecções cutâneas causadas por esses microorganismos. Estes dados são de grande importância médica, visto que atualmente existem poucos antibióticos comerciais de uso tópico utilizados para o tratamento de infecções de pele (impetigo, foliculite e furunculose) causadas por *S. aureus* e *P. acnes*. Além do mais, boa parte dos antimicrobianos disponíveis no mercado estão perdendo sua eficácia devido o surgimento constante de cepas multirresistentes (LUNA et al., 2010; SHITTU; UDO; LIN, 2009).

Poucos estudos investigam a atividade antimicrobiana da zerumbona, principalmente para as espécies bacterianas utilizadas no presente estudo. No entanto, os dados aqui apresentados confirmam os apresentados por Liu et al., (2017), que demonstraram a atividade antimicrobiana da zerumbona contra *S. aureus* (ATCC 29213) e *C. albicans* (ATCC 90028) com valores de CIM de 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Outro estudo realizado por Chan e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do timol (99,5% de pureza), que é empregado como princípio ativo na prática médica como antisséptico e carvacrol (99% de pureza), dois terpenos fenólicos presentes em algumas espécies vegetais que possuem ação fungicida, bactericida e antioxidante, onde os valores de CIM e CBM encontrados foram de 625 e 1250 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente contra *S. aureus* (NCIMB 6571). Valores acima dos

apresentados pela zerumbona. Vishwanatha e colaboradores (2012) demonstraram CIM de 5000 µg/mL da zerumbona contra *S. epidermitis*. No presente estudo não foi verificada nenhuma atividade antimicrobiana contra *S. epidermitis*.

Até o momento, não há relatos sobre a atividade antimicrobiana da zerumbona frente *P. acnes*. No entanto, já foi documentada a atividade antimicrobiana de outras substâncias naturais contra esse agente etiológico. Por exemplo, a brazilina, protosappanina A e protosappanina B, substâncias isoladas a partir do extrato metanólico da espécie *Caesalpinia Sappan* Wood, conhecida como pau-brasil-da-índia mostraram atividade antibacteriana com valores de CIM de 500, 1000 e 2000 µg/mL, respectivamente contra *P. acnes* (BATUBARA; MITSUNAGA; OHASHI, 2010).

Em um levantamento recente, realizado por Orchard e Van Vuuren (2017), sobre substâncias naturais com atividade antimicrobiana contra *P. acnes*, foi verificada a ação bactericida de 90 compostos naturais. A CBM variou entre 0,75 e 9,38 mg/mL, evidenciando assim o potencial da zerumbona demonstrada por este estudo para elaboração de formulações de uso tópico para o tratamento de infecções cutâneas causada por esse microrganismo.

As maiorias dos estudos que investigam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais ou seus compostos isolados demonstram que eles são mais ativos sobre as bactérias gram-positivas. Em nosso estudo também foi verificado que a zerumbona apresenta atividade antimicrobiana mais eficiente contra microrganismos gram positivos. Isto pode estar relacionado com o mecanismo de ação da zerumbona que pode estar diretamente associado com a morfologia das bactérias gram positivas (BURT, 2004). No entanto, estudos realizados por Sidahmed e colaboradores (2015) verificaram que a zerumbona apresenta forte atividade antimicrobiana contra a espécie gram-negativa *Helicobacter pylori*, apresentando CIM de 250 µg/mL para duas linhagens desta espécie (NCTC 11637 e J99). Estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar o espectro e o mecanismo de ação antimicrobiano da zerumbona.

Além de determinar a atividade antimicrobiana de uma biomolécula, para que a mesma seja considerada na elaboração de novos fármacos de caráter antimicrobiano, é essencial caracterizar sua ação em função do tempo. Desta forma, é possível verificar em quanto tempo o composto está agindo nas células bacterianas e se é dose dependente (LEITE, 2007). Este ensaio também é crucial para avaliar a dinâmica da ação

antimicrobiana frente as características de crescimento dos microorganismos testados (DE OLIVEIRA, 2010; CLANCY et al., 2014).

Ao analisar a atividade da zerumbona em função do tempo, verificou-se que a concentração 250µg/mL (CIM) causou a redução máxima ($\geq 99,99\%$) do crescimento bacteriano das cepas de *S. aureus* testadas no intervalo de tempo entre 12 a 18 horas. Quando as bactérias foram tratadas com a concentração de 500µg/mL (CBM), a redução máxima ocorreu no intervalo de 6 a 12 Em relação a *P. acnes*, a ação bactericida ocorreu em 60 horas de tratamento com zerumbona na concentração de 125µg/mL (CIM) e em 30 horas, quando tratados com zerumbona na concentração 250µg/mL (CBM). Um estudo realizado por Sales e colaboradores (2014) com O.E de *Hymenaeae coubaril* L. verificou que este extrato apresentava atividade bactericida contra *S. aureus* na concentração de 560µg/mL, a partir de 24 horas de tratamento Silva (2015) avaliou a ação bactericida em função do tempo do linalol, composto majoritário do O.E de *Ocimum basilicum*. O linalol apresentou a ação bactericida frente a cepa microbiana *S. aureus*, a partir de 8 horas de tratamento na concentração de 1024µg/mL. Ambas as concentrações mencionadas acima são mais elevadas do que apresentada pela zerumbona contra as cepas *S. aureus* neste estudo.

No trabalho recente de Kanayama e colaboradores (2017), foi avaliado a ação de antibióticos comerciais (ozenoxina, nadifloxacina, levofloxacina e clidamicina) em função do tempo frente ao *P. acnes*. A CBM da ozenxina, nadidloxacina e levofloxina foram superiores a 256µg/mL obtendo a redução máxima (\geq que 3 log₁₀ UFC/mL do inóculo inicial) no período de 48 horas contra *P. acnes*. Já a clidamicina, apresentou a ação bacteriostática (\geq que 2 log₁₀ UFC/mL do inóculo inicial) na concentração de 256µg/mL no mesmo intervalo de tempo. Resultados que evidenciam o alto potencial antimicrobiano da zerumbona contra *P. acnes*, visto que a zerumbona na concentração 250 µg/mL matou todas as bactérias em apenas 30 horas de tratamento. Estes dados além de promissores são inéditos, quando se refere ao espectro de ação bactericida da zerumbona contra o *P. acnes*.

Além de apresentar uma forte atividade antimicrobiana, a zerumbona foi capaz de reduzir a formação de biofilme em até 55% na concentração de 500µg/mL (CBM) e 78% na concentração de 2000µg/mL. Diferentemente dos dados obtidos neste estudo, Nader e colaboradores (2014), quantificaram a interferência na formação de biofilme de

S. aureus, utilizando o antibiótico (sulfato de gentamicina) na sua concentração comercial (30000µg/mL) e demonstraram que o antibiótico foi capaz de reduzir somente 13,9% da formação de biofilme. Vale ressaltar que os biofilmes têm como a sua principal característica a resistência a fatores externos, como os antibióticos, luz ultravioleta (UV), aumento ou diminuição do pH e até mesmo o calor (DE LA FUENTE-NUÑEZ et al., 2016). Isso proporciona o aumento de 10 a 1000 vezes a resistência bacteriana em relação antibióticos convencionais, que são utilizados no tratamento de células bacterianas planctônicas (natação livre) (HALL-SOODLEY et al., 2006; KOSTAKIOTI et al., 2013). Estes dados evidenciam que além da atividade antibacteriana, a zerumbona também apresenta importante ação antibiofilme, o que potencializa sua atividade antimicrobiana.

O presente estudo também avaliou a ação antifúngica da zerumbona contra *Candida albicans* ATCC 36232, fungo de grande importância médica como uma das principais causas de infecções cutâneas. A zerumbona demonstrou atividade antifúngica sendo verificada uma CIM de $\geq 100\mu\text{g/mL}$ e CFM $\geq 200\mu\text{g/mL}$ contra a cepa fúngica *Candida albicans* ATCC 36232. Oliveira e colaboradores (2016) avaliaram a ação antifúngica do eugenol, obtido do O.E da alfavaca (*Ocimum gratissimum*) frente a levedura *Candida albicans*. No referido estudo os autores obtiveram a CIM 1250 µg/mL. Concentrações dez vezes maiores do que os obtidos neste estudo. Outro estudo realizado por Freitas (2013) avaliou a atividade antifúngica do carvacrol ontra a levedura *C. albicans*, encontrando CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, enquanto que Vasconcelos (2013) avaliou a atividade antifúngica do timol demonstrando CIM 350 µg/mL, concentrações muito maiores do que a apresentada pela zerumbona em nosso estudo.

Até recentemente não havia estudos da ação antifúngica da zerumbona contra a *C. albicans*. Liu e colaboradores (2017) investigando a ação cicatrizante da zerumbona comercial ($\geq 98\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em ratos (Wistar), verificaram a ação antifúngica da zerumbona contra *C. albicans*, obtendo a CIM de 250µg/mL. Neste estudo não foi avaliada a Concentração Fungicida Mínima (CFM). Mesmo utilizando zerumbona comercial com alto grau de pureza, tais resultados continuam sendo inferiores aos dados apresentados pelo presente estudo.

Com intuito de investigar o mecanismo de ação da atividade antifúngica da zerumbona, frente a *C. albicans*, foram realizados ensaios Proteção do Sorbitol e Efeito do Ergosterol. O ensaio conhecido como “Proteção do Sobitol” foi realizado para determinar a interferência da zerumbona, sobre a integridade da parede celular fúngica

(*C. albicans*), enquanto que o “Efeito Ergosterol”, é utilizado para verificar se a substância é responsável por alterações na membrana plasmática. Um composto que interfere negativamente na parede celular dos fungos, aumentará a CIM devido à proteção do sorbitol, assim como um composto que apresenta afinidade com o ergosterol também aumentará a CIM ao se ligar ao ergosterol externo (FROST et al., 1995). Nesse caso, a CIM (100µg/mL) foi a mesma em ambos os testes, após o período de incubação (24 horas) de interação do fungo com a zerumbona. Sugerindo que a zerumbona não atua sobre esses mecanismos de ação.

Ferreira (2013) avaliou o mecanismo de ação de novas naftoquinonas (semisintéticas) em *C. albicans*, desenvolvidas na Universidade Federal Fluminense (UFF), no Rio de Janeiro. Após a determinação da CIM (50µg/mL), foi analisado a interferência da naftoquinona sobre a parede celular. A CIM permaneceu a mesma, concluindo-se que a molécula não age sobre a parede celular dessa levedura, assim como a zerumbona. Por outro lado, Mangoyi e colaboradores (2015) verificou que atividade antifúngica para cloramina, um agente antisséptico frequentemente usado para a assepsia oral, na concentração 783µg/mL (CIM), apresentado como mecanismo de ação a degradação da membrana plasmática evidenciada pelo aumento da CIM em 4 vezes no teste do efeito do Ergosterol.

Como os dois ensaios realizados (disponíveis) para determinar o mecanismo antifúngico da zerumbona evidenciaram que a atividade desta biomolécula não está relacionados com a degração da membrana e tampouco com a parede celular, novos ensaios que avaliem outros mecanismos de ação, como o fluxo de potássio e o extravasamento de substância que absorvem a 260 nm devem ser realizados (FERREIRA, 2013).

Para que uma substância seja considerada para ser usadas em formulações farmacêuticas, além de sua eficiência é necessário garantir sua segurança. A citotoxicidade da zerumbona foi avaliada *in vitro*, utilizando células eucarióticas de linhagem contínua (células Vero). Os resultados mostram claramente que a zerumbona não apresenta efeitos citotóxicos consideráveis, mesmo após 48 horas de tratamento. Jyothilakshmi e colaboradores (2017) avaliaram a citotoxicidade da zerumbona em células hepáticas (Chang Liver) e compararam com um agente quimioterápico, doxorrubicina, nas mesmas concentrações. A doxorrubicina apresentou efeitos citotóxicos em 31µg/mL, diferentemente da zerumbona, pois essa biomolécula na concentração de 150µg/mL não apresentou efeitos citotóxicos contra células hepáticas.

Outros trabalhos mostram que a zerumbona apresenta uma baixa ou nenhuma citotoxicidade em células endoteliais e fibroblastos, mas induz a apoptose de muitas linhagens de células cancerígenas (MURAKAMI et al., 2002; XIAN et al., 2007; PRASANNAN et al., 2012) Estes resultados que confirmam os dados obtidos no presente estudo que demonstram que a zerumbona não é citotóxica para células normais.

Como o objetivo central deste estudo foi verificar o potencial da zerumbona como agente antimicrobiano contra infecções cutâneas, o presente estudo também avaliou o potencial antioxidante desta biomolécula, visto que esta atividade potencializa o efeito curativo de antimicrobianos, principalmente os de uso tópico. Este potencial foi expresso pela Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox (TEAC). A zerumbona apresentou uma alta atividade antioxidante, na concentração de 50µg/mL (400mM Trolox), resultado que aumentou quando a concentração foi elevada a 100µg/mL (650mM Trolox). No trabalho realizado por Lin e colaboradores (2013) foi avaliado o potencial antioxidante de extratos aquosos de seis plantas medicinais, nativas de Taiwan (*Bidens alba* L., *Lycium chinense* Mill., *Mentha arvensis* L., *Plantago asiatica* L., *Houttuyni acordata* Thunb., and *Centella asiatica* L. Urban). Dessas seis plantas, foram avaliados a capacidade antioxidante total dos extratos, utilizando o ensaio TEAC. A *Houttuyni acordata* Thunb apresentou melhor atividade antioxidante (231,16mM Trolox), na concentração de (100µg/mL), valor de Trolox muito inferior ao induzido pela zerumbona.

Outro estudo realizado por Gilca e colaboradores (2014), com o objetivo de elucidar o potencial antioxidante das plantas mais utilizadas na medicina tradicional chinesa, analisou a capacidade antioxidante total de cinco espécies vegetais (*Symphitum officinalae*, *Inula helenium*, *Calendula officinalis*, *Angelica arhanghelica*, e *Ecbalium elaterium*). O extrato aquoso obtido das folhas da espécie vegetal *Symphitum officinalae*, obteve o maior percentual antioxidante (413 mM Trolox). Nesse estudo não foi determinado a concentração dos extratos e nem isolado o possível composto bioativo, impedindo a determinação do composto responsável pelo potencial antioxidante deste extrato.

Assim, os dados obtidos demonstram a alta atividade antioxidante da zerumbona, o que aumenta seu potencial como biomolécula a ser explorada em formulações de antimicrobianos de uso tópico contra infecções cutâneas. Além disso, é importante ressaltar que substâncias antioxidantes são responsáveis pela remoção das

espécies reativas de oxigênio (ROS), cofatores de muitas modificações celulares, gerando danos irreversíveis, sendo responsáveis por diversas patologias, inclusive o câncer (NEMEC et al., 2000; SOARES et al., 2008; DASTAN et al., 2016).

Os resultados alcançados no referido trabalho, mostram a diversidade farmacológica da zerumbona, molécula que vem sendo cada vez mais estudada em diversas partes do mundo. Em um recente estudo realizado por Liu e colaboradores (2017), em Taiwan, foi desenvolvida uma pomada contendo 1% de zerumbona comercial ($\geq 98\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilizada no tratamento de feridas induzidas em camundongos. Apresentando resultados satisfatórios, onde no período de 15 dias, obtiveram a cicatrização total do ferimento.

Em um estudo clínico de fase 1, realizado por nosso grupo de pesquisa, na cidade de Manaus/AM, Brasil, Ladeia (2015) avaliou a ação cicatrizante da zerumbona em úlceras de pacientes com pés-diabéticos. Nesse estudo, a zerumbona foi mais eficaz que o tratamento convencional (alginato de cálcio), sendo capaz de promover a cicatrização em um curto intervalo de tempo, quando comparado com o tratamento convencional (dados sob sigilo e ainda não publicados).

Isso reforça os dados obtidos, uma vez que foi observada uma excelente atividade antimicrobiana, frente aos principais microrganismos causadores de infecções cutâneas, aliado a ação antioxidante, além de não apresentar efeitos citotóxicos em células eucarióticas normais.

Portanto, os dados apresentados por este estudo demonstram o potencial do uso da zerumbona como agente antimicrobiano a ser utilizado em formulações fitoterápicas contra infecções cutâneas de uso tópico. Além disso, a ausência de efeitos citotóxicos e a atividade antioxidante confirmam ainda mais o grande potencial farmacêutico e o grande valor econômico agregado a esta biomolécula. Assim, os dados apresentados por estudo, demonstrando o espectro de ação farmacológica da zerumbona, abrem caminho para utilização desta biomolécula na concepção de novas alternativas terapêuticas de uso tópico para tratar infecções cutâneas, com excelente custo-benefício. Entretanto, é importante lembrar que estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação antimicrobiano da zerumbona.

7 CONCLUSÕES:

- A zerumbona obtida dos óleos essenciais do *Z. zerumbet* apresentou excelente atividade antimicrobiana contra os microorganismos *S. aureus*, *P. acnes* e *C. albicans*, agentes etiológicos de infecções cutâneas.
- A zerumbona interfere na formação de biofilmes, o que potencializa sua ação antimicrobiana.
- Além da atividade antimicrobiana, a zerumbona possui capacidade de neutralizar ou reparar atividades de radicais livres, demonstrada por meio de sua capacidade antioxidante verificada neste estudo. Este potencial antioxidante é de grande importância no combate de infecções cutâneas.
- A zerumbona nas concentrações estudadas, não apresenta atividade citotóxica para células eucarióticas de linhagens contínuas, o que demonstra que possivelmente esta biomolécula não tem efeito tóxico em células humanas normais.
- Os resultados obtidos no referido trabalho, aliados ao baixo custo e a diversidade farmacológica atribuídas a zerumbona, apresentam esta molécula bioativa como uma forte candidata na elaboração de formulações fitoterápicas, para o tratamento de infecções cutâneas.

REFERÊNCIAS

ACNE & ACNE SCARS. Advanced Acne Treatment. Disponível em: <http://rejuvimed.com/acne.php>. Acesso em: 18/10/2017.

ALEXEYEV, O.A; JAHNS, A.C. Sampling and detection of skin *Propionibacterium acnes*: current status. **Anaerobe**; 18: 479-483. 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Sistema Tegumentar Humano, epiderme, derme e glândulas**. Disponível em: [The American Cancer Society - Cancer Action Network-acscan.org](http://www.americancancer.org). Acesso em: 18/09/2017.

ANDREO, A. D.; JORGE, N. Capacidade Antioxidante e Estabilidade Oxidativa de *Zingiber officinale*. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**. Vol. 13, n. 1, p. 33-37. 2011.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.C.; ALLEN, L.V. Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos, 6 ed., **Ed. Premier**. 2000.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos** - bases teóricas e uso clínico. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 10 de Outubro de 2016.

ARCHER, N.K.; MAZAITIS, M.J.; COSTERTON, J.W.; LEID, J.G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**. Vol.2 (5), 445-459. 2011.

ARIFF, S., SALEEM, A. F., SOOFI, S.B., & SAJJAD, R. Clinical spectrum and outcomes of neonatal candidiasis in a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 5(03), 216-223. 2011.

BABY, S.M.; DAN, A.R.M. THAHAI. "High content of zerbumbone in volatile oils of *Zingiber zerumbet* from southern India and Malaysia," **Flavour and Fragrance Journal**. Vol. 24, no. 6, pp. 301-308. 2009.

BAGRAMIAN, R.A., GARCIA-GODOY, F., VOLPE, A.R.. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. **Am. J. Dent**. 22, 3-8. 2009.

BANGERT, S.; LEVY, M.; HEBERT, A.A. Bacterial resistance and impetigo treatment trends: a review. **Pediatr Dermatol**. 29:243-248. 2012.

BARAN, M., BOROWSKI, E. e MAZERSKI, J. Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water II. **Biophysical chemistry**, 141(2), 162-168, 2009.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças sexualmente transmissíveis**, 22(1), 22-38. 2010.

BATUBARA, I., SUPARTO, I.H., SADIHAH, S., MATSUOKA, R., MITSUNAGA, T. Effect of *Zingiber zerumbet* essential oils and zerumbone inhalation on body weight of Sprague Dawley rat. *Pak. J. Biol. Sci.* 16, 1028-1033. 2013.

BATUBARA I, MITSUNAGA T, OHASHI H. Brazilin from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. **Journal of Wood Science**. 2010;56(1): p.77-81. 2010.

BERGER T.G.; SHELBERNE. Distúrbios dermatológicos. In: Organizadores. MCPHEE. S.J., PAPADAKIS, M.A., RABOW. M.W.; Tradução: FONSECA. A.V. **CURRENT medicina: diagnóstico e tratamento**. 51. ed. Porto Alegre: AMGH Cap. 6:89-155. 2013.

BHUIYAN, N.I.; CHOWDHURY, J.U. and BEGUM, J., “Chemical investigation of the leaf and rhizome essential oils of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith from Bangladesh,” **Bangladesh Journal of Pharmacology**. Vol. 4, no. 1, p. 9-12. 2009.

BIZZO, H.R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. Vol. 32, n. 3, p. 588-594. 2009.

BOJAR, R.A.; HOLLAND, K.T. Acne and *Propionibacterium acnes*. **Clin Dermato**; 22:375-9. 2004.

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. London: **British Herbal Medicine Association**. p. 239. 1983.

BUTT, M.S.; SULTAN, M.T. Ginger and its health claims: molecular aspects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Vol. 51, n° 5, p. 383-393. 2011.

CLANCY, C.J., HAO, B., SHIELDS, R. K., CHEN, L., PERLIN, D. S., KREISWIRTH, B. N., & NGUYEN, M. H. Doripenem, gentamicin, and colistin, alone and in combinations, against gentamicin-susceptible, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains with various ompK36 genotypes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 58(6), 3521-3525. 2014.

CAMPOS, S.O. Infecção de pele e partes moles. In: Farhat CK, Carvalho LHFR, Succi RCM. **Infectologia Pediátrica**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 95-103. 2008.

CARVALHO, E.G.; UTIYAMA, S.R.; KOTZE, L.M.; Reason, I.T.M. Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. **Rev. bras. alerg. imunopatol**, 187. 2005.

CASSETTARI, V.C., STRABELLI, T., & MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality?. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 9(1), p. 70-76. 2005.

CAVALCANTI, S. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz J Infect Dis**. Vol. 9, n. 1, p. 56-63. 2005.

CHAN A.C.; AGER D.; THOMPSON I.P. Resolving the mechanism of bacterial inhibition by plant secondary metabolites employing a combination of whole-cell biosensors. **J Microbiol Methods**. 93(3):209-17. 2013.

CHEN, C.C.; KUO, M.C.; H.O, C.T. High Performance Liquid Chromatographic determination of Pungent gingerol compounds of ginger. **Journal of Food Science**. Vol. 51, n. 5, p. 1364-65. 1986.

CHILLER, K.; SELKIN, B.A.; MURAKAWA, G.J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. In **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Vol. 6, No. 3, pp. 170-174. 2001.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 4 a ed. revisada e ampl., Ed. da Unicamp, Campinas, 1990.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília, IBDF. 1968.

COSTA, A., ALCHORNE, M.M.A., MICHALANY, N.S. & LIMA, H.C. Acne vulgar: estudo piloto de avaliação do uso oral de ácidos graxos essenciais por meio de análises clínica, digital e histopatológica. **An Bras Dermatol**, 82(2), p. 129-34. 2007.

CRAMTON, S.E., GERKE, C., SCHNELL, N.F., NICHOLS, W.W. & GÖTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and immunity**, 67(10), p. 5427-5433. 1999.

CRAVEIRO, A.A.; DE QUEIROZ, D.C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**. Vol. 16, p. 3, 1993.

CREECH, C.B.; AL-ZUBEIDI, D.N.; Fritz, S.A. Prevention of Recurrent Staphylococcal Skin Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, 29(3), 429-464. 2015.

DAHL, M.V. Strategies for the management of recurrent furunculosis. **Southern medical journal**. Vol. 80(3), 352-356. 1987.

DAI, D.N.; THANG, T.D.; CHAU, T.M.; OGUNWANDE, I.A. Chemical constituents of the root essential oils of *Zingiber rubens* Roxb. and *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **Am. J. Plant. Sci.** Vol.4, p.7-10. 2013.

DASTAN, D., SALEHI, P.E MAROOFI, H. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities on *Laserpitium carduchorum* Hedge e Lamond Essential Oil and Extracts During Various Growing Stages. **Chemistry e biodiversity**, 13(10), p. 1397-1403. 2016.

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R. **Fisiologia e Genética Bacterianas**. Vol I. 2a ed., São Paulo: Harbra do Brasil, p. 421. 1979.

DAVIS, J.S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Int Med J**. Vol. 35, p.79S-96S. 2005.

DEL GIUDICE, P.; HUBICHE, P. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and impetigo. **Br J Dermatol**. 162:905. 2010.

DE OLIVEIRA, T.L., LIMA, E.D.O., DE SOUZA, I.A., & CORNEJO, L.C.Z. Antifungal activity and kinetics of microbial death of extracts obtained from *Streptomyces* spp. isolated from paraibano soils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(1), 60-64. 2010.

DEL RIO A.; CERVERA, C.; MORENO, A.; MOREILLON, P.; MIRO, J.M. Patients at risk of complications of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. **Clin Infect Dis**. Vol.48 (Suppl. 4): S246-53. 2009.

DELEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N.; CHAMBERS, H.F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. Vol. 375, p. 1557-1568. 2010.

DEMOS, M.; MCLEOD, M.P.; NOURI, K. Recurrent furunculosis: a review of the literature. **British Journal of Dermatology**. Vol. 167(4), 725-732. 2012.

DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS, A.D. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**. Vol. 28, n. 1, p. 2-7. 2010.

DI CERBO, A.; PALMIERI, B.; APONTE, M.; MORALES-MEDINA, J.C.; Iannitti, T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. **Journal of Clinical Pathology**. Vol. 69(3), p. 187-203. 2016.

DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133-163. 2007.

DISCOVERLIFE. Zingiber zerumbet, 2015. Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Zingiber+zerumbet>. Acesso em: 20/10/2017.

DONKER, T.; WALLINGA, J.; SLACK, R.; GRUNDMANN, H. Hospital Networks and the Dispersal of Hospital-Acquired Pathogens by Patient Transfer. **PLOS ONE**. Vol. 7(4), e 35002. 2012.

MARTIN DWORKIN. The prokaryotes: Vol. 4: bacteria: firmicutes, cyanobacteria. **Springer Science & Business Media**. 2006.

DUNG, N.X.; CHINH, T.D.; RANG, D.D; LECLERCQ, P.A. "The constituents of the rhizome oil of Zingiber zerumbet (L.) Sm. from Vietnam," **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 5, n^o. 5, pp. 553-555, 1993.

EL-GILANY, A.H.; FATHY, H. Risk factors of recurrent furunculosis. **Dermatol Online J**; 15:16. 2009.

ELLIOTT, Stephen & BRIMACOMBE, Joseph. The medicinal plants of Gunung Leuser National Park, Indonesia. **Journal of ethnopharmacology**. Vol. 19, n. 3, p. 285-317. 1987.

ELSAIE, M.L. Hormonal treatment of acne vulgaris: an update. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**. Vol. 9: 241. 2016.

FANGUEIRO, J.F. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization and cytotoxicity. **International journal of pharmaceutics**. Vol. 461, n. 1, p. 64-73. 2014.

FERREIRA, A.W.; VILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e automunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 443. 2001.

FERREIRA, V.F., ANGONESE, M.P., FRIEDRICH, H.C., WEISS, R.D.N., FRIEDRICH, R.S., & PRAETZEL, J.R. Antimicrobial action of root canal filling pastes used in deciduous teeth. **Revista Odonto Ciência**, 25(1), p. 65-68. 2010.

FERREIRA, M.D.P.S.B. Atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas frente a fungos oportunistas e dermatófitos e ensaios preliminares de seus mecanismos de ação, 2013.

FORMISANO, C. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). **Industrial Crops and Products**. Vol. 63, p. 256-263. 2015.

FOSTER, T.J.; HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**. Vol. 6, p. 484-8. 1998.

FOURNIER, B.; PHILPOTT, D.J.; Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. **Clin Microbiol Rev**; 18:521-40. 2005.

FRAZEE, B.W.; LYNN, J.; CHARLEBOIS, E.D.; LAMBERT, L.; LOWERY, D.; PERDREAU-REMINGTON, F. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. **Ann Emerg Med**. 45:311-320. 2005.

FREITAS, M.A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. *Bioscience Journal*, v. 29, n. 3, p. 781-786, 2013.

FRIEDMAN, A.J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D.O.; CHAMPER, J.; QIN, M.; PIROUZ, A.; KIM, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. **Journal of Investigative Dermatology**, 133(5), p. 1231-1239. 2013.

FROST, D.J., BRANDT, K.D., CUGIER, D. e GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of antibiotics**, 48(4), 306-310, 1995.

FURUKAWA, M., MINEKAWA, A., HARUYAMA, T., NARUI, Y., SUGITA, G., SUGITA, R., ... & IKEDA, K. Clinical effectiveness of ototopical application of mupirocin ointment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* otorrhea. **Otology & Neurotology**, 29(5), p. 676-678. 2008.

GARROS, I.D.C., CAMPOS, A.C.L., TÂMBARA, E. M., TENÓRIO, S. B., TORRES, O. J. M., AGULHAM, M. Â. & ARRUDA, E. C. D. M. (2006). Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras*, 55-65.

GELATTI, L.C.; BONAMIGO, R.R.; BECKER, A.P.; D'AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol**. Vol.84(5), 501-6. 2009.

GILAD, J.; BORER, A.; SMOLYAKOV, R, REISENBERG, K.; SCHLAEFFER F.; LEVY R. Impaired neutrophil functions in the pathogenesis of an outbreak of recurrent furunculosis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among mentally retarded adults. **Microbes Infect**; 8: 1801-1805. 2006.

GIOLO, M.P., & SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 46(3), 225-234. 2010.

GOBBO-NETO, L., & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, 30(2), 374. 2007.

GOLL; FARIA. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, 22(5/6), p. 54-59. 2014.

GOVINDARAJAN, V.S. Ginger-Chemistry, technology and quality evaluation. **CRC Reviews in Food Science and Nutrition**. Vol. 17, p.1 - 96. 1982.

GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**. V. 9, n°. 4, p. 244-253. 2011.

HALVORSEN, J.A. Suicidal Ideation, Mental Health Problems, and Social Impairment Are Increased in Adolescents with Acne: A Population-Based Study. **Journal of Investigative Dermatology**. Vol. 131, n°. 2, p. 363-370. 2011.

HANEEF, J., SHAHARYAR, M., HUSAIN, A., RASHID, M., MISHRA, R., SIDDIQUE, N.A., e PAL, M. Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants. **Drug testing and analysis**, 5(8), 607-613, 2013.

HERIGON, J.C., HERSH, A.L., GERBER, J.S., ZAOUTIS, T.E. & NEWLAND, J.G. Antibiotic management of *Staphylococcus aureus* infections in US children's hospitals, 1999-2008. **Pediatrics**, 125(6), e1294-e1300. 2010.

HOEGER, P.H. Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *S. aureus* strains in children with atopic dermatitis. **Pediatr Allergy Immunol**. 15:474-477. 2004.

HUANG, G.; CHIEN, T.; CHEN, L.; WANG, C. Antitumor effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388D1 cells in vitro and in vivo. **Planta Med**. Vol, 71, p. 219-224. 2005.

IBLER, K.S.; KROMANN, C.B. Recurrent furunculosis-challenges and management: a review. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, 7, 59. 2014.

JAMAL, A.; JAVED, K.; ASLAM, M.; JAFRI, M.A. Gastroprotective effect of cardamom, *Elettaria cardamomum* Maton fruits in rats. **J. Ethnopharmacol.** 103, 149-153. 2006.

JANG, D.S., HAN, A., PARK, G., JHON, G., SEO, E. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. **Arch. Pharm. Res.** 27, p. 386-389. 2004.

JENKINS, T.C.; KNEPPER, B.C.; JASON MOORE, S.; SAVELI, C.C.; PAWLOWSKI, S.W.; PERLMAN, D.M.; BURMAN, W. J. Microbiology and Initial Antibiotic Therapy for Injection Drug Users and Non-Injection Drug Users with Cutaneous Abscesses in the Era of Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Academic Emergency Medicine**. Vol. 22(8), 993-997. 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 354. 2013.

JÜTTE, R.; HEINRICH, M.; HELMSTÄDTER, A.; LANGHORST, J.; MENG, G.; NIEBLING, W. e TRAMPISCH, H.J. Herbal medicinal products Evidence and tradition from a historical perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, 207, 220-225. 2017.

JYOTHILAKSHMI, M., JYOTHIS, M., NARAYANAN, G.N.H. e LATHA, M.S. Antidermatophytic and protease-inhibiting activities of zerumbone: A natural sesquiterpene from the rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex JE; Smith. **Pharmacognosy magazine**, 13(49), 2, 2007.

KANAYAMA, S., OKAMOTO, K., IKEDA, F., ISHII, R., MATSUMOTO, T., HAYASHI, N., & GOTOH, N. Bactericidal activity and post-antibiotic effect of ozenoxacin against *Propionibacterium acnes*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 23(6), p.374-380. 2017.

KARS, M.; VAN, D.H.; SALIMANS, M.M.; BARTELINK, A.K.; VAN DE WIEL, A. Association of furunculosis and familial deficiency of mannose-binding lectin. **Eur J Clin Invest.** 35:531-534. 2005.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. **Crit Care Clin.** Vol. 29:547-62. 2013.

KHAN, S.N.; KHAN, A.U. Breaking the Spell: Combating Multidrug Resistant 'Superbugs'. **Frontiers in microbiology**, p. 7. 2016.

KHATUN, A.; NASRIN, S.; HOSSAIN, M.T. Large scale multiplication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) from shoot-tip culture. **Online J. Biol. Sci.** Vol. 3, p. 59-64. 2003.

KLEVENS, R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA.** Vol. 298, p. 1763-1771. 2007.

KLINE, K.A.; LEWIS, A.L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. **Microbiology Spectrum.** Vol. 4(2) 10.1128. 2016.

KLUKA, E.A. Emerging dilemmas with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Current opinion in otolaryngology e head and neck surgery.* Vol. 19(6), 462-466. 2011.

KLUYTMANS-VANDENBERGH, M.F; KLUYTMANS, J.A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** 12:9-15. 2006.

KOGA, A.Y., Beltrame, F.L. e PEREIRA, A.V. Several aspects of *Zingiber zerumbet*: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 26(3), p. 385-391. 2016.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.; SCHRECKEN BERGER, P.; WINN JR, W. C.; PROCOP, G.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico.** 6ª Edição, Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica, 1565p. 2008.

KONING, S.; VAN DER SANDE, R.; VERHAGEN, A.P.; VAN SUIJLEKOM-SMIT, L.W.; MORRIS, A.D.; BUTLER, C.C. Interventions for impetigo. **Cochrane Database Syst Ver.** 2012.

KUETE, V.; WIENCH, B.; ALSAID, M.S.; ALYAHYA, M.A.; FANKAM, A.G.; SHAHAT, A.A.; EFFERTH, T. Cytotoxicity, mode of action and antibacterial activities of selected Saudi Arabian medicinal plants. **BMC Complementary & Alternative Medicine**. Vol.13, n. 7, p. 354-365. 2013.

LARBCHAROENSUB, N., WONGWICHAI, S., CHONGTRAKOOL, P., BOONGIRD, A., NOINANG, A., PARITPOKEE WATCHARANANAN, S. & PHUDHICHAREONRAT, S. Cerebral aspergillosis and cerebral candidiasis; a retrospective analysis of clinicopathologic features in Ramathibodi Hospital. **Medical journal of the Medical Association of Thailand**, 93(12), 1443. 2010.

LADEIA, M.M. **Avaliação do potencial terapêutico do gengibre amargo (*Zingiber zerumbet*) no processo inflamatório de portadores de úlceras de pé diabético**. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Biologia Urbana) - Universidade Nilton Lins, Manaus/AM. 2015.

LE COINTE, P. Árvores e plantas úteis: indígenas e aclimatadas. São Paulo: Nacional CORREA (**Série Brasileira**, 251), p. 389-390. 1947.

LEITE, A.M. Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre espécies bacterianas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2007.

LEVY, P.Y.; FENOLLAR, F.; STEIN, A.; BORRIONE, F.; COHEN, E.; LEBAIL, B. e RAOULT, D. Propionibacterium acnes postoperative shoulder arthritis: an emerging clinical entity. **Clinical Infectious Diseases**, 46(12), 1884-1886, 2008.

LI, Liqing; KONG, Liang; SONG, Hongquan. The therapeutic effect of zerumbone on chronic gastritis via antioxidant mechanisms. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Vol. 14, n. 3, p. 2505-2510. 2017.

LINHARES, I.; RAPOSO, T.; RODRIGUES, A.; ALMEIDA, A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). **BMC Infectious Diseases**. Vol.13. 2013.

LOWE, J.S.; ANDERSON, P.G. **Stevens e Lowe's Human Histology**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, p. 49-363. 2015.

- LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med.** 339:520-32. 1998.
- LUNA, RODRÍGUEZ-NORIEGA; BAVESTRELLO. Tratamento de **Staphylococcus aureus** resistente à meticilina na América Latina. 2010.
- MANAREY, C.R.; ANAND, V.K.; HUANG, C. Incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing chronic rhinosinusitis. **Laryngoscope.** Vol. 114:939-941. 2004.
- MANCINI, A.J. Bacterial skin infections in children: the common and the not so common. **Pediatr Ann.** 29:26-35. 2000.
- MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence.** Vol. 4, n. 2, p. 119-128. 2013.
- MARCHAIM, D.; CHOPRA, T.; POGUE, J.M. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. **Antimicrob Agents Chemother.** Vol. 55(2):593-599. 2011.
- MENEZES, E.A., GUERRA, A.C.P., RODRIGUES, R.D.C.B., PEIXOTO, M.M.L. V., LIMA, L.S., & CUNHA, F.A. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de suscetibilidade a antifúngicos. **J Bras Patol Med Lab,** 40(5), 299-305. 2004.
- MONTGOMERY, C.P; DANIELS, M.D; ZHAO, F.; SPELLBERG, B.; CHONG, A.S.; DAUM, R.S. Local inflammation exacerbates the severity of *Staphylococcus aureus* skin infection. **PLOS ONE;** 8: e69508. 2013.
- MORAN, G.J.; KRISHNADASAN, A. GORWITZ, R.J.; Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. **N Engl J Med.** 355:666-674. 2006.
- MURAKAMI, A.; TAKAHASHI, D.; KINOSHITA, T.; KOSHIMIZU, K.; KIM, H.W.; YOSHIHIRO NAKA-MURA, Y.; JIWAJINDA, S.; TERAQ, J.; OHIGASHI, H.; Zerumbone, a South east Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, pro-inflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the unsaturated carbonyl group is a prerequisite. **Carcinogenesis.** Vol. 23, p.795-802. 2002.

NEMEC, A., DROBNI-KOSOROK, M., SKITEK, M., PAVLICA, Z., GALAC, S., BUTINAR, J. Total antioxidant capacity (TAC) values and their correlation with individual antioxidants in serum of healthy beagles, **Acta Vet.** V. 69, p.297-303, 2000.

NADER, T.T., COPPEDE, J.S., AMARAL, L.A., & PEREIRA, A.M.S. Atividade antibiofilme de diterpeno isolado de Croton antisiphiliticus frente Staphylococcus aureus. **Ars Veterinaria**, 30(1), p. 32-37. 2014.

NIERO, R.; BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. **CECHINEL-FILHO, V.(Org.). Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos**, p. 1-14. 2010.

NIEWERTH, M., & KORTING, H.C. Candida albicans and the principle of opportunism. An essay. **Mycoses** 45(7-8), p.253-258. 2002.

NOBRE, C.A., OBREGÓN, G.O., MARENGO, J.A., FU, R., & POVEDA, G. Características do clima amazônico: Aspectos principais. **Amazonia and Global Change, Geophysical Monograph Series, American Geophysical Union**, 49-162. 2009.

NOBILE, C.J., & JOHNSON, A.D. Candida albicans biofilms and human disease. **Annual review of microbiology**, 69, 71-92. 2015.

NORTH, J.R., TAKENAKA, S., ROZEK, A., KIELCZEWSKA, A., OPAL, S., MORICI, L.A., & DONINI, O. A novel approach for emerging and antibiotic resistant infections: innate defense regulators as an agnostic therapy. **Journal of biotechnology**, 226, p. 24-34. 2016.

ONDERDIJK, A.J.; VAN DER ZEE, H.H.; ESMANN, S. Depression in patients with hidradenitis suppurativa. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 27: 473-478. 2013.

OPLUSTIL, C.P. **Procedimentos básicos em Microbiologia clínica.** 2a ed. São Paulo: Sarvier, p. 340. 2004.

OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. **Netter Bases da Histologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, p. 244. 2008.

OWENS, W.E.; NICKERSON, S.C. Morphologic study of *Staphylococcus aureus* L-form, reverting, and intermediate colonies in situ. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 27(6), 1382-1386. 1989.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical reviews in microbiology**, 36(1), 1-53. 2010.

PAPPAS, L.M.J., UEDA, S.M.Y., MARTINO, M.D.V., NAVARINI, A., & MARTINI, I.J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 45(1), p. 17-23. 2009.

PARKER, D.; PRINCE, A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. **Seminars in Immunopathology**. Vol. 34(2), 281-297. 2012.

PARK, J., PARK, J., JANG, S., KIM, S., KONG, S., CHOI, J. & PARK, B. FTFD: an informatics pipeline supporting phylogenomic analysis of fungal transcription factors. **Bioinformatics**, 24(7), p. 1024-1025. 2008.

PATRA, S., MUKHERJEE, S., BARUI, A.K., GANGULY, A., SREEDHAR, B., & PATRA, C.R. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. **Materials Science and Engineering: C**, 53, p. 298-309. 2015.

PEREIRA, L.B. Impetigo-review. **Anais brasileiros de dermatologia**. Vol. 89(2), 293-299. 2014.

PERISMAL, E.K., AKHTAR, M.N., MOHAMAD, A.S., KHALID, M.H., MING, O. H., KHALID, S. & LAJIS, N. Zerumbone-Induced Antinociception: Involvement of the l-Arginine-Nitric Oxide-cGMP-PKC-K⁺ATP Channel Pathways. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, 108(3), p. 155-162. 2010.

PERLROTH, J.; KUO, M.; TAN, J.; BAYER, A.S.; MILLER, L.G. Adjunctive use of rifampin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review of the literature. **Arch Intern Med**. Vol.168, p. 805-819. 2008.

PETRY, V.; BESSA, G.R.; POZIOMCZYCK, C.S.; OLIVEIRA, C.F.; WEBER, M.B.;

BONAMIGO, R.R. Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. **An Bras Dermatol.** 87:729-734. 2012.

PINHEIRO, C.C. 2005. *Estudo químico e farmacológico das raízes de Zingiber zerumbet (L) Smith (Zingiberaceae), cultivada em Manaus/Am.* **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-Amazonas, p 5. 2005.

PIRBALOUTI, A.G.; HASHEMI, M.; GHAFAROKHI, F.T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products.** Vol. 48, p. 43-48. 2013.

PRABHAKARA, R., HARRO, J.M., LEID, J.G., HARRIS, M. & SHIRTLIFF, M.E. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection. **Infection and immunity**, 79(4), 1789-1796. 2011.

PRASANNAN, R., KALESH, K.A., SHAMNUNGAM, M.K., NACHIYAPPAN, A., RAMACHANDRAN, L., NGUYEN, A.H., KUMAR, A.P., LAKSHAMANAN, M., AHN, K.S., SETHI, G. Keycell signaling pathways modulated by zerumbone: role in the prevention and treatment of cancer. **Biochem. Pharmacol.** 84, 1268-1276, 2012.

RAZERA, F., STEFANI, S., BONAMIGO, R.R., OLM, G.S., DIAS, C.A.G., & NARVAEZ, G.A. CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. **An Bras Dermatol**, 84(5), p. 515-8. 2009.

ROBB, Peter J.; BENDIG, Justin. Prevalence of MRSA in elective day case pediatric ENT surgical patients. **International journal of pediatric otorhinolaryngology.** Vol. 74, n. 12, p. 1430-1431. 2010.

RODRIGUES, D.F., NEVES, D.R., PINTO, J.M., ALVES, M.F.F., & FULGÊNCIO, A.C.F. Results of patch-tests from Santa Casa de Belo Horizonte Dermatology Clinic, Belo Horizonte, Brazil, from 2003 to 2010. **Anais brasileiros de dermatologia**, 87(5), p. 800-803. 2010.

ROSSI, F.; ANDREAZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma.** Ed. Atheneu. São Paulo. 2005.

ROUT K.K.; MISHRA ,S.K. and SHERMA, J. “Development and validation of an HPTLC method for analysis of zerumbone, the anticancer marker from Zingiber zerumbet,” *Acta Chromatographica*. Vol. 21, n^o. 3, pp. 443-452, 2009.

RIBAS, J.R., & SMITH, S.B.M. O Marketing Verde Recompensa?. **Cadernos gestão social**, 2(1), p. 87-104. 2009.

SABU, A. **Sources**, properties and applications of microbial therapeutic enzymes. 2003.

SHARIFI-RAD, J., HOSEINI-ALFATEMI, S. M., SHARIFI-RAD, M. & SETZER, W.N. Chemical composition, antifungal and antibacterial activities of essential oil from *Lallemantia royleana* (Benth. In Wall) Benth. **Journal of Food Safety**, 35(1), p.19-25. 2015.

SHENG, WANG, W., GUO, Y., PEI, X., HU, Y., BAI, L., SUN, A. & LI, F. Genetic characterization and antimicrobial susceptibility analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat food and pig-related sources in China. **Wei sheng yan jiu-Journal of hygiene research**, 42(6), p. 925-931. 2013.

SHOKRYAZDAN, P.; SIEO, C.C.; KALAVATHY, R.; LIANG, J.B.; ALITHEEN, N.B.; FASELEH JAHROMI, M.; HO,Y.W. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. **Bio Med Research International**, 927268. 2014.

SAKAMOTO, F.H.; LOPES, J.D.; ANDERSON, R.R. Photodynamic therapy for acne vulgaris: A critical review from basics to clinical practice Part I. Acne vulgaris: When and why consider photodynamic therapy? **Journal of the American Academy of Dermatology**. Vol. 63, n. 2, p. 183-193. 2010.

SALES, G.W.P., BATISTA, A.H.D.M., Rocha, L.Q., e Nogueira, N.A.P. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 35(4), 2015.

SAMPAIO, S.A.P; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 3ed. São Paulo: Artes Médicas; 1585. 2007.

SANTOS, L.; SANTOS, I.B.; ASSIS, A.M.L.; XAVIER, D.E. Determinação da produção de metalo- beta- lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Vol. 38, n. 4, p. 291-296. 2002.

SARRAZIN, S.L.F., SILVA, L.A., ASSUNÇÃO, A.P.F., OLIVEIRA, R.B.F. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Journal Molecules**, pp. 1860-1871. 2015.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.; DUARTE, M.; REHDER, V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol.35, n.4, p. 275-80. 2004

SIDAHMED, H.M.A; HASHIM, N.M; ABDULLA, M.A; ALI, H.M; MOHAN, S.; ABDELWAHAB, S.I. Antisecretory, Gastroprotective, Antioxidant and Anti-Helicobacter Pylori Activity of Zerumbone from Zingiber Zerumbet (L.) Smith. **Journal pone PLoS** 10 (3):0121060-0121060. Schliesser, T.H.; Strauch, D. 1981. *Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft*. Stuttgart: Enke Verlag, p. 455. 2015.

SILVA, V.A.D. Atividades antimicrobiana, citotóxica e genotóxica do óleo essencial de ocimum basilicum (lamiaceae) e do linalol (**Dissertação de Mestrado**) 2015.

SILVA, V.A.D. Atividades antimicrobiana, citotóxica e genotóxica do óleo essencial de ocimum basilicum (lamiaceae) e do linalol. 2014.

SINHA, P.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, N.; YADAV, N.P. New perspectives on antiacne plant drugs: Contribution to modern therapeutics. **BioMed research international**. 2014.

SIMPSON, N.B.; CUNLIFFE, W.J. Disorders of the sebaceous glands. **Rook's Textbook of Dermatology, Seventh Edition**, p. 2121-2196. 2004.

SIMPSON, R.C.; GRINDLAY, D.J.; WILLIAMS, H.C. What's new in acne? An analysis of systematic reviews and clinically significant trials published in. **Clin Exp Dermatol**. Vol. 36: 840-843. 2011.

SHITTU A.O, UDO E.E, LIN J. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates expressing low- and high-level mupirocin resistance in Nigeria and South Africa. **BMC Infect Dis**, p.9:10. 2009.

SOGIMIG. Manual de ginecologia e obstetrícia. 5.ed. Co- opmed, Belo Horizonte. p. 1308. 2012.

SOARES, M., WELTER, L., GONZAGA, L., ALESSANDRO, L.I.M.A., MANCINI-FILHO, J., e ROSEANE, F.E.T.T.. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28(3), 727-732 2008.

SOLIMINI, R.; BUSARDÒ, F.P.; ROTOLO, M.C.; RICCI, S.; MASTRO, B.L.; MORTALI, C. e PALMI, I. Hepatotoxicity associated to synthetic cannabinoids use. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 21(1 Suppl), p. 1-6. 2017.

SOULI, M.; GALANI, I.; ANTONIADOU, A.; An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumonia* carbapenemase 2-producing *K. pneumonia* in a Greek university hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Clin Infect Dis**. Vol. 50(3):364-373. 2009.

SRIVASTAVA, A.K.; SRIVASTAVA S.K. Essencial Oil Composition of Zingiber zerumbet (L.), Smith, from India. **Journal of Essencial Oil Research**. Vol. 12(5), p. 595-597. 1997.

STERN, Adi; SOREK, Rotem. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. **Bioessays**. Vol. 33, n. 1, p. 43-51. 2011.

SUH, D.H.; KWON, H.H.; What's new in the physiopathology of acne. **Br J Dermatol**. 172(suppl 1):13-19. 2015.

SULAIMAN, M.R., MOHAMAD, T.A.S.T., MOSSADEQ, W.M.S., MOIN, S., YUSOF, M., MOKHTAR, A.F., ZAKARIA, Z.A., ISRAF, D.A., LAJIS, N. Antinociceptive activity of the essential oil of *Zingiber zerumbet*. **Planta Med**. 76, p. 107-112. 2010.

SULTANA, S.; RIPA, F.A.; HAMID, K. Comparative antioxidant activity study of some commonly used spices in Bangladesh. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. Vol. 13, n° 7, p. 340-343. 2010.

TAKADA, Y.; MURAKAMI, A.; AGGARWAL, B.B. Zerumbone abolishes NF- κ B and I κ B α kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion. **Oncogene**. Vol. 24, p. 6957-6969. 2005.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Med.**, 119 (Suppl. 1), S3-S10. 2006.

THANGAMANI, S.; YOUNIS, W.; SELEEM, M.N. Repurposing ebsele for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. **Sci Rep**; 5:11596. 2015.

TOMMASI, R.; BROWN, D.G.; WALKUP, G.K.; MANCHESTER, J.I.; MILLER, A.A. ESKAPE: the labyrinth of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. Vol. 14(8), 529-542. 2015.

TONG, S.Y.C.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 28(3), 603-661. 2015.

TORBATI, M., NAZEMIYEH, H., LOTFIPOUR, F., ASNAASHARI, S., NEMATI, M.; FATHIAZAD, F. Composition and antibacterial activity of *Heracleum transcaucasicum* and *Heracleum anisactis* aerial parts essential oil. **Advanced pharmaceutical bulletin**, 3(2), 415. 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. Ed. 10, Porto Alegre: **Artmed**, 1(5):271. 2010.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: **Artmed**. 1(5):27. 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. *Microbiologia. Staphylococcus aureus*. São Paulo: **Atheneu**, cap. 20, p. 175-82. 2012.

VAN HAL, S.J., MATHUR, G., KELLY, J., ARONIS, C., CRANNEY, G.B., & JONES, P.D. The role of transthoracic echocardiography in excluding left sided infective endocarditis in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Journal of Infection**, 51(3), p. 218-221. 2005.

VAZ, Gil Nuno. Marketing institucional: o mercado de idéias e imagens. **Pioneira Thomson Learning**. 2003.

VEIGA, Junior, VALDIR, F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**. Vol. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

VENSKUTONIS, R.; POLL, L.; LARSEN, M. Influence of drying and irradiation on the composition of volatile compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Flavour and Fragrance Journal, Lithuania**. Vol. 11, n. 2, p. 123-128, **Química Nova**, 1(28). 519-528pp. 1996.

VISHWANATHA. H.N., NIRAGUNA BABU. P., GOWRISHANKAR B.S. AND SHRIDHAR. S.B. Antimicrobial activity of zerumbone from zingiber zurumbet against *staphylococcus epidermidis* and *aspergillus* spp. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Tecnology**, Vol. 3 (4), p. 40-43. 2012.

VIYOCH, J.; PISUTTHANAN, N.; FAIKREUA, A.; NUPANGTA, K.; WANGTORPOL, K.; NGOKKUEN, J. Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. **International journal of cosmetic science**. Vol. 28(2), 125-133. 2006.

VUONG, C., YEH, A.J., CHEUNG, G.Y., & OTTO. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Expert opinion on investigational drugs**, 25(1), 73-93. 2016.

WAGENLEHNER, F.M.E.; WEIDNER, W.; NABER, K. G. Emergence of antibiotic resistance amongst hospital-acquired urinary tract infections and pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. **Journal of Hospital Infection**. Vol. 60, n. 3, p. 191-200. 2005.

WAHAB, A.; ABDUL, A.B.; ALZUBAIRI, A.S.; ELHASSAN, M.M.; MOHAN, S. *In vitro* ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Vol. 2. 2009.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140-146. 2008.

WHITFELD, M.; GUNASINGAM, N.; LEOW, L.J.; SHIRATO, K.; PREDA, V. *Staphylococcus epidermidis*: a possible role in the pustules of rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Vol. 64(1), 49-52. 2011.

WILKIN, J.; DAHL, M.; DETMAR, M.; DRAKE, L.; FEINSTEIN, A.; ODOM, R. Standard classification of rosacea: report of the National Rosacea Society expert committee on the classification and staging of rosacea. **J Am Acad Dermatol**; 46:584-7. 2002.

XIAN, M., ITO, K., NAKAZATO, T., SHIMIZU, T., CHEN, C., YAMATO, K., MURAKAMI, A., OHI-GASHI, H., IKEDA, Y., KIZAKI, M. Zerumbone, a bioactive sesquiterpene, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells via a Fas-andmitochondria-mediated pathway. **Cancer Sci**. 98, 118-126, 2007.

YOB N.J.; JOFRRY, S.M.; AFFANDI, M.M.R.; THE, L. K.; SALLEH, M.Z. and ZAKARIA Z.A. "Zingiber zerumbet (L.) Smith: a review of its ethnomedicinal, chemical, and pharmacological uses," Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 20, Article ID 543216, p.12. 2011.

YU, F.; OKAMTO, S.; NAKASONE, K.; ADACHI, K.; MATSUDA, S.; HARADA, H.; MISAWA, N.; UTSUMI, R. Molecular cloning and functional characterization of humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith). **Planta** 227, p. 1291-1299. 2008.

ZU, Y.; YU, H.; LIANG, L.; FU, Y.; EFFERTH, T.; LIU, X.; WU, N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, 15(5), 3200-3210. 2010.