

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIÇÃO DE BIOFILME
PELO ÓLEO DE FOLHAS SECAS DE *Eucalyptus staigeriana***

MARCOS SALDANHA CORRÊA

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

Março/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIÇÃO DE BIOFILME
PELO ÓLEO DE FOLHAS SECAS DE *Eucalyptus staigeriana***

Marcos Saldanha Corrêa
Biomédico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Controle Microbiológico.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Março/2017

FOLHA HOMOLOGAÇÃO

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INIBIÇÃO DE BIOFILME PELO ÓLEO DE FOLHAS SECAS DE *Eucalyptus staigeriana*

Autor: Marcos Saldanha Corrêa

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de plantas e apresentam diversas propriedades para fins medicinais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*, verificar sua atividade antimicrobiana e antibiofilme frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e avaliar a expressão dos genes de virulência e resistência em *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE) na ausência e presença de concentração sub-inibitória do óleo essencial, por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A caracterização do óleo foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a massa (GC-MS) verificou-se a presença de 21 compostos, sendo os constituintes majoritários o geranial (28,67 %), neral (19,68 %) e limoneno (17,29 %). A ação antimicrobiana foi avaliada e observou-se que o óleo apresentou atividade frente a bactérias gram-positivas, com diâmetros de halos de inibição de 0 a >45 mm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para bactérias gram-positivas, sensíveis e resistentes a agentes antimicrobianos como VRE, e variou de 0,19 a 6,25 %. Ação antibiofilme do óleo foi avaliada tanto na formação, quanto sob um biofilme pré-estabelecido. O óleo essencial apresentou capacidade de inibir a formação do biofilme de todas as cepas testadas, mas pouca ou nenhuma capacidade de remoção do biofilme pré-formado. Na análise de expressão gênica por qPCR para *L. monocytogenes*, verificou-se que três dos genes de estresse celular (*sufS*, *sod* e *degU*) apresentaram uma diferença significativa na presença do óleo. Para a cepa de *E. faecalis* VRE, nenhum gene selecionado apresentou alteração na expressão gênica. Como conclusão, este estudo demonstrou que o óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* possui atividade antimicrobiana do frente a bactérias gram-positivas e sem atividade em gram-negativas.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2017.

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND BIOFILM INHIBITION OF DRY LEAF OIL OF *Eucalyptus staigeriana*

Author: Marcos Saldanha Corrêa

Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Essential oils are secondary metabolites extracted from plants and they have been showing several medicinal properties. The aim of this study was to characterize the essential oil extracted from dry leaf of *E. staigeriana*, as well as to verify the antimicrobial and anti-biofilm activities against gram-positive and gram-negative bacteria, and to evaluate the expression of virulence and resistance genes in *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* vancomycin resistant (VRE) in the absence and presence of sub-inhibitory concentration of the essential oil by quantitative real time PCR (qPCR). The oil characterization was performed by CG-MS and it was verified the presence of 21 compounds, being the geranial (28.67 %), neral (19.68 %) and limonene (17.29 %) the major compounds. The antimicrobial activity was evaluated and it was observed that the essential oil has effect against gram-positive, with inhibition zone diameter ranges from 0 to 45 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined, to sensible and resistant gram-positive bacteria to antimicrobial agents, such as VRE, and varied between 0.19 to 6.25 %. The anti-biofilm action of the oil was verified on formation, and under a pre-established biofilm. The essential oil showed capacity to inhibit the biofilm formation for all tested strains, but few or no ability to remove the pre-established biofilm. In the analysis of gene expression by qPCR for *L. monocytogenes*, three cell stress genes (*sufS*, *sod* and *degU*) with significant difference in the presence of the oil. For *E. faecalis* VRE strain no one of the selected genes showed alteration in the gene expression. In conclusion, this study demonstrates the potential of essential oil from dry leaf of *E. staigeriana* for future use in the control of gram-positive bacteria.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3.	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Resistência microbiana	15
3.2	Biofilmes.....	16
3.3	Bactérias de importância clínica	18
3.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.3.2	<i>Enterococcus</i>	19
3.4	Bactérias de importância alimentar	20
3.4.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.4.2	<i>Bacillus cereus</i>	21
3.5	Genes envolvidos no estresse e virulência em <i>Listeria monocytogenes</i>	22
3.6	Genes envolvidos no estresse em <i>Enterococcus</i>	24
3.7	Plantas medicinais e óleos essenciais	25
3.8	Família <i>Myrtaceae</i>	26
3.8.1	Espécie <i>Eucalyptus staigeriana</i>	27
4.	METODOLOGIA	29
4.1	Isolados bacterianos.....	29
4.2	Extração e caracterização do óleo essencial.....	30
4.3	Avaliação da atividade do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i>	31
4.3.1	Ensaio de disco difusão.....	31
4.3.2	Determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial .	31
4.4	Determinação da capacidade do óleo essencial de inibir a formação do biofilme e remover o biofilme pré-formado.....	32
4.4.1	Ensaio de inibição da formação do biofilme	32
4.4.2	Ensaio da avaliação da inibição do biofilme pré-formado.....	33
4.5	Análise da expressão de genes de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>Enterococcus</i> VRE frente a dose sub-inibitória do óleo	

	essencial.....	33
4.5.1	Análise da expressão de genes em <i>Listeria monocytogenes</i>	34
4.5.2	Análise da expressão de genes de <i>Enterococcus</i> VRE.....	34
4.6	Extração de RNA.....	34
4.7	RT-PCR.....	34
4.8	Ensaio quantitativo da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)	35
4.9	Análise estatística.....	36
5.	RESULTADOS	38
5.1	Caracterização do óleo do óleo essencial de <i>E. staigeriana</i>	37
5.2	Atividade do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas	38
5.3	Determinação da Concentração inibitória mínima do óleo essencial	38
5.4	Inibição da formação de biofilme e do biofilme pré-formado	39
5.5	Efeito do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> na expressão de genes de virulência e estresse celular em <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.....	5
5.6	Efeito do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> na expressão de genes de virulência de <i>Enterococcus</i> VRE	6
6.	DISCUSSÃO	49
6.1	Caracterização do óleo essencial de <i>E. staigeriana</i>	48
6.2	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i>	49
6.3	Inibição da formação de biofilme e do biofilme pré-formado	51
6.4	Efeito do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> na expressão de genes de virulência	54
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Cepas pertencentes à bacterioteca do laboratório 220-E da UFRGS utilizadas no estudo.....	29
Tabela 2: Genes e <i>primers</i> utilizados para realização do ensaio de expressão gênica em <i>L. monocytogenes</i> após o tratamento com ¼ da CIM do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i>	35
Tabela 3: Genes e <i>primers</i> utilizados para realização do ensaio de expressão gênica em <i>Enterococcus</i> VRE após o tratamento com ¼ da CIM do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i>	36
Tabela 4: Resultados da técnica da cromatografia gasosa associada a um detector de massas para identificação dos constituintes presentes no óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i>	37
Tabela 5: Resultados do ensaio de disco difusão do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i>	38
Tabela 6: Resultados da determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>E. staigeriana</i>	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Etapas do processo de formação de biofilme.....	17
Figura 2: Resultados da inibição da formação do biofilme na concentração da MIC, MICX2 e MIC/2 do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> para cada cepa sendo * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$, *** para $p<0,001$ e **** para $p<0,0001$ com relação ao controle positivo.....	43
Figura 3: Resultados do ensaio de inibição da formação do biofilme pré-formado na concentração da MIC, MICX2 e MIC/2 do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> para cada cepa sendo * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$, *** para $p<0,001$ e **** para $p<0,0001$ com relação ao controle positivo.....	45
Figura 4 Expressão relativa dos genes para cepa de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 normalizados com os genes <i>gap</i> e <i>rpoB</i> na presença de sub-dose do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> . Controle somente com micro-organismo e TSB. Tratamento com micro-organismo e ¼ da CIM do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> . Letras diferentes nas colunas representam valores estatisticamente significativos ($p<0.05$).....	46
Figura 5: Expressão relativa dos genes para cepa de <i>Enterococcus</i> VRE normalizados com os genes <i>gap</i> e 23S na presença de sub-dose do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> . Controle somente com micro-organismo e TSB. Tratamento com micro-organismo e ¼ da CIM do óleo essencial de folhas secas de <i>E. staigeriana</i> . Letras diferentes nas colunas representam valores estatisticamente significativos ($p<0.05$).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
Δ	Delta
C _T	Threshold cycle
O ₂ ⁻	Superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetros
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
p/v	Parte por volume
v/v	Volume por volume
UFC/g	Unidade formadora de colônia por grama
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
<i>ace</i>	Gene da proteína do precursor da adesão ao colágeno
<i>actA</i>	<i>Precursor de proteína indutora do conjunto de actina</i>
<i>agrA</i>	Gene da proteína do regulador acessório da proteína A
<i>agrB</i>	Gene da proteína do regulador acessório da proteína B
<i>agrC</i>	Gene da proteína do regulador acessório da proteína C
<i>agrD</i>	Gene da proteína do regulador acessório da proteína D
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>asa</i>	Gene da proteína da substância de agregação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>bop</i>	Gene da proteína do biofilme em superfície plástica
CDC	<i>American Centers for Disease Control</i>
cDNA	DNA complementar
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>

ctc	Gene da proteína do estresse celular
<i>degU</i>	Gene da proteína reguladora transcricional DegU
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
EPS	Exopolissacarídeo
<i>flaA</i>	Gene da proteína da flagelina A
FID	Ionização de chama
<i>fur</i>	Gene da proteína da regulação de absorção férrica
<i>gap</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC-MS	Cromatografica gasosa acoplada a massa
Hly	Gene da proteína da listeriolisina O
ICBS	Instituto de Ciencias Basicas da Saude
KPa	Quilopascal
<i>mpl</i>	Gene da proteína do precursor de metaloproteinase de zinco
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NY	<i>New York</i>
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>plcA</i>	Gene da proteína da fosfolipase A associada à membrana
<i>plcB</i>	Gene da proteína da fosfolipase B associada à membrana
<i>prfA</i>	Gene da proteína do fator de libertação da cadeia peptídica RF-1
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>rpoB</i>	Gene da proteína da subunidade beta da RNA polimerase
SOD	Superóxido dismutase
<i>sufS</i>	Gene da proteína cisteína desulfurase
<i>sufU</i>	Gene da proteína do putativa do andaime
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente a Vancomicina

1. INTRODUÇÃO

O aumento do número de bactérias resistentes a antimicrobianos é observado em várias partes do mundo e tem afetado tanto humanos quanto animais. A maioria dos antimicrobianos empregados atualmente na clínica médica e veterinária foi isolado de micro-organismos do solo, que os produzem contra outras espécies microbianas, por uma competição por nutrientes. Com isso, ao passar do tempo, esta competição microbiana já induzia o processo de resistência a estes compostos naturais ao longo de décadas (HILTUNEN, VIRTA e LAINE, 2016).

A resistência microbiana é caracterizada pela capacidade de micro-organismos se desenvolverem na presença de altas concentrações do antimicrobiano, que normalmente inibiriam seu crescimento em doses usualmente utilizadas (MARIA-NETO et al., 2015). Na última notificação do *American Centers for Disease Control* (CDC) estima-se que mais de dois milhões de novos casos e mais de 23.000 mortes tenham sido causadas por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos nos Estados Unidos da América (EUA) em 2013.

Mecanismos de resistência microbiana têm sido descritos, e destacam-se a produção de enzimas que inativam ou modificam os agentes antimicrobianos, ou proteínas da parede celular que funcionam com bombas de efluxo. A formação de biofilmes, que é a capacidade dos micro-organismos aderirem a superfícies bióticas ou abióticas e produzirem uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), também é uma forma pela qual as bactérias podem não ser afetadas pelos antimicrobianos (FLUIT et al., 2001).

O biofilme é considerado uma interação entre micro-organismos que pode ser formado por estirpes de uma mesma espécie, ou na maioria das vezes, polimicrobiano. Esses micro-organismos ficam imersos em uma matriz aderida a uma superfície revestida por uma camada de EPS, que se constitui em polissacarídeo, proteínas e ácidos nucleicos (MOHAMED e HUANG, 2007).

A medicina popular é um fenômeno utilizado há décadas pela população, sendo transmitido de geração em geração para cura e prevenção de enfermidades. De acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais para suprir o atendimento médico primário (WHO, 2000; GONÇALVES et al., 2005). No Brasil, cerca de 66% das pessoas não tem acesso aos medicamentos comerciais, e quando estes são disponibilizados, o alto custo do tratamento dificulta

a aquisição, fazendo com que haja a procura pelas plantas medicinais (MAZZARI e PIETRO, 2014).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e são apontados como as principais causas dos efeitos terapêuticos destas, tendo como um dos seus principais constituintes os monoterpenos (WALSH et al., 2003; LIMA et al., 2006).

A família Myrtaceae abrange cerca de 100 gêneros com mais de 3.000 espécies no planeta. Um dos gêneros mais conhecidos desta família inclui o *Eucalyptus* sp., uma planta nativa da Austrália, mas introduzidos em diversos países de clima subtropical e temperado quente para a produção de madeira para fabricação de papel. Este gênero abrange mais de 700 espécies distribuídas por diversas partes do mundo. Em cerca de 300 espécies são extraídos óleos essenciais voláteis que são utilizados pela indústria farmacêutica para produção de produtos de higiene pessoal, cosméticos e na indústria alimentícia (VOUNG et al., 2015; BARBOSA, FILOMENO e TEIXEIRA, 2016).

Estudos realizados com essa diversidade de óleos essenciais demonstraram que estes possuem atividade antimicrobiana, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, antioxidante, anti-helmíntica e como aromatizante para alimentos (TYAGI et al., 2014). No Brasil, os principais óleos essenciais são extraídos de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* (VITTI e BRITO, 2003). O óleo de *E. staigeriana* já apresenta relatos na literatura com atividade inseticida, nematicida e antimicrobiana (GILLER et al., 2010; MACEDO et al., 2010; MACIEL et al., 2010).

Com isso, a medicina popular tem se demonstrado uma importante ferramenta para pesquisa de medicamentos a base de plantas e seus produtos secundários. Estima-se que o número de plantas utilizadas para fins terapêuticos em todo mundo é aproximadamente de 10.000 a 53.000 espécies. Contudo, apenas 1% da flora está sendo investigada (SASLIS-LAGOUDAKIS et al., 2012). O óleo de *E. staigeriana* se candidata a uma possível alternativa para o controle de microorganismos e, para seus mecanismos de patogenicidade como a produção de biofilmes e apresentar-se como alguma ferramenta na indústria farmacêutica e/ou alimentar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial de folhas secas de *Eucalyptus staigeriana*.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial frente a cepas padrão e isolados de *Enterococcus* sp. resistentes a diferentes antibióticos.
- 2.2.2 Determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de folhas secas frente.
- 2.2.3 Avaliar a capacidade do óleo essencial de inibição da formação do biofilme e erradicação do biofilme pré-formado;
- 2.2.4 Avaliar os níveis de expressão gênica de genes de virulência e resistência de *Listeria monocytogenes* e de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, após exposição a concentrações sub-inibitórias do óleo essencial.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Resistência microbiana

O aumento da resistência microbiana se tornou uma problemática de saúde pública, afetando humanos e animais. Nos dias atuais, a taxa de mortalidade em decorrência da resistência microbiana é estimada por volta de 700.000 mortes ao ano. Algumas previsões estimam que, se não houver intervenção para controlar esse fenômeno, haverá em 2050 cerca de 10 milhões de mortes causada por micro-organismos resistentes, com um custo global de 100 trilhões de dólares (MCARTHUR e WRIGHT, 2015; SMITH, M'IKANATHA e READ, 2015).

As atividades antropogênicas que estão inseridas no cotidiano podem também levar a seleção de micro-organismos resistentes, como por exemplo, a excreção de antimicrobianos pelas fezes e urina de humanos e animais, que quando não tratadas adequadamente nas estações de tratamento, permitem que os compostos químicos fiquem livre no ambiente; além disso, a ração que é utilizada para alimentar animais contém antimicrobianos (que em algumas vezes não é totalmente utilizada) e permanece como um resíduo fonte de antimicrobianos no ambiente (ALBRICH, MONNET e HARBARTH, 2004; SCHECHNER, et al., 2013). Mesmo quando há concentrações muito baixas de antimicrobianos no ambiente, pode haver uma pressão seletiva de micro-organismos (BERKNER, KONRADI e SCHOENFELD, 2014; LARSSON, 2014).

Outro fator importante neste processo é a prescrição inadequada de medicamentos (SPALLBERG et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 50% das prescrições de antimicrobianos são inadequadas, podendo ser por inexperiência profissional, uso prolongado ou aplicação de antimicrobiano de amplo espectro para infecções simples (FIOL et al., 2010). Em alguns países, estes produtos são vendidos livremente sem qualquer controle em hospitais ou farmácias estando disponíveis para consumo de qualquer pessoa, selecionando o aparecimento de cepas multirresistentes na comunidade. Por isso, o uso racional de antimicrobianos e o controle na venda é uma ferramenta essencial neste processo, já que infecções causadas por bactérias comunitárias resistentes são de mais difícil tratamento e se associam a maior morbidade (OLIVEIRA et al., 2011).

Um dos principais mecanismos que ocasionam a resistência é a transferência horizontal de genes. Esta transferência é frequentemente ocasionada

por plasmídeos, transposons e integrons que agem como vetores carregando uma informação genética que irá conferir alguma propriedade a bactéria receptora deste material genético. São conhecidos três processos de recombinação genética bacteriana que ocasionam essa passagem de material genético: a conjugação, onde há o contato de duas células bacterianas para transferência de plasmídeos, a transformação, onde a célula espontaneamente encontra fragmentos de DNA que contenham uma sequência gênica que irá ser inserida no seu genoma e a transdução, que ocorre devido à entrega de fragmentos de DNA via bacteriófago (FLEMMING e WINGENDER, 2010; HILTUNEN, VIRTÁ e LAINE, 2016).

Além desses processos, têm se demonstrado que o tratamento em infecções com doses sub-inibitórias da concentração inibitória mínima tem levado a um aumento na taxa de mutação, ocasionando uma variabilidade fenotípica e genotípica que irão influenciar nesse processo. Ao contrário disto, quando expostas a altas concentrações do fármaco de escolha para o tratamento, pode ocasionar uma pressão seletiva e também levar ao aparecimento de cepas resistentes (ANDERSSON e HUGHES, 2014).

3.2 Biofilmes

Os biofilmes são definidos como consórcios microbianos aderidos a uma superfície constituídos de comunidades de células eucarióticas e procarióticas embutidos em uma matriz composta por substâncias produzidas pelos próprios grupos microbianos ali presente. Hoje em dia, sabe-se que micro-organismos são encontrados na natureza estabelecidos em superfícies em um biofilme estruturado (COSTERTON et al., 1999).

O processo de formação de biofilme envolve processos físicos, químicos e biológicos simultaneamente que podem ser divididos em cinco etapas como ilustradas na figura 1. Primeiramente, as células de vida livre (células planctônicas) em meio líquido, fixam-se a uma superfície sólida de maneira reversível. Em uma segunda etapa, a adesão dos micro-organismos (células sésseis) a superfície é aumentada por ligações químicas e o polímero sintetizado após resulta na atração de outras células. Na terceira fase desse processo, ocorre a secreção de exopolissacarídeo (EPS) fazendo com que haja o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional. A seguir, à maturação é atingida, onde nesta fase está associada à resistência aos fármacos antimicrobianos. Logo, há o desprendimento destas células

sésseis a este biofilme, ativamente ou passivamente, podendo acontecer por perdas individuais ou por agregados celulares (SENEVIRATNE et al., 2009).

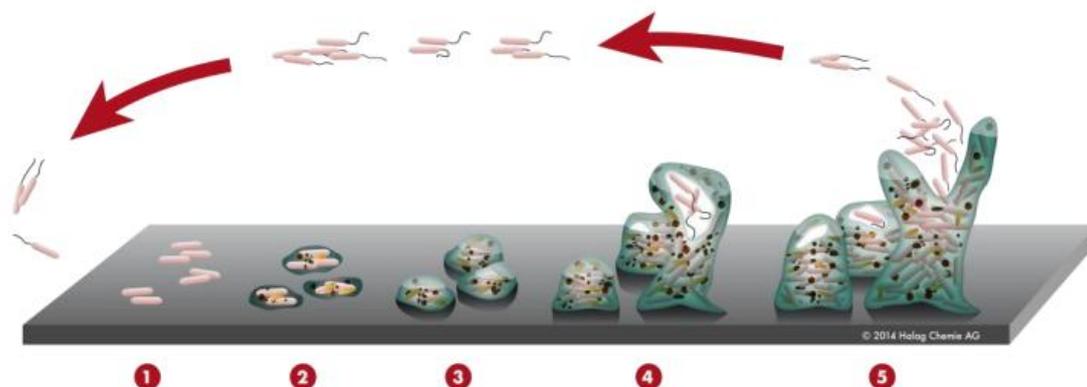


Figura 1. Etapas do processo de formação de biofilme: Fonte: <http://halagchemie.ch/biofilm>.

Os principais fatores que afetam a formação do biofilme são a característica do próprio micro-organismo, em que alguns apresentam maior facilidade de adesão a superfícies sólidas devido à produção de polímeros extracelulares; a composição do fluido, neste aspecto se inclui o pH, a temperatura e a velocidade do fluido. O pH, quando se encontra próximo da neutralidade favorece o crescimento microbiano. A velocidade do fluido é um dos principais fatores na continuidade do biofilme, pois quando o fluido passa em alta velocidade pelo biofilme, células desprendem do mesmo fazendo com que diminua a biomassa originando biofilmes menos espessos, o que favorece a penetração de nutrientes no interior do biofilme (MACHADO, 2005).

Um estudo realizado por Davies et al. (1998), com *Pseudomonas aeruginosa*, indicou que o processo de *quorum sensing* é um fator importante para a formação de biofilme. O mecanismo de *quorum sensing* é um regulador de algumas atividades celulares como produção de metabólitos secundários, servindo como um mecanismo de sinalização intercelular através de regulação de expressão gênica em resposta a mudança da densidade populacional (PENESYAN et al., 2015). O *quorum sensing* funciona através de oligopeptídeos sinalizadores que controlam os processos fisiológicos bacterianos aderidos a matriz celular onde geralmente se divide em três sistemas de sinalização: o sistema LuxI/LuxR é utilizado por bactérias gram-negativas que usam N-acyl homoserinas lactonas como sinalizadores; para bactérias gram-positivas, o sistema é baseado em oligopeptídeos de dois tipos que

utilizam peptídeos como moléculas de sinais e, um sistema LuxS que é utilizado pelas duas classes de micro-organismos (SUDHEER et al., 2015).

A formação de biofilme é uma vantagem para os micro-organismos, pois propicia a proteção das células aos ataques de antimicrobianos e defesa do hospedeiro devido a suas substâncias extracelulares (WHITCHURCH et al., 2002). Com estas propriedades, leva ao agravamento da resistência microbiana devido ao fato dos antimicrobianos não conseguirem passar a matriz de EPS produzida pelos micro-organismos e ter acesso às células aderidas à superfície, tornando as células sésseis cerca de 10 a 100 vezes mais resistente em relação às células planctônicas (MOHAMED e HUANG, 2007; ADUKWU, ALLEN e PHILLIPS, 2012). Além disso, há troca de material genético no interior desta matriz, propiciando a propagação de genes de resistência a outras células (HILTUNEN, VIRTA e LAINE, 2016).

Além do problema clínico com a formação de biofilme, indústrias farmacêuticas e alimentares apresentam perdas em produtos devido a este processo. Na indústria alimentícia, a aderência de micro-organismos a superfícies de equipamentos que são utilizados em processos de geração de alimentos ocasiona uma contaminação constante nos alimentos produzidos no local levando a uma perda total do produto e/ou diminuição do tempo para consumo (FARBER e PETERKIN, 1991; IVANEK et al., 2004; JACOBSON, 2008).

3.3 Bactérias de importância clínica

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva comensal da pele e mucosa em 15 a 36% da população e encontrado em outros locais como nariz, faringe, região vaginal e reto sendo o nariz o principal local colonizado em humanos (WERTHEIM et al., 2005; ACTON et al., 2009; MERTZ et al., 2009; VERHOEVEN et al., 2014). Portadores assintomáticos na cavidade nasal desta bactéria apresentam um risco de 2 a 12 vezes maior de infecção, além disso, portadores apresentam um risco de infecção endógena por *S. aureus* de 60 a 93% em infecções como em local cirúrgico, bacteremia, infecções cutâneas e pacientes em processo de diálise (BERTHELOT et al., 2010; SIMOR, 2011; HUANG, LIEN e LIN, 2015). Dentro dessa espécie apareceram cepas resistentes aos antimicrobianos onde ganha destaque o *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) que apresenta resistência a β -lactâmicos

incluindo penicilinas e cefalosporinas devido a presença de genes do grupo *mec* (*mecA*, *mecB* e *mecC*) (KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2000).

Bactérias dessa espécie apresentam-se como um dos micro-organismos mais prevalentes em infecções relacionadas à assistência em saúde e pode levar a uma série de patologia como: foliculite, pneumonia, endocardite abscessos e furúnculos. Nos últimos anos, esta espécie tem recebido importância por sua prevalência em intoxicações alimentares levando a um alto risco de contaminação, tanto para usuários como para manipuladores dos produtos na indústria alimentícia (RAYGADA e LEVINE, 2009; XU et al., 2011; XU et al., 2012).

3.3.2 *Enterococcus* spp.

Enterococcus é uma bactéria gram-positiva, comensal do trato gastrointestinal humano que pode vir a ser um patógeno oportunista em determinadas situações (BYAPPANAHALLI et al., 2012; PREMATUNGE et al., 2016) Está em segundo lugar em prevalência em infecções do trato urinário e em terceiro lugar em bacteremias associadas a cuidados da saúde nos Estados Unidos (EUA) (CETINKAYA, FALK e MAYHALL, 2000; BALLI, VENETIS e MIYAKIS, 2014). Este gênero está ganhando atenção devido ao aparecimento de cepas resistentes a quase todos antimicrobianos utilizados, até mesmo vancomicina, que é o agente que apresentam maior resposta ao tratamento destas infecções. *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) foi relatado primeiramente em 1986 no Reino Unido e na França e logo emergiu pelo mundo todo se tornando um problema de saúde pública (CORSO et al., 2007). Infecções por estes microrganismos estão associadas com aumento da mortalidade, hospitalização prolongada e elevados custos para instituições de cuidados médicos (COSGROVE, 2006).

O gênero *Enterococcus* apresenta cerca de 50 espécies já descritas, no entanto, em cerca de 90% das infecções são causadas por *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. O *E. faecalis* tem seu habitat no trato gastrintestinal de humanos em animais podendo se apresentar em solos e na água. Devido sua capacidade em formação de biofilme e adesão a dispositivos associados aos cuidados de saúde, este micro-organismo se apresenta como o mais frequente isolado em infecções hospitalares como endocardite, bacteremia, infecções do trato urinário e meningite. Além da formação de biofilme, essa espécie consegue sobreviver a altas diferenças de pH, além de outros fatores de virulência como

produção de hemolisinas e bacteriocinas e substâncias de agregação podem sobreviver por longos períodos em superfícies no ambiente (SANTESTEVEAN et al., 2015; MILLER et al., 2016).

Enterococcus faecium também é comensal da microbiota intestinal de humanos, por sua vez, tem emergido como um micro-organismo multirresistente em hospitais por todo o mundo sendo responsáveis por várias infecções frequentemente associadas a cateter. Nos últimos 30 anos, cerca de 90% das infecções eram causadas por *E. faecalis*, entretanto, devido a alta resistência de *E. faecium* a vancomicina e ampicilina, este micro-organismo se apresenta agora como principal causador de infecções nosocomiais (KRISTICH et al., 2014; MILLER et al., 2016).

3.4 Bactérias de importância alimentar

3.4.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bastonete gram-positivo, não formador de esporo que pode ser encontrado em diversos tipos de amostras como água e solo, em humanos e animais e, em alimentos. Este micro-organismo tem capacidade de se desenvolver a diferentes condições ambientais como baixas temperaturas (4 – 10°C), elevado pH e concentrações de sal (ROCOURT e COSSART, 1997; IVANEK, GRÖHN e WIEDMANN, 2006). Embora seja rara a doença causada por essa espécie, é um importante problema de saúde pública que, de acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, 1.300 casos de listeriose ocorrem no continente e, para o CDC, 1.600 casos ocorrem por ano nos EUA com uma forte tendência de aumento (SCALLAN et al., 2011; CDC, 2014; DE NOORDHOUT et al., 2014; ECDC, 2014; EFSA, 2015). No mundo todo, casos incidem entre 0,1 a 11,3 casos por milhão de habitantes por ano (WHO, 2004).

Os indivíduos mais susceptíveis por esta doença são idosos, grávidas, recém-nascidos e pessoas imunodebilitadas, e dentre as principais patologias causadas são septicemia, aborto, encefalite, meningite e natimorto com uma alta taxa de mortalidade superior a 30 % (PAINTER et al., 2007; JACKSON et al., 2010; SILK et al., 2012). Cepas de *Listeria* spp são caracterizadas por uma diversidade genética, no entanto, são três os principais sorotipos envolvidos no processo de infecção em humanos e animais que são 1/2a, 1/2b e 4b (GIANFRANCESCHI et al., 2009; LOPEZ-VALLADARES et al., 2014).

Contaminações por *L. monocytogenes* nos alimentos leva ao recolhimento de produtos alimentares e altos custos para indústria e produtores, onde, em apenas uma leva de alimentos contaminados gerou um custo de 0,16 a 0,3 milhões de dólares (IVANEK et al., 2004)A comunidade Europeia liberou uma resolução nº 2073/2005 que estabelece um limite de 100 UFC/g de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo onde o fabricante deve comprovar que este limite não irá ser excedido (Anais e Besse, 2016).

A principal fonte de contaminação por *L. monocytogenes* é via alimentos refrigerados, devido a capacidade da bactéria se multiplicar em temperaturas baixas e condições desfavoráveis de pH, que são utilizadas para armazenamento de certos mantimentos, outra forma é contaminação cruzada por colonização deste microrganismos em ambientes de processamento de alimentos, principalmente no estado de formação de biofilmes sobre as superfícies (FARBER e PETERKIN, 1991; JACOBSON, 2008; COLAGIORGI et al., 2016). Esta capacidade de formar biofilmes é influenciada pela temperatura, cepa, nutrientes disponíveis e superfície aderida, onde já foi demonstrado que biofilmes provenientes de superfícies de áreas de processamento de alimentos são mais espessos que biofilmes encontrados isoladamente na natureza (COLAGIORGI et al., 2016).

3.4.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um bastonete gram-positivo, formador de esporos que normalmente apresenta seu habitat natural no solo. No entanto, seus esporos podem ser encontrados em plantas, insetos e alimentos (EHLING-SCHULZ et al., 2015; RUAN et al., 2015). Estes esporos se apresentam com diversas camadas que lhe conferem capacidade de sobrevivência em ambientes extremos como aquecimento, refrigeração, radiação e mudanças de pH (KOTIRANTA, LOUNATMAA e HAAPASAL, 2000; BOTTONE, 2010). Em alimentos contaminados por este microrganismo, cepas produtoras de enterotoxinas como hemolisina B, citotoxina K e enterotoxina não-hemolítica podem vir a causar diarreia e dor abdominal, ocorrendo 8-16 horas após a ingestão do alimento contaminado. Algumas cepas de *B. cereus* podem secretar uma toxina cereulida emética, levando a um quadro de vômito no paciente. Esta toxina é altamente estável ao calor e substâncias ácidas permanecendo no alimento mesmo após o cozimento e sobrevivendo a digestão por

ácidos estomacais do indivíduo (EHLING-SCHULZ, FRICKER e SCHERER, 2004; SCHOENI e WONG, 2005).

3.5 Genes envolvidos no estresse e virulência em *Listeria monocytogenes*

Como este micro-organismo possui a capacidade em sobreviver em diferentes temperaturas, condições adversas de pH, ele necessita de um aparato de enzimas e proteínas para sua sobrevivência. Para iniciar um processo de infecção em humanos, este micro-organismo tem um coordenado sistema de genes que são expressos e propiciam a internalização da bactéria na célula hospedeira. Entretanto, se houver uma superprodução ou uma regulação inadequada dos genes envolvidos na colonização e infecção por essa bactéria, pode resultar em uma desvantagem para o micro-organismo (COLAGIORGI et al., 2016).

Diversos sinais são importantes e influenciam na expressão gênica como temperatura, fase de crescimento e nutrientes do meio. Há diversos açúcares que interferem na expressão de determinados genes levando a uma baixa resposta de infecção (BEHARI e YOUNGMAN, 1998). Para conseguir sobreviver em condições adversas de sais e manter o equilíbrio osmótico, *L. monocytogenes* possui o gene *ctc* que confere essa capacidade a bactéria (GARDAN et al., 2003). Além disso, para o micro-organismo necessita de uma gama de moléculas necessárias para seu metabolismo como ferro, enxofre, zinco, entre outros. No momento do início de desenvolvimento intracelular, *L. monocytogenes* secreta citolisina dependente de colesterol, chamada de listeriolisina O que é codificada pelo gene *hly*, que provoca a destruição do fagossomo fazendo com que a bactéria se desenvolva no interior da célula hospedeira (PORTNOY et al., 1992).

Um dos principais reguladores da virulência em *L. monocytogenes* é o gene *prfA*, um fator transcricional membro da família Crp/Fnr que é compartilhada em diversos genomas bacterianos. PrfA tem capacidade de se ligar a sequência de DNA mesmo com ausência de cofator, ao contrário dos outros fatores desta família que requerem um cofator para ligação a fita de DNA e regula genes de virulência como *plcA*, *plcB*, *hly*, *mpl* e *actA* (SCORTTI et al., 2007). Entretanto, quando ocorre a internalização do microrganismo na célula hospedeira, a atividade de *prfA* é aumentada, o que sugere que um fator derivado do hospedeiro aumente a capacidade de ligação desse fator (HAAL et al., 2016).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais de oxigênio que são produtos de reações metabólicas e incluem radicais como superóxido e peróxido de hidrogênio. Quando há um desequilíbrio entre a produção de ROS e a liberação de antioxidantes pela célula bacteriana, podem ocorrer danos a lipídios, proteínas e o DNA. Os antioxidantes são responsáveis por prevenir esse dano causado por ROS às células e são produzidos por sistemas de defesa desenvolvidos pela célula. Um desses sistemas é a expressão de genes que irão codificar enzimas que eliminam essas moléculas reativas de oxigênio, tais como, a superóxido dismutase (SOD) e catalase. A SOD é uma das principais enzimas antioxidantes do organismo que catalisa a conversão de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta enzima se encontra nas bactérias no citoplasma, espaço periplasmático associada ou não a íons metálicos como manganês e zinco que estão envolvidos no processo de virulência e crescimento bacteriano (SUO et al., 2014). Em um estudo prévio realizado por Archambaud et al., (2006) e Suo et al., (2012), o gene que expressa a enzima SOD foi deletado e observou-se que a sobrevivência de *L. monocytogenes* foi significativamente reduzida em contato com antioxidantes, células de defesa do hospedeiro como macrófagos e a formação de biofilme e o crescimento também foram diminuídos.

Uma característica importante é a motilidade desta cepa que foi demonstrada que auxilia na invasão do hospedeiro e aumento da virulência em experimentos realizados com camundongos. O gene responsável pela transcrição da proteína estrutural da flagelina, o *flaA*, é um dos principais genes envolvidos na formação de biofilme em *L. monocytogenes* e acredita-se que esta proteína funcione como um tipo de adesina no início da ligação a superfícies (LEMON, HIGGINS, e KOLTER, 2007; IVY et al., 2010).

Outro importante gene envolvido na motilidade e virulência desse patógeno é o *degU*, que também já possui relatos com associação a formação de biofilme (KNUDSEN, OLSEN & DONS, 2004). Um cluster envolvendo quatro genes que são *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* é altamente relacionado a formação de biofilme. Este *operon* apresenta um alto grau de conservação entre bactérias gram-positivas, tal como *S. aureus*, sendo sua expressão dependente do estágio da formação de biofilme, onde apresenta uma taxa de expressão maior no período do biofilme já estabelecido em relação da etapa inicial de adesão a superfície (RIEU et al., 2007).

3.6 Genes envolvidos como fatores de virulência em *Enterococcus*

Enterococcus tem seu habitat natural o trato gastrointestinal de mamíferos, podendo também ser recuperada em ambientes agrícolas e ecossistemas aquáticos. A conjugação bacteriana tem sido fundamental no processo de resistência aos antimicrobianos principalmente intermediados pela troca de plasmídeos, onde em *E. faecalis* é muito mais comum esse mecanismo do que em *E. faecium*. Estes plasmídeos, além de carregarem genes de resistência, também podem possuir características que conferem virulência, como produção de bacteriocinas e promover a doação de genomas híbridos que podem levar a uma resistência vancomicina e tetraciclina, por exemplo (CONWELL et al., 2017).

Além disto, reguladores de expressão gênica são necessários para uma melhor adaptação ao ambiente. A família de reguladores transcricionais do tipo LysR, é um grupo bem caracterizado de reguladores transcricionais. Eles são considerados como reguladores globais da transcrição, atuando como ativadores ou repressores de genes únicos ou de operons. Eles desenvolveram um papel regulador sobre genes com funções igualmente diversas, cujos produtos podem estar envolvidos no metabolismo, divisão celular, *quorum sensing*, virulência, motilidade, fixação de nitrogênio, respostas ao estresse oxidativo, produção de toxina, ligação e secreção (MADDOCKS e OYSTON, 2008). A família Fur de reguladores transcricionais controla a virulência, defesa contra espécies reativas de oxigênio e transporte de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} . O Fur permite a aquisição eficiente de ferro e aumenta a aptidão do patógeno (TROXELL e HASSAN, 2013).

Espécies de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) são distribuídas por hospitais do mundo todo acometendo pacientes internados na unidade de terapia intensiva e pacientes com patologias hemato-oncológicas. Nove são os genes responsáveis pela resistência à vancomicina, onde oito deles são de maneira adquirida que são *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* e *vanN*, e um genótipo, o *vanC* é encontrado em espécies de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* como uma resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina. O principal genótipo no mundo dentro os citados é o *vanA* onde apresenta resistência principalmente em espécies de *E. faecium* e *S. aureus*, seguido pelo *vanB* que apresenta resistência variável a vancomicina com CIM's entre 4 a 1.024 mg/L e suscetibilidade a teicoplanina (NASAJ et al., 2016).

Espécies de *Enterococcus* têm sido reportadas como formadoras de biofilmes, ocasionando infecções em diferentes locais e superfícies como cateteres intravasculares, infecções periodontais, e *stents* uretrais (JAMAL e DAVID, 2007). Recentemente, foi reportada como um dos mais prevalentes patógenos em infecções associadas aos cuidados de saúde com uma taxa de mortalidade superior a 61% e, na última década, tem sido reportado como segundo patógeno mais isolado em infecções do trato urinário (AGNIESZKA et al., 2014). Em infecções do trato urinário, uma associação epidemiológica tem sido atribuída à substância de agregação codificada pelo gene *asa*. A proteína codificada pelo gene aumenta a aderência das espécies de enterococos e protege as mesmas dos ataques de polimorfonucleares. Essa proteína é um importante fator no primeiro passo de aderência na formação do biofilme (AGNIESZKA et al., 2014).

Além da substância de agregação, outro grupo de genes que tem um papel importante na formação de biofilme em espécies de *Enterococcus*, mais relevante e estudada em *E. faecalis*, é o cluster de genes da proteína do biofilme em superfície plástica (*bop -biofilm on plastic surface*) que se subdivide em quatro, *bopA*, *bopB*, *bopC* e *bopD*. Este grupo de genes apresenta a capacidade de regular o sistema Fsr, responsável pelo mecanismo do *quorum sensing* nestas espécies (CRETI et al., 2006). Em *E. faecalis*, foi demonstrado que o sistema Fsr regula a produção de biofilme através da produção de gelatinases. Outro gene, o gene *ace*, expressa uma adesina ao colágeno em *E. faecalis* após crescimento em soro ou na presença de colágeno sendo um importante fator para virulência deste micro-organismo (SINGH et al., 2010).

3.7 Plantas medicinais e óleos essenciais

A busca por novas moléculas para tratamento de enfermidades que afetam a humanidade tem despertado interesse em pesquisadores pelo mundo inteiro. A maioria dos fármacos já estabelecidos é oriunda de plantas medicinais, e de acordo com a OMS 25% das drogas são provindas de plantas. Estima-se que no Brasil são gastos de 400 a 500 milhões de dólares por ano e os gastos mundiais giram em torno de 27 bilhões de dólares com plantas medicinais. Estes valores justificam o aumento de 6-7% por ano de fitoterápicos no ramo dos medicamentos (BANDEIRA et al., 2011).

No entanto, a característica principal dessas plantas medicinais e seus metabólitos secundários do ponto de vista clínico, é que elas não proporcionam uma resposta imediata a determinadas patologias, inviabilizando assim, a capacidade de utilizar esses fitoterápicos em situações de emergência (CALIXTO, 2000). A carência de informações sobre propriedades desses compostos e a utilização empírica, oferecem diversos malefícios à saúde (VEIGA JÚNIOR, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela regularização dos fitoterápicos no país, realizando o controle dos mesmos para assegurar a eficácia e segurança, sendo necessários ensaios pré-clínicos e clínicos para que o fitoterápico seja comercializado (ANVISA, 2010).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas e podem ser extraídos de diversas partes das plantas como flores, folhas, sementes, casca e madeira. Até o momento foram descritos cerca de 3.000 óleos onde cerca de 300 destes estão em uso comercial. Estes produtos tem por característica serem hidrofóbicos, solúveis em álcool e normalmente se apresentam incolores ou amarelo pálido. As plantas secretam essas substâncias muitas vezes para lhe conferir proteção frente a patógenos como fungos e insetos e impedir a ingestão por herbívoros (BARBOSA, FILOMENO e TEIXEIRA, 2016).

Várias pesquisas são realizadas com plantas a fim de identificar seus efeitos farmacológicos e atividades biológicas. No entanto, apesar dos resultados apresentarem promissores, ainda falta estudos para elucidar todas as propriedades dos óleos produzidos por plantas (MACIEL, PINTO e VEIGA JUNIOR, 2002; MARTINS, CORTEZ e FELIPE et al., 2008).

3.8 Família *Myrtaceae*

A família *Myrtaceae* abrange cerca de 100 gêneros com mais de 3.000 espécies no planeta. O gênero *Eucalyptus* sp., uma planta nativa da Austrália, que pertence a esta família compreendendo mais de 800 espécies que se encontram por diversas partes do mundo. Em cerca de 300 espécies, foram extraídos óleos essenciais voláteis que são utilizados pela indústria farmacêutica para produção de produtos de higiene pessoal, cosméticos e na indústria alimentícia. Esta planta pode apresentar-se como árvore ou arbusto com uma duração que pode chegar de 400 a 500 anos de idade. No Brasil, os principais óleos essenciais são extraídos de *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* (VITTI & BRITO, 2003).

Diferentes partes da planta são utilizadas para extração de óleos essenciais como as folhas, tanto secas como verdes, troncos e casca que irão servir de matéria prima para indústria farmacêutica e cosmética. Neste subproduto da planta do *Eucalyptus* se apresentam compostos voláteis e não-voláteis como flavonoides, triterpenóides e taninos que apresentam atividades relatadas na literatura por atuar frente a resfriados, dor, inflamação e atividade anticâncer (VOUNG et al., 2015).

As folhas de *Eucalyptus* são utilizadas por povos ocidentais para gripes e resfriados, tanto com a ingestão da folha como pela inalação da fumaça gerada após o aquecimento em água fervente. Este mesmo vapor já foi relatado que possui capacidade de aliviar dores no peito e auxiliar em infecções respiratórias por inalação e para dores musculares por contato do vapor com parte afetada. A resina produzida por esta planta também possui atividade farmacológica onde alivia a dor ocular. Uma descoberta recente e ainda sendo explorada por pesquisadores é a atividade anticâncer destes óleos. Estes produtos extraídos apresentaram, em estudos preliminares, atividade citotóxica e antiproliferativa frente a células cancerígenas de vários tipos de tecidos como mama, pulmão e fígado (VOUNG et al., 2015).

O constituinte majoritário dos óleos essenciais extraídos do gênero *Eucalyptus* é o éter 1,8 cineol, mais conhecido como eucaliptol. Este composto volátil é o que determina o cheiro de cânfora a planta e apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e anticâncer. Outros constituintes que se apresentam em maior quantidade e possuem atividade farmacológica relatada são o α -pineno, limoneno e terpinen-4-ol (BARBOSA, FILOMENO e TEIXEIRA, 2016). No entanto, fatores ambientais como temperatura, habitat da planta, disponibilidade de nutrientes e água podem afetar os constituintes finais do óleo extraído, além da técnica de extração utilizada. No caso do óleo de *Eucalyptus*, o método preferencialmente utilizado é a hidrodestilação (VOUNG et al., 2015).

3.8.1 Espécie *Eucalyptus staigeriana*

O gênero *Eucalyptus* compreende em diversas espécies de importância por extração de óleos essenciais como *E. globulus*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. staigeriana*. A espécie de *E. staigeriana* é a mais utilizada no Brasil para extração do óleo essencial e grande parte de seu produto extraído é destinado à indústria de

perfumaria. Além dessa aplicação, o óleo apresenta relatos como atividade nematicida, acaricida, inseticida e antimicrobiana (CHAGAS et al., 2002; GILLES et al., 2010; BARBOSA, FILOMENO e TEIXEIRA, 2016).

De acordo com Gilles et al., (2010), o principal constituinte do óleo de *E. staigeriana* é o 1,8-cineol (34%) seguido por neral (10,8), geraniol (10,8) e α -felandreno (8,8%). No mesmo estudo, Gilles et al., (2010) demonstraram que o óleo de *E. staigeriana* apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas como *E. faecalis* e *S. aureus*, gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra a levedura *Candida albicans*. Esta atividade antimicrobiana é atribuída aos compostos fenólicos e terpenóides de sua constituição como o geraniol e 1,8-cineol (eucaliptol) que apresentam caráter lipofílico, acumulando-se na membrana dos microrganismos levando a uma maior permeabilidade e saída de conteúdo intracelular.

4. METODOLOGIA

4.1 Isolados bacterianos

As cepas bacterianas utilizadas no presente estudo estão apresentadas na tabela 1 e foram provenientes da bacterioteca do laboratório 220-E do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) / UFRGS e incluíam isolados clínicos, alimentares e ATCC.

Tabela 1. Cepas pertencentes à bacterioteca do laboratório 220-E da UFRGS utilizadas no estudo.

Isolado	Origem
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Cepa padrão
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Cepa padrão
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	Cepa padrão
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 4163	Cepa padrão
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	Cepa padrão
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Cepa padrão
<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC 9809	Cepa padrão
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	Cepa padrão
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Cepa padrão
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Cepa padrão
<i>Bacillus pumilus</i> IA	Ambiental/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 1953	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> G9	Alimentar/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 603	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 1854	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> E18	Alimentar/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> E2	Alimentar/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 1220	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 1240	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> C2	Alimentar/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 606	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 612	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> C13	Alimentar/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 2389	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 1950	Clinica/ICBS
<i>Enterococcus faecalis</i> 151	Clinica/ICBS

Todos os isolados clínicos e alimentares de enterococos foram previamente avaliados quanto a características fenotípicas de resistência e genotípica de fatores de virulência e resistência.

As colônias foram preservadas em solução de 10 % (p/v) de leite desnatado Molico® (Nestlé) acrescido de 10 % (v/v) de glicerol (Nuclear), congeladas a -20 °C. Antes da realização dos ensaios, os isolados foram submetidos a crescimento em ágar Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI, Himedia®, India) a 37°C por 24 horas.

4.2 Extração e caracterização do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*

O óleo essencial foi extraído através de destilação a vapor das folhas secas da planta por uma hora de acordo com Cassel *et al.* (2009) com modificações. Para caracterização dos compostos foi utilizado cromatografia gasosa HP 6890 acoplada a um detector seletivo de massa Hewlett Packard MSD5973 (GC-MS) equipado com um *Software* HP *Chemstation* e espectro Wiley 275.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30 mx 0,25 mm id, 0,25 µm de espessura de filme, Hewlett Packard, Palo Alto, EUA) com as seguintes condições: temperatura da coluna, 40 °C (8 minutos) a 180 °C a 3 °C / minutos, 180-230 °C a 20 °C / minutos, 230 °C (20 minutos); Interface 280 °C; Razão de divisão 1: 100; Gás transportador He (56 KPa); Velocidade de fluxo: 1,0 mL / minutos; Energia de ionização 70 eV; Gama de massa 40-350. O volume injetado foi de 0,4 µL (diluído em hexano 1:10). A cromatografia gasosa analítica foi realizada num cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 com um detector de ionização de chama (FID) equipado com um software HP Chemstation. Utilizou-se uma coluna capilar de fase ligada HP-Innowax (30 m x 0,32 mm id, espessura de filme de 0,50 µm, Hewlett Packard, Palo Alto, EUA) com as seguintes condições: temperatura da coluna, 40 °C (8 minutos) a 180 °C a 3 °C / minutos, 180-230 °C a 20 °C / minutos, 230 °C (20 minutos); Temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector 250 °C; Razão de divisão 1:50; Gás transportador H₂ (34 KPa). O volume de injeção foi de 1 µL (diluído em hexano 1:10).

A identificação dos componentes individuais baseou-se na comparação dos seus tempos de retenção de GC (R.T.) em colunas polares e comparação com espectros de massa de componentes por GC-MS. Os componentes foram

identificados por uma combinação de espectro de massa da biblioteca de Wiley e por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2005).

4.3 Avaliação da atividade do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*

4.3.1 Ensaio de disco difusão

O método de disco difusão foi realizado de acordo com CLSI (2015). Somente as cepas padrões listadas na tabela 1 e um isolado ambiental de *B. pumilus* foram utilizadas primeiramente para verificar se o óleo possuía atividade antimicrobiana frente a espécies sensíveis. Um inóculo foi preparado a partir das colônias até atingir a escala padrão de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Este inóculo foi semeado na superfície do meio Ágar Mueller Hinton com auxílio de um suabe e em seguida discos de papéis filtros estéreis impregnados com 10 µl do óleo essencial puro de folhas secas de *E. staigeriana* foram colocados na superfície do meio e as placas incubadas por 24 horas a 37° C. A leitura foi realizada a partir da medição dos halos de inibição formados ao redor do disco empregando os padrões descritos por Ponce et al., (2003) e Moreira et al., (2007) onde os critérios de sensibilidade foram: não sensível para halos menores que 8 mm (-), sensível para halos entre 9-14 mm (+), muito sensível para diâmetros entre 15-19 mm (++) e extremamente sensível para halos de inibição superior a 20 mm (+++). Para o ensaio foram utilizadas todas cepas ATCC's e um isolado ambiental de *Bacillus pumilus*. Como controles foram empregados discos de antimicrobianos específicos para cada uma das cepas avaliadas. Cada teste realizou-se em triplicata.

4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial

Esta técnica foi baseada no protocolo CLSI (2015) com algumas modificações. Inóculos das bactérias que apresentaram sensibilidade ao óleo foram preparados a partir de uma cultura de 24 horas do micro-organismo até atingir a escala 0,5 de McFarland. Em uma placa de 96 poços, 100 µL do meio caldo Muller Hinton foi adicionado em cada cavidade da placa. A seguir, 100 µL do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* foi inoculado no primeiro poço e logo realizadas diluições seriadas de 50% até a concentração de 0,09%. Logo, 10 µL do inóculo padronizado foi inserido nos poços. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e a leitura realizada macroscopicamente com a presença ou não de crescimento bacteriano na microcavidade. A menor concentração do óleo capaz de inibir

completamente o crescimento microbiano foi considerado a concentração inibitória mínima. Controles de esterilidade do meio e de viabilidade do microrganismo foram utilizados no experimento.

4.4 Determinação da capacidade do óleo essencial de inibir a formação de biofilme e remover o biofilme pré-formado

Para avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilme e de remoção do biofilme pré-formado pelo óleo essencial, foi realizado o protocolo descrito por Jadhav et al., (2013).

4.4.1 Ensaio de inibição da formação do biofilme

Em uma microplaca de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3599, Corning, NY, USA), contendo 96 poços (12x8), foi adicionado em cada poço 180 µL de caldo triptona de soja (TSB), 20 µL da suspensão bacteriana de turbidez de 0,5 de McFarland ou $1,5 \times 10^8$ UFC / mL e as concentrações do óleo essencial utilizadas no experimento foram a CIM, CIM/2 e CIMX2. A placa foi incubada em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37 °C. Passado o período de incubação, o conteúdo líquido da placa foi descartado e três lavagens com 200 µL solução salina estéril foram realizadas de modo a remover as células bacterianas não aderidas à superfície polimérica (células planctônicas). As células bacterianas aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol, durante 20 minutos. Então, o metanol foi removido por pipetagem a microplaca foi invertida e submetida à secagem por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos, para corar as células bacterianas aderidas à microplaca. Após, removeu-se o cristal violeta e procedeu-se lavagem das microplacas em água corrente e, depois de secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi eluído com 200 µL de etanol 95%, durante 30 minutos. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 590 nm, em aparelho leitor de microplaca (Behring EL 311-HOECHST, Akasaka, Japan). Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura, um controle para validar o teste realizado com a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 e como controle de esterilidade somente o meio de cultura (branco), sem inóculo. Os testes foram realizados em quadruplicata.

O valor da densidade óptica (OD) utilizado foi o valor médio obtido nas quatro leituras para cada isolado, subtraído do valor medido para o controle branco

(controle de esterilidade); desta forma foi possível excluir os valores mais discrepantes e controlar a variabilidade. Considerou-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura da OD para cada isolado, foi maior ao valor do ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula: $[B + 3(s)]$, onde B é a média da leitura do branco e s é o desvio padrão das leituras do branco.

Os isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme quando $4DOc \leq DO$, moderado quando $2DOc \leq DO \leq 4DOc$, fraco quando $DOc \leq DO \leq 2DOc$ e não produtor de biofilme quando o valor obtido foi igual ou menor ao valor de DOc.

A porcentagem de inibição de formação do biofilme para cada concentração seguiu a seguinte fórmula, de acordo com Jadhav et al. (2013) onde seguiu-se:

$$\% \text{ de inibição do biofilme} = 100 - \left(\frac{\text{OD da amostra tratada}}{\text{OD do controle positivo não tratado}} \right) \times 100$$

4.4.2 Ensaio da avaliação da inibição do biofilme pré-formado

Em uma placa de 96 poços 180 μ l de caldo TSB, 20 μ l do inóculo bacteriano foram misturados e incubados por 6 horas a 37 °C. Após esse período a CIM, CIM/2 e CIMX2 do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* foi adicionado ao biofilme pré-formado e a placa incubada novamente por 18 horas a 37 °C. As etapas de lavagem, leitura do biofilme e classificação foram as mesmas descritas no item 4.4.1.

Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura, um controle para validar o teste realizado com a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 e como controle de esterilidade somente o meio de cultura, sem inóculo. Os testes foram realizados em quadruplicata.

4.5 Análise da expressão de genes de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Enterococcus* VRE frente a dose sub-inibitória do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*

O ensaio de expressão gênica seguiu o protocolo descrito por Moura et al. (2015).

4.5.1 Crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 na presença de ¼ da CIM óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* para a análise da expressão de genes de virulência e resistência

A cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi repicada em meio Ágar Nutriente e incubada a 37 °C por 24 horas; passado este período, 4 a 5 colônias do crescimento bacteriano foram inoculadas em 30 mL de caldo TSB e incubadas a 37 °C sem agitação. O crescimento bacteriano foi mensurado em espectrofotômetro a 600 nm até atingir uma OD de 0,3-0,4 onde os níveis de expressão de genes estão mais elevados. Atingido esta OD, ¼ da CIM do óleo foi adicionada ao meio e incubado por 1 hora. Passado este período duas alíquotas do crescimento foram coletadas para posterior extração de RNA total. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica.

4.5.2 Crescimento da *Enterococcus* VRE na presença de ¼ da CIM óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* para a análise da expressão de genes de virulência e resistência

Neste ensaio o isolado clínico VRE (2389), foi repicada em meio Ágar Nutriente e incubada a 37 °C por 24 horas; passado este período, 4 a 5 colônias do crescimento bacteriano foram inoculadas em 30 mL de caldo TSB contendo ¼ da CIM do óleo e incubadas a 37 °C. O crescimento bacteriano foi mensurado em espectrofotômetro a 600 nm até atingir uma OD de 0,3-0,4. Passado este período, duas alíquotas do crescimento foram coletadas para posterior extração de RNA total. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica.

4.6 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada com Trizol ® seguindo as orientações do fabricante. O RNA total foi quantificado e analisado quanto a sua qualidade e armazenado a -80 °C para posterior síntese do DNA complementar (cDNA).

4.7 RT-PCR

A transcrição reversa do RNA mensageiro para cDNA foi realizada de acordo com protocolo da Applied Biosystems utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*. Todas as enzimas e reagentes necessários para realização do cDNA eram oriundas do Kit. Feito este processo, as amostras foram

armazenadas a -20 °C para posterior realização do ensaio quantitativo da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

4.8 Ensaio quantitativo da expressão gênica por qPCR

A expressão dos genes foi quantificada através de qPCR com genes relacionados ao estresse bacteriano. Os genes e os oligonucleotídeo selecionados para análise *L. monocytogenes* e o isolado VRE estão listados na tabela 2 e 3, respectivamente. Os normalizadores utilizados para *L. monocytogenes* ATCC 7644 foram o gene *gap* e *rpoB* e para *Enterococcus faecalis* VRE os genes *23s* e *gap*.

Tabela 2. Genes e *primers* utilizados para realização do ensaio de expressão gênica em *L. monocytogenes* ATCC 7644 após o tratamento com ¼ da CIM óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')
<i>ctc</i>	TTTAACAACGAACGACCTTCC AGCTTCTGGTTCAGGTGCTT
<i>prfA</i>	GGAAGCTTGGCTCTATTTGC ACAGCTGAGCTATGTGCGAT
<i>degU</i>	GGCGCGTATATTCATCCAC TACCTCGCACTCTCTATGCG
<i>agrA</i>	CGGGTACTTGCCTGTATGAA TGAATAGTTGGCGCTGTCTC
<i>flaA</i>	GTAAGCATCCAAGCGTCTGA AAGAATCAGCATCAGCAACG
<i>sufU</i>	TTCAGAAATGGTGCAAGGTC ATCGCTCTCTCCATTGCTTT
<i>sufS</i>	GAATTTGGCGGAGAAATGAT TCTGCCAAGTAATCAATCGC
<i>sod</i>	CCACCATTTGGGCTAAGAAT GCGTTCCTGAAGATATTCGC
<i>gap</i>	CGCTTACACTGGTGACCAAA CGATAGCTTTAGCAGCACCA
<i>rpoB</i>	CGTCGTCTTCGTTCTGTTGG GTTACGAACCACACGTTCC

Tabela 3. Genes e *primers* utilizados para realização do ensaio de expressão gênica em *Enterococcus* VRE após o tratamento com ¼ da CIM óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')
<i>vanA</i>	TAATTGAGCAGGCTGTTC TACTGCAGCCTGATTTGGT
<i>bopA</i>	CTGCTGAATTAGGCATGG CAATCGCTAGCCAACTACC
<i>bopC</i>	TAAACCGACACCATTTCTG GTAGGTGTGGTTCGTAGG
<i>bopD</i>	CAACTTGCGCAAATCTATG ATCGCCATTCGACCTAATT
<i>ace</i>	AAAGCAGCCAACCAGAAG TCTGGTGTGCCGTTCTCTT
<i>fur</i>	CCAAACACTTTCACCACCA TTTGCTCTACTTCACCAAG
<i>lyrs</i>	TCTCGACAAGCACAAGTTC ACCTAGCCAGCTTCTACC
23S	TGGAAGGTTAAGAGGATGGG GGAACTTACCCGACAAGGAA
<i>gap</i>	CGCTTACACTGGTGACCAAA CGATAGCTTTAGCAGCACCA

As condições de qPCR se deram por uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72 °C por 15 segundos; por último, uma extensão final de 10 minutos a 72 °C e logo a confecção de uma curva de *Melting* para análise dos fragmentos. Após esta etapa, os cálculos e análise da expressão de genes utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). As análises foram realizadas em quadruplicata.

4.9 Análise estatística

Os resultados da influência do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* sobre a inibição da formação do biofilme dos isolados e ATCC's microbianos e a expressão gênica de *L. monocytogenes* e *Enterococcus* VRE foram submetidos ao Teste T. A análise estatística dos resultados de expressão gênica foi realizada utilizando o programa *SPSS statistics* onde o valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo. Para análise e confecção dos gráficos da inibição da

formação do biofilme e remoção do biofilme pré-formado, o programa GraphPad Prism 7 foi utilizado.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do óleo essencial de *E. staigeriana*

O resultado da caracterização do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* está representado na Tabela 4. Na análise realizada, foi evidenciada a presença de 21 compostos, onde a maioria são monoterpenos oxigenados (69,58%) e monoterpenos hidrocarbonados (28,84 %), sendo que os constituintes majoritários foram o geranial (28,67 %), neral (19,68 %) e limoneno (17,29 %).

Tabela 4. Resultados da técnica da cromatografia gasosa associada a um detector de massas para identificação dos constituintes presentes no óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*.

Componentes	RI ^a	Área do pico (%) ^b
α-Pineno	8,171	0,83
α-Felandreno	16,268	0,28
Mirceno	16,494	0,47
Limoneno	18,288	17,29
1.8-Cineol	18,743	6,16
β-Terpineno	20,901	0,62
cis-β-Ocimeno	21,397	0,30
o-cimeno	22,305	0,44
δ-Careno	22,944	5,61
Linalol	35,967	1,30
Cariofileno	37,840	0,26
Terpinen-4-ol	38,362	0,85
Neral	41,837	19,68
Metil Geranato	42,226	3,78
Geranial	43,921	28,67
Geranil Acetato	44,658	2,16
Citronelol	45,092	1,31
Nerol	46,462	1,72
Geraniol	48,243	3,77
Espatuleno	56,906	0,14
Eugenol	57,636	0,18
Monoterpenos hidrocarbonetos		25,84
Monoterpenos oxigenados		69,58
Sesquiterpenos hidrocarbonados		0,26
Sesquiterpenos oxigenados		0,14
Total de componentes identificados		95,82

^a = RI, o índice de retenção publicado por Adams, ^b = Pico de área obtido por GC-FID

5.2 Atividade do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* frente bactérias gram-positivas e gram-negativas

Os resultados do ensaio de disco difusão do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* estão listados na Tabela 5. Foram observados halos de inibição que variaram de 0 a >45 mm, sendo o maior detectado na cepa de *S. aureus* ATCC 4163 e o menor para *E. coli* ATCC 10536 e *S. choleraesuis* ATCC 14028 que apresentou somente 8 mm de inibição. Neste ensaio, pôde evidenciar-se que não houve inibição considerável de micro-organismos gram-negativos, sendo o maior diâmetro de inibição para cepas de *S. choleraesuis* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 10536 com 8 mm a zona de inibição.

Tabela 5. Resultados do ensaio de disco difusão do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*.

Micro-organismos	Diâmetro do halo em mm (critério de sensibilidade)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	8 (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATC 27853	0 (-)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	8 (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 4163	>45 (+++)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	42 (+++)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	23 (+++)
<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC 9809	12 (+)
<i>Streptococcus agalactie</i> ATCC 13813	30 (+++)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	31 (+++)
<i>Bacillus pumilus</i> IA	28 (+++)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	44 (+++)

(-): não sensível, (+): sensível. (++): muito sensível e (+++): extremamente sensível.

5.3 Determinação da Concentração inibitória mínima do óleo essencial

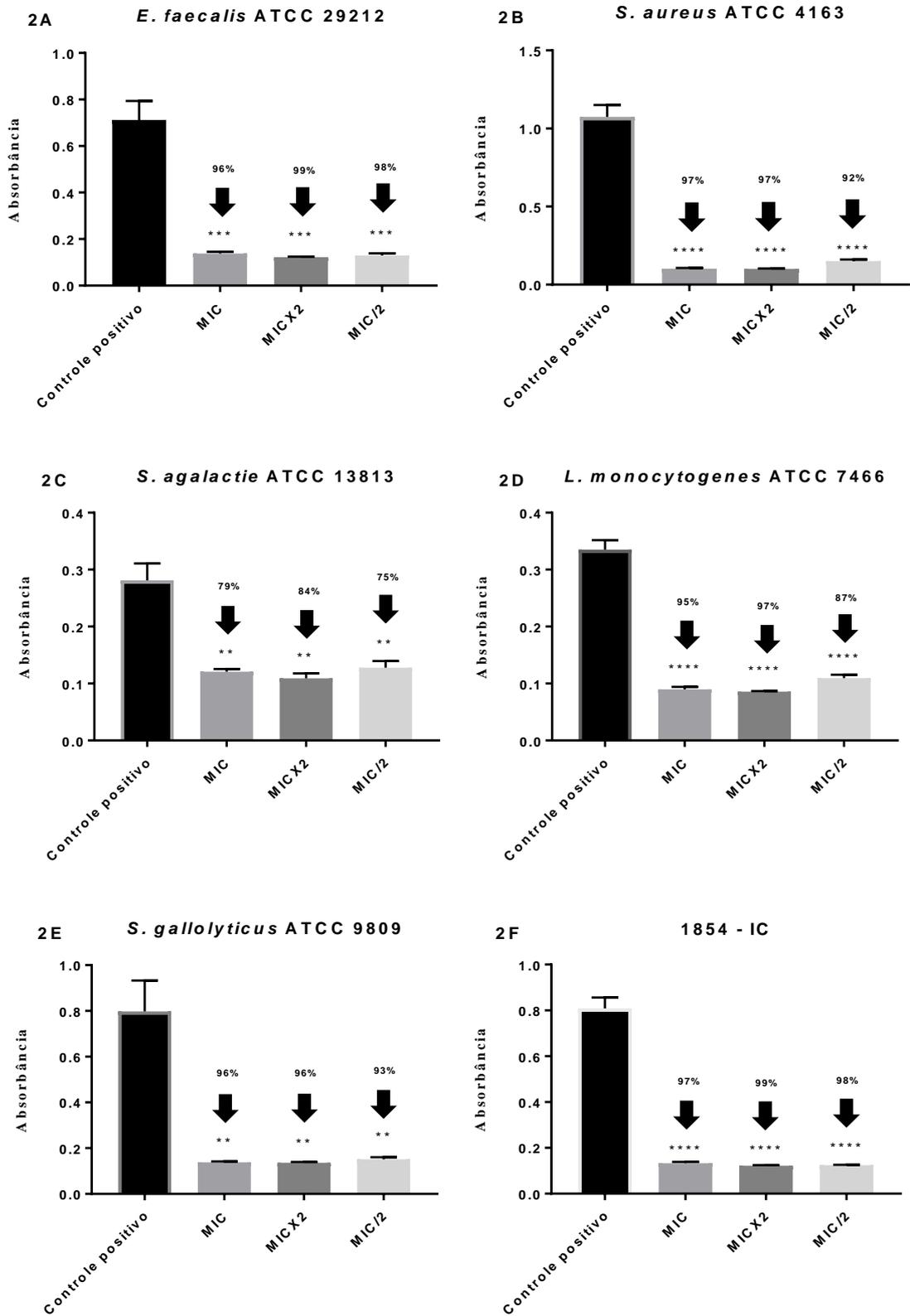
O resultado do ensaio para determinação da concentração inibitória do óleo essencial frente as bactérias está listado na Tabela 6. As concentrações variaram de 0,39% a 6,25% onde a menor concentração necessária para inibir o crescimento microbiano foi para *S. aureus*, *S. agalactie* e *L. monocytogenes* e a maior concentração para as cepas de isolados clínicos de enterococos 1220, 1240 e 606.

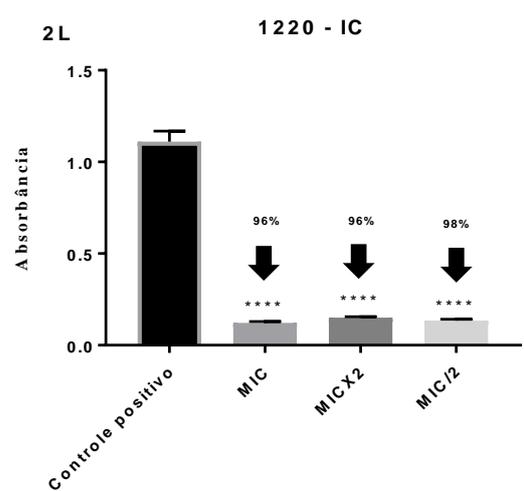
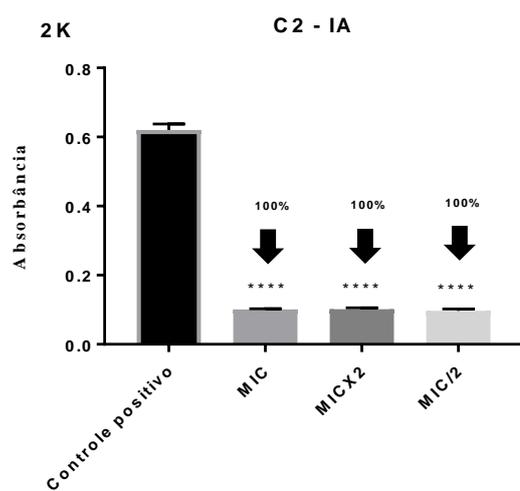
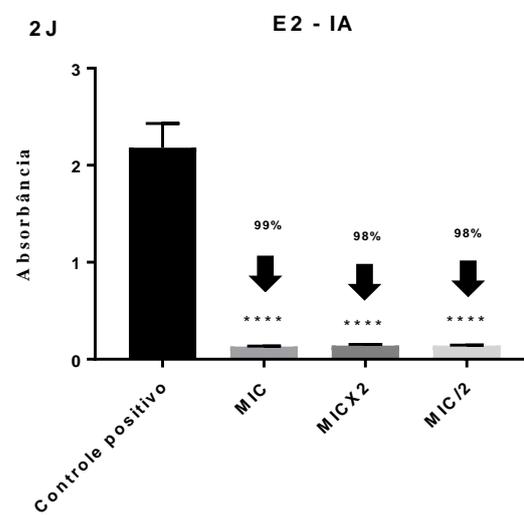
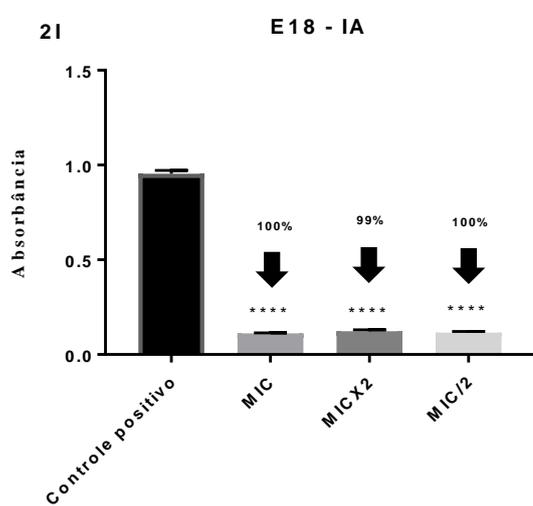
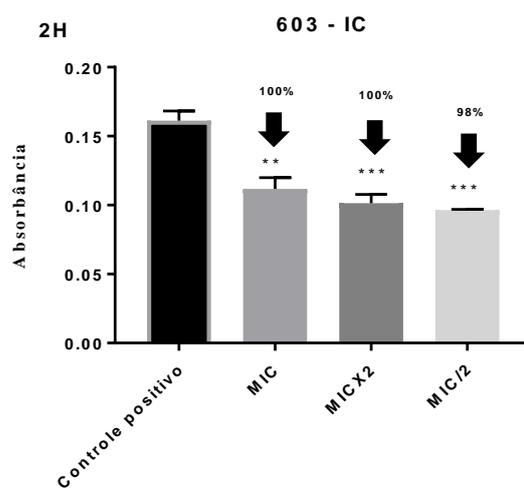
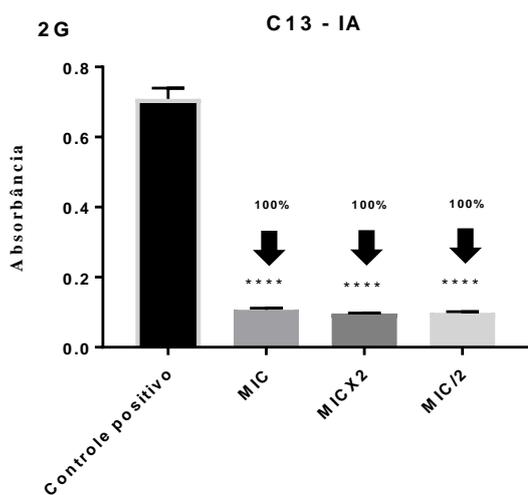
Tabela 6. Resultados da determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *E. staigeriana*.

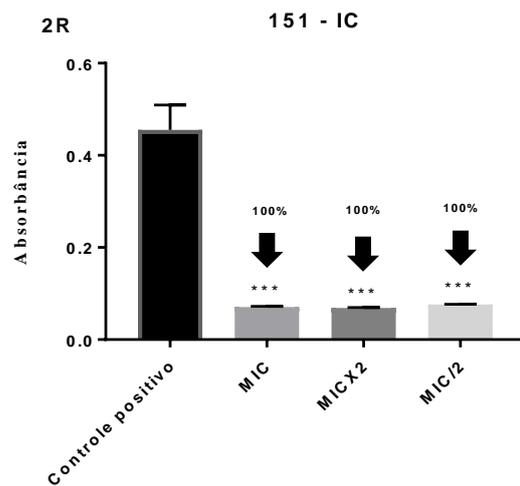
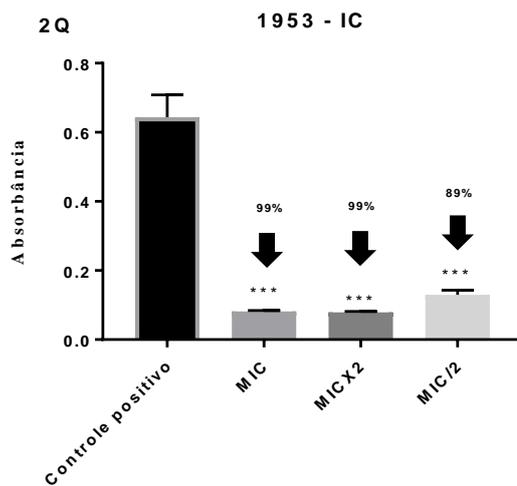
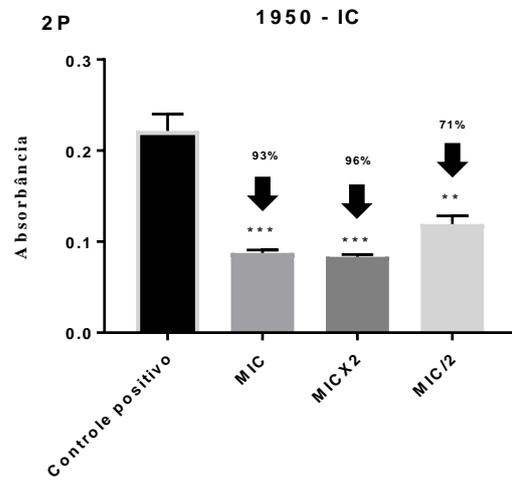
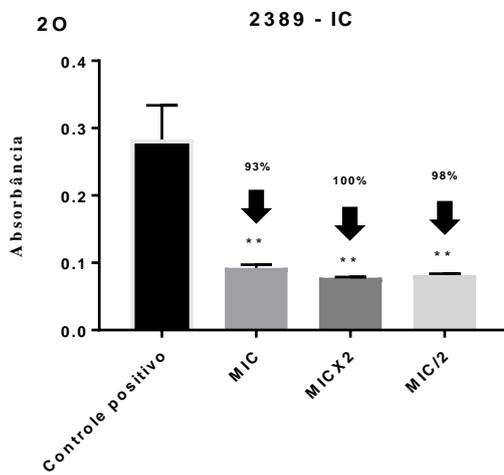
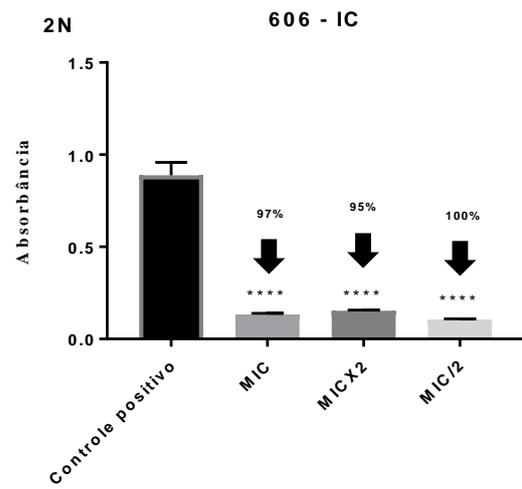
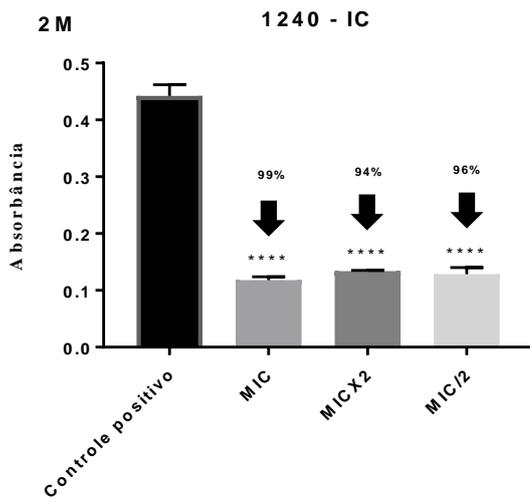
Micro-organismos	MIC (%)
<i>S. aureus</i> ATCC 4163	0,39
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0,78
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,78
<i>S. agalactie</i> ATCC 13813	0,39
<i>L. monoytogenes</i> ATCC 7644	0,39
<i>S. gallolyticus</i> ATCC 9809	0,78
<i>B. pumilus</i> IA	0,39
<i>Enterococcus faecalis</i> G9	3,12
<i>Enterococcus faecalis</i> 603	3,12
<i>Enterococcus faecalis</i> 1854	1,56
<i>Enterococcus faecalis</i> E18	3,12
<i>Enterococcus faecalis</i> E2	3,12
<i>Enterococcus faecalis</i> 1220	6,25
<i>Enterococcus faecalis</i> 1240	6,25
<i>Enterococcus faecalis</i> C2	3,12
<i>Enterococcus faecalis</i> 606	6,25
<i>Enterococcus faecalis</i> 612	1,56
<i>Enterococcus faecalis</i> C13	1,56
<i>Enterococcus faecalis</i> 2389	0,78
<i>Enterococcus faecalis</i> 1950	0,78
<i>Enterococcus faecalis</i> 1953	0,78
<i>Enterococcus faecalis</i> 151	0,78

5.4 Inibição da formação de biofilme e do biofilme pré-formado após exposição ao óleo essencial de folhas secas de *E. Staigeriana*

Os resultados do ensaio da inibição da formação do biofilme pelo óleo essencial estão plotados na figura 2A a 2U. Todos os micro-organismos selecionados para o ensaio apresentaram uma redução significativa da formação do biofilme em relação ao controle não tratado para todas as concentrações testadas do óleo essencial. O óleo essencial foi capaz de reduzir em todas as concentrações testadas a formação de biofilme dos isolados, classificando todos anteriormente como: 65% dos isolados testados eram classificados como fortes formadores, 15% como moderados, 10% fracos e 10% não formadores de biofilme.







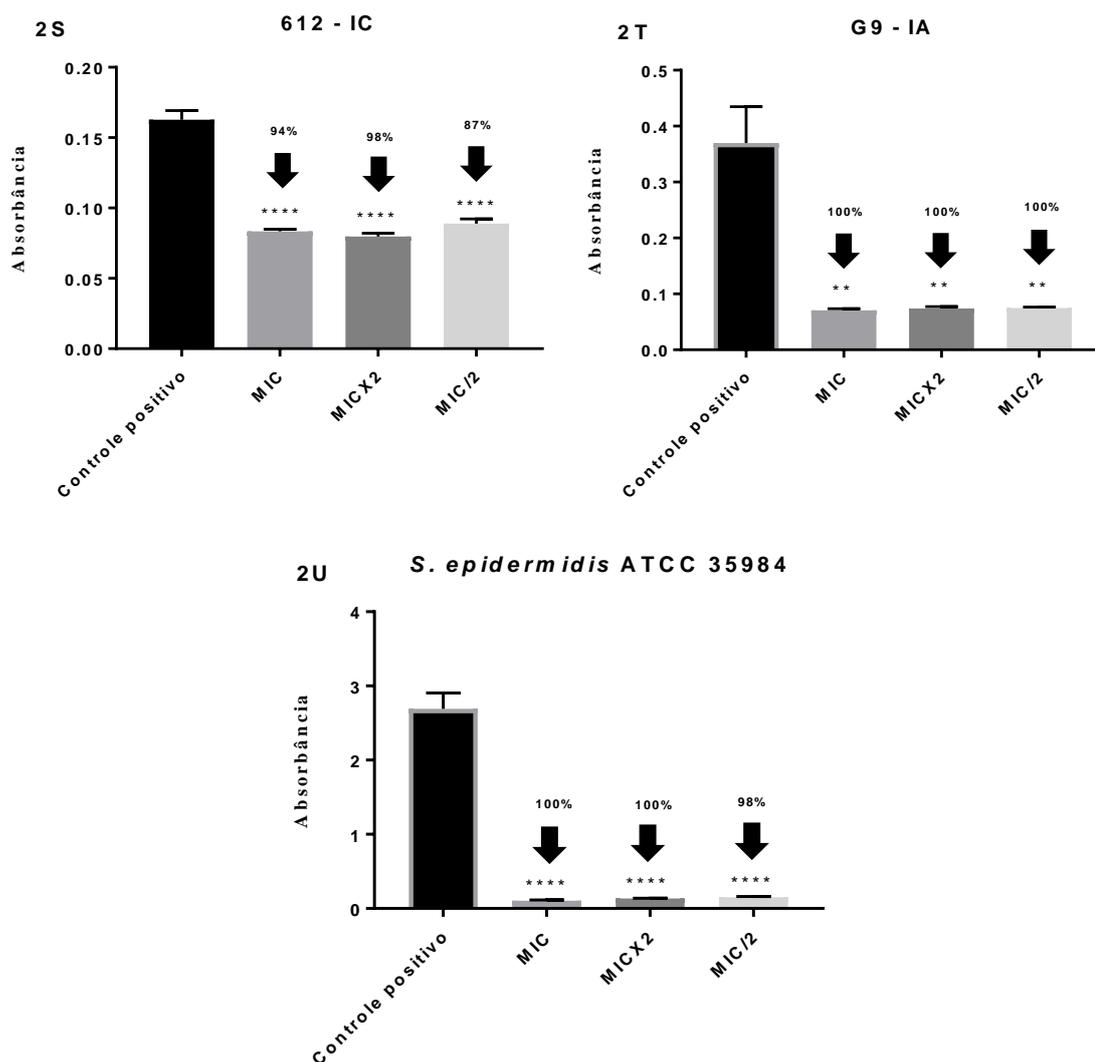
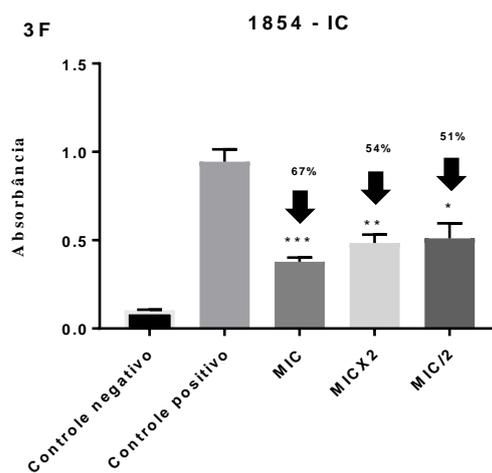
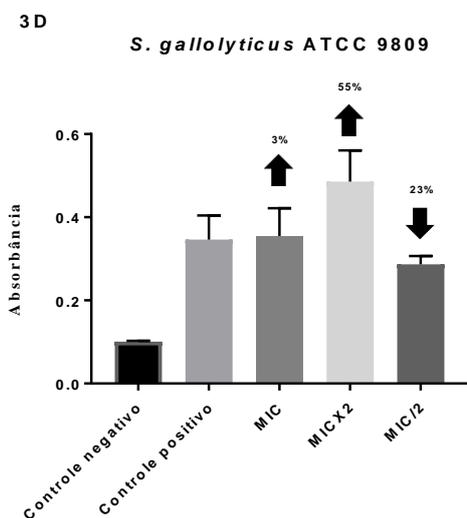
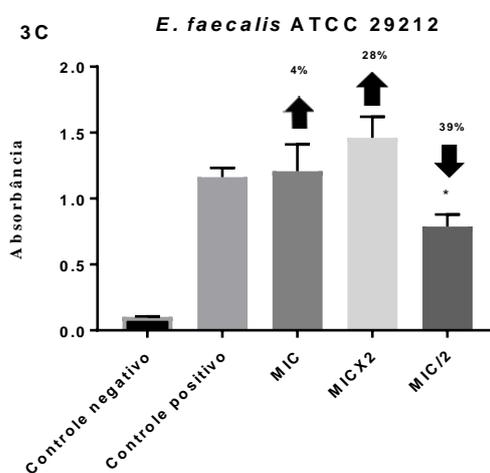
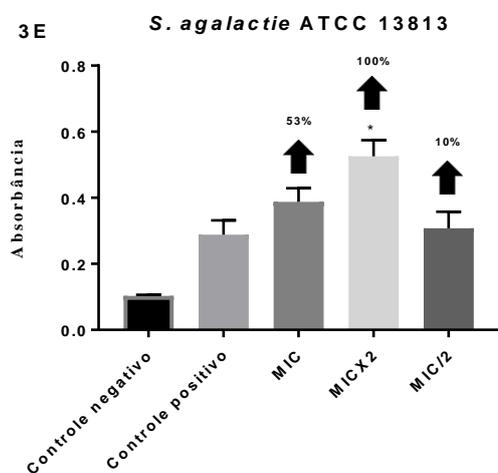
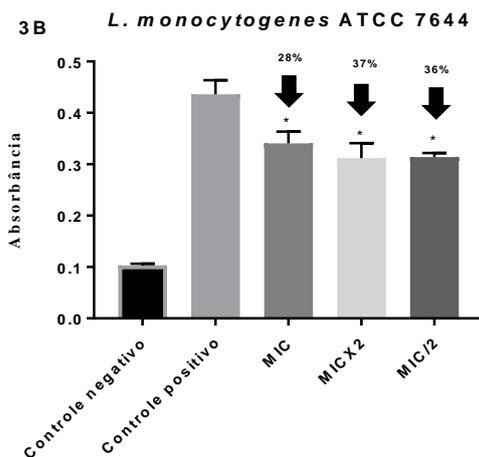
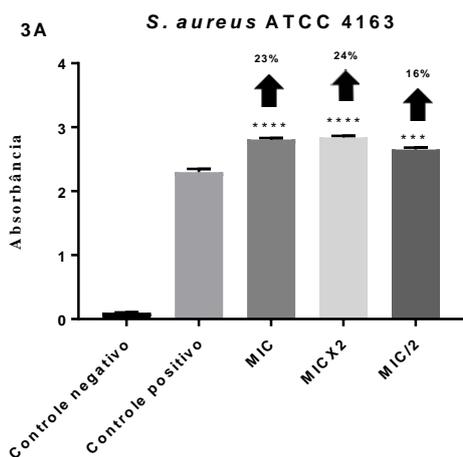


Figura 2. Resultados da inibição da formação do biofilme na concentração da MIC, MICx2 e MIC/2 para cada cepa sendo * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$, *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$ com relação ao controle positivo.

Os resultados do ensaio de inibição do biofilme pré-formado estão apresentados na figura 3A a 3H. Neste experimento, o óleo essencial de folhas secas demonstrou baixa ou nenhuma atividade de remoção do biofilme pré-formado para a grande maioria dos micro-organismos selecionados. Apenas para *E. faelcais* 1240 e 1854, isolados de amostras clínicas, as concentrações de óleo de MIC e 2X MIC apresentaram uma taxa de redução entre 67% a 46%, quando comparados com o controle. Para os demais isolados, essas mesmas concentrações aumentaram ou não afetaram a capacidade dos micro-organismos formarem biofilme.



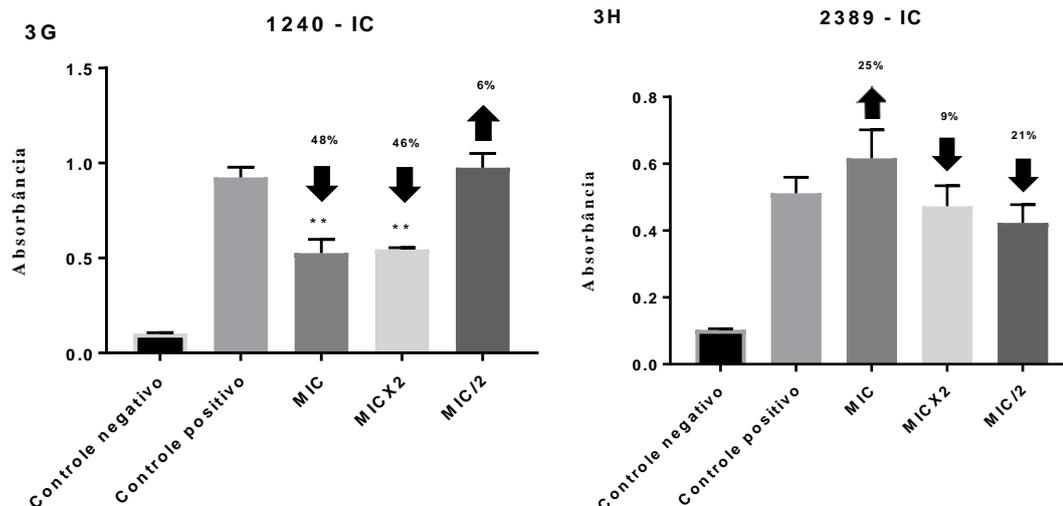


Figura 3. Resultados do ensaio de inibição da formação do biofilme pré-formado na concentração da MIC, MICX2 e MIC/2 para cada cepa sendo * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$, *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$ com relação ao controle positivo.

5.5 Efeito do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* na expressão de genes de virulência e estresse celular em *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Os resultados do ensaio de expressão gênica de *L. monocytogenes* após o tratamento com o óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* estão listados na Figura 4. Apenas três genes apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). O gene *sufS*, apresentou uma diminuição na sua expressão após o tratamento com o óleo, já, os genes da *sod* e o *degU* apresentaram superexpressão da após o tratamento. Os demais genes avaliados não apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

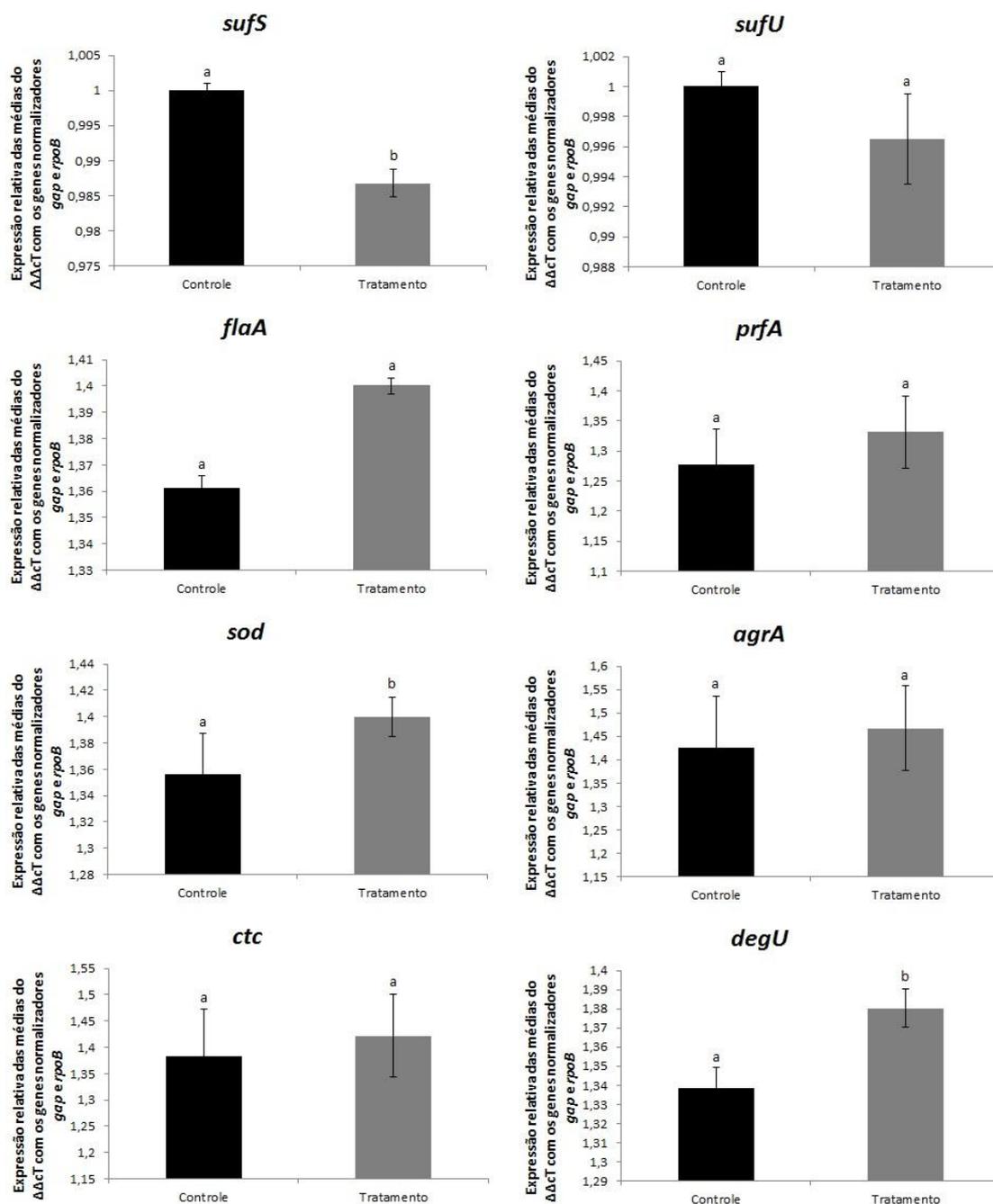


Figura 4. Expressão relativa dos genes para cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 normalizados com os genes *gap* e *rpoB*. Controle somente com micro-organismo e TSB. Tratamento com micro-organismo e ¼ da CIM do óleo essencial. Letras diferentes nas colunas representam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

5.6 Efeito do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* na expressão de genes de virulência de *Enterococcus* VRE

Os resultados do ensaio de expressão de genes de *Enterococcus* VRE após o tratamento com o óleo essencial de *E. staigeriana* está ilustrado na Figura 5. Apesar de ter sido observado um aumento na expressão do gene *vanA* na presença

do óleo, não foi observada diferença significativa na expressão deste gene de virulência e dos outros genes testados na cepa de VRE.

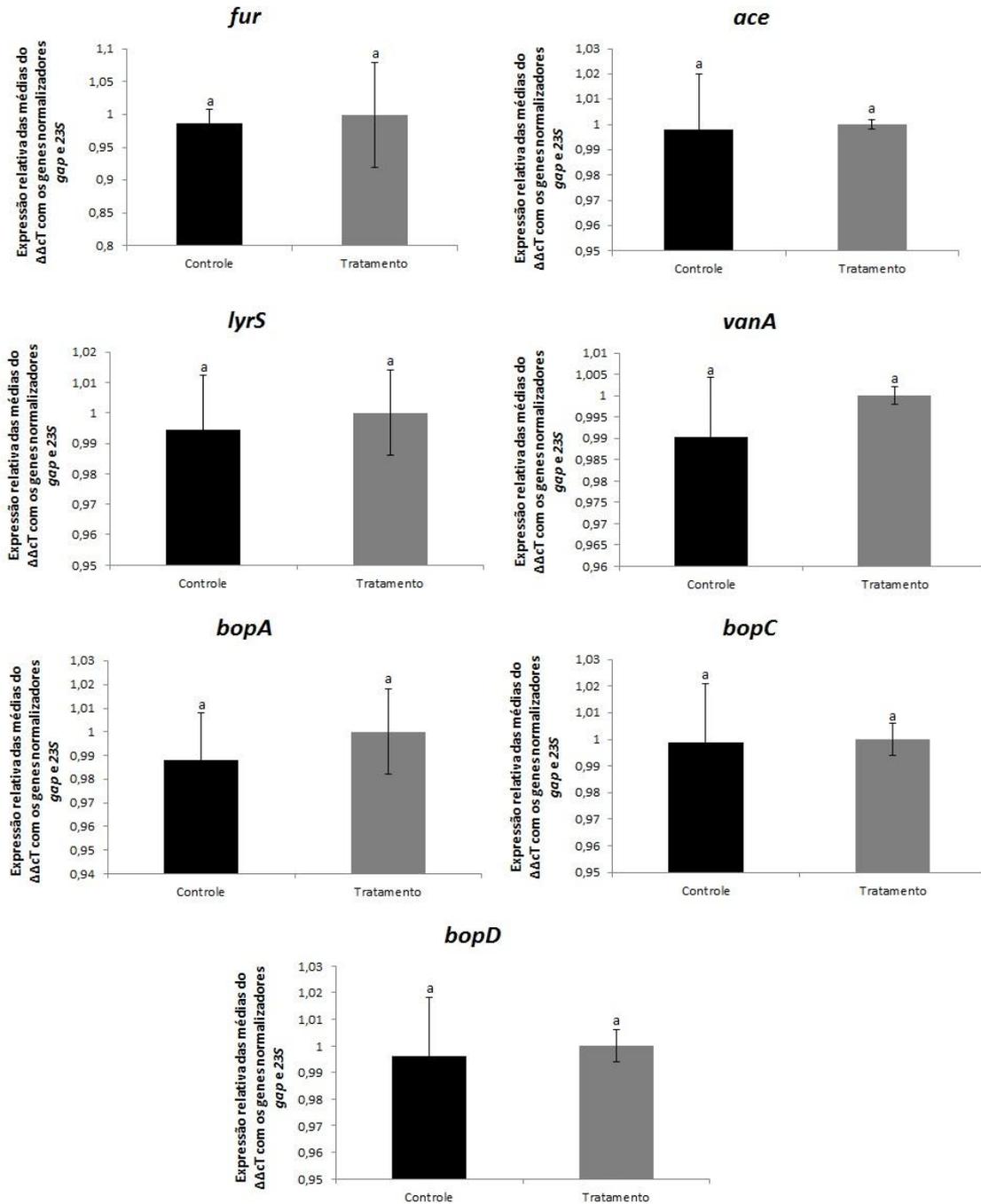


Figura 5. Expressão relativa dos genes para cepa de *Enterococcus* VRE normalizados com os genes *gap* e *23S*. Controle somente com micro-organismo e TSB. Tratamento com micro-organismo e $\frac{1}{4}$ da CIM do óleo essencial. Letras diferentes nas colunas representam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do óleo do óleo essencial de *E. staigeriana*

O uso de plantas para fins terapêuticos vem aumentando com o passar dos anos em todo mundo. No Brasil, a prática do uso de plantas vem desde os primórdios com a cultura indígena que utilizava estas plantas em rituais de cura (FERRO, 2006). Hoje em dia, estima-se que cerca de 66% da população brasileira tem acesso a produtos fitoterápicos comerciais. No mundo inteiro, é estimado que 10.000 a 53.000 plantas são utilizadas para fins medicinais, no entanto, apenas uma porção destas têm sido investigadas, representando cerca de 1% da flora tropical. À medida que aumentam o uso de fitoterápicos, também aumenta o número de casos de reações adversas, e com isso estes tem ganhado maior importância por pesquisadores e órgãos de vigilância (SASLIS-LAGOUDAKIS et al., 2012; MAZZARI e PIETRO, 2014).

Óleos essenciais são obtidos de plantas, sendo geralmente líquidos hidrofóbicos com natureza aromática devido a uma combinação de diferentes substâncias químicas como terpenos, alcoóis, ésteres, e cetonas. O aroma produzido por esses compostos e suas propriedades bioativas variam de acordo com sua composição química. A composição dos óleos pode variar de 20-60 constituintes apresentando 2-3 em maior quantidade em relação aos demais. A maioria destes são terpenos, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpeno, no entanto, o principal constituinte encontrado nos óleos são os monoterpenos (BAKKALI et al., 2008).

Óleos essenciais extraídos das folhas de *Eucalyptus* são um complexo de substâncias voláteis orgânicas. No presente estudo, os constituintes majoritários do óleo essencial de *E. staigeriana* foram o geranial (28,67 %), neral (19,68 %) e limoneno (17,29 %). Gilles et al., (2010) identificaram um total de 29 compostos no óleo extraído de folhas frescas de *E. staigeriana* sendo os principais encontrados 1,8-cineole (34,8 %), neral (10,8 %), geranial (10,8 %), Outro resultado similar foi encontrado por Macedo et al., (2010) onde o principal composto extraído foi limoneno (28,82 %) seguido de citral (10,77 %); resultados muito próximos foram relatados por Chagas et al., (2002), que obteve uma concentração de compostos de limoneno (24,78 %) e citral (14,99 %).

Vários são os fatores que afetam os compostos do óleo essencial, como o tempo da colheita, fatores sazonais e condições de habitat. Além disso, a extração já foi demonstrada que afeta nos componentes do óleo por variáveis utilizadas na técnica como, temperatura de extração, tempo, agitação e propriedades físico-químicas do solvente de extração (VOUNG et al., 2015).

6.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas secas de *E. Staigeriana*

Os resultados observados pela técnica de disco difusão do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* apresentaram halos de inibição variáveis frente a diferentes micro-organismos. Os micro-organismos mais sensíveis à presença do óleo foram os gram-positivos, onde *S. aureus* apresentou maior sensibilidade, seguido de *S. epidermidis* e *B. cereus*. Resultados similares foram observados por Gilles et al., (2010) utilizando cepas de *S. aureus* e *E. faecalis* que relataram elevada sensibilidade para *S. aureus* com halo superior a 90 mm e *E. faecalis* com halo de inibição de 20 mm. *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis* não apresentaram sensibilidade frente ao óleo. Resultados similares foram observados por Gilles et al., (2010), que também não obtiveram sensibilidade para *P. aeruginosa* e alcançaram um halo de inibição de 15 mm para *E. coli*.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais depende da constituição e da quantidade de compostos presentes no material. Cada composto pode apresentar um diferente mecanismo de ação frente a micro-organismos onde envolve uma série de reações químicas na célula bacteriana. Normalmente, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se dá pela interação com a parede microbiana. A presença de uma membrana externa em bactérias gram-negativas, composta de lipopolissacarídeo e os polissacarídeos, permite que estes micro-organismos resistam às ações dos óleos essenciais e produtos naturais. Esta membrana possui porinas que atua como um canal hidrofílico transmembrana que faz uma seletividade de passagem de pequenas moléculas hidrofílicas para o interior celular, sendo isto uma possível razão para maior resistência em gram-negativas. Já em bactérias gram-positivas, a estrutura bacteriana permite o acúmulo de moléculas hidrofóbicas na parede ou a passagem para o interior da célula, permitindo que óleos essenciais, geralmente hidrofóbicos, atuem frente a estes micro-organismos (NAZZARO et al., 2013; SWAMY, AKHTAR E SINNI AH, 2016).

Na determinação da concentração inibitória mínima, voltada somente para micro-organismos gram-positivos, as concentrações variaram de 0,39 a 6,25%, apresentando uma menor concentração para cepa de *S. aureus* e as maiores concentrações para cepas VRE. Não foram encontrados relatos na literatura com ensaio de determinação da concentração inibitória mínima envolvendo o óleo essencial de *E. staigeriana*. Dentre as outras espécies de *Eucalyptus*, algumas se destacam por possuir grande atividade antimicrobiana. Vratnica et al., (2011) investigaram a atividade antimicrobiana de *E. globulus* frente a diferentes micro-organismos e obtiveram um intervalo de CIM entre 0,09-3.13 mg/mL, sendo uma das menores concentrações encontradas para cepa de *S. aureus*; resultado próximo encontrado por Derwich et al., (2009), que obtiveram uma CIM de 0,75 mg/mL para *S. aureus*.

Óleos essenciais são mistura de várias moléculas como terpenos, terpenóides, ácidos, álcoois e outras substâncias que podem afetar no crescimento bacteriano por diversos mecanismos. Os terpenos, principais constituintes dos óleos essenciais que incluem alguns compostos como limoneno, terpineno e α -pineno, quando isolados dos outros compostos e testados quanto a sua capacidade antimicrobiana, mostram uma ineficácia em inibição de microrganismos. Já os terpenóides, que diferem dos terpenos por possuírem moléculas de oxigênio adicionadas ou grupos metil movidos de sua estrutura, apresentam atividade antimicrobiana já demonstrada. Neste grupo de compostos estão inclusos linalol, mentol, geraniol, entre outros (BAKKALI et al., 2008; BARBOSA, FILOMENO e TEIXEIRA, 2016; SWAMY, AKHTAR E SINNIHAH, 2016)

Outro importante composto relacionado à atividade antimicrobiana é o 1,8-cineol. Este componente de óleos essenciais, também foi encontrado neste estudo, porém, em uma menor concentração (6,16%), e apresenta uma vasta atividade antimicrobiana frente a microrganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* (BAKKALI et al., 2008).

A atividade antimicrobiana de um óleo essencial depende de sua composição química e não é atribuída a um único mecanismo ou composto, mas sim, de uma cascata de reações químicas que envolvem toda célula bacteriana, tornando os óleos essenciais “versáteis” (NAZZARO et al., 2013).

6.3 Inibição da formação de biofilme e do biofilme pré-formado

Micro-organismos que estão em uma matriz de biofilme são naturalmente mais resistentes aos antibacterianos do que células livres. Hoje em dia, nenhuma terapia com alvo em biofilmes microbianos está disponível no mercado, e ainda a melhor estratégia contra os biofilmes microbianos é evitar a sua formação em vez de tentar eliminá-los depois que eles se formam (SCHILLACI et al., 2013).

A descoberta de agentes antimicrobianos, ativos não apenas contra microrganismos planctônicos, mas também contra biofilmes microbianos, representa um objetivo importante. A prevenção da formação de biofilmes provindos de efeitos derivados de plantas tem sido relatado por diversos autores contra *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Candida albicans*, entre outros patógenos (SNOUSSI et al., 2015).

Neste estudo, testou-se a capacidade de diferentes concentrações do óleo essencial de *E. staigeriana* para inibir ou erradicar o biofilme sobre uma superfície de poliestireno.

Os resultados encontrados neste estudo, para o óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana*, demonstraram que o óleo possui capacidade de inibir a formação de biofilme de todas as cepas testadas. Não há relatos na literatura de atividade anti-biofilme envolvendo o óleo essencial de *E. staigeriana*. No entanto, quando as bactérias foram expostas ao óleo essencial após uma pré-formação de biofilme, houve redução do biofilme para algumas cepas somente.

Ao utilizar a técnica de coloração por cristal violeta e leitura por espectrofotômetro, avaliamos somente a biomassa do biofilme compreendendo um total das células vivas e mortas. O cristal violeta se liga a parede da célula microbiana e na matriz de EPS, sendo uma metodologia simples e baixo custo (CHRISTENSEN et al., 1985). Este é um dos métodos mais utilizados para quantificação do biofilme, porém, não mostra o valor real de microrganismos viáveis (PANTANELLA et al., 2013).

Segundo estudo relatado por Kifer et al., (2016), os quais testavam compostos para inibição da formação de biofilmes e de biofilmes pré-formados, mostraram que biofilmes de *S. aureus* foram resistentes a mupirocina em todas as concentrações testadas, porém para compostos monoterpenos houve redução de até 10% do biofilme pré-formado, dentre eles o melhor efeito foi demonstrado pelo timol, seguido de mentol e 1,8-cineol. Para o 1,8-cineol quando combinado com a

mupirocina apresentou potencial de eliminação contra todas as cepas testadas quando comparado com os outros compostos, mostrando uma queda na viabilidade do biofilme em 10%.

Para os autores Merghni et al., (2016), em estudos com o óleo essencial de *Laurus nobilis*, foi observado uma atividade de anti-adesão em $\frac{1}{4}$ de MIC chegando a porcentagens de inibição de 50 à 70% do biofilme de *S. aureus*.

Sabe-se que as bactérias no biofilme sofrem alterações fenotípicas que as tornam muito mais resistentes aos antimicrobianos. A matriz de EPS pode impedir o acesso de antibióticos às bactérias ou as células presentes dentro de um biofilme, levando as mesmas a adquirirem características de crescimento e absorção de nutrientes e drogas de forma diferente de bactérias planctônicas (KIFER et al., 2016).

Contrariamente ao forte efeito do óleo essencial de *E. staigeriana* contra as bactérias em sua forma planctônica, o mesmo obteve pouca atividade de remoção do biofilme bacteriano, como citado anteriormente. Resultados vêm sido descritos por autores que utilizam diversas substâncias que demonstram redução de até 50% do biofilme pré-formado mesmo em suas maiores concentrações. Isso pode ocorrer devido à superprodução de exopolissacarídeo que tem o papel de proteger as bactérias metabolicamente ativas incorporadas na comunidade do biofilme, onde os compostos utilizados poderiam eliminar apenas as células mais próximas à interface do líquido do biofilme (HURLER et al., 2013; SELIM et al., 2014; KIFER et al., 2016).

Ao contrário do potencial de erradicação do biofilme, o óleo essencial testado no presente estudo, inibiu a formação de biofilmes em todas as concentrações testadas. Porém as propriedades inibitórias de biofilmes pelo óleo essencial *E. staigeriana* ainda são pouco investigadas.

O óleo essencial aplicado nestas concentrações aplicadas neste estudo, antes da formação do biofilme, poderia interagir com proteínas de superfície bacterianas comprometendo a fase de ligação inicial em superfícies, bem como interferir em sistemas de *quorum sensing*. Isso confirma relatos anteriores, onde a inibição da ligação celular a um substrato é mais fácil de conseguir, do que inibir o crescimento de um biofilme já estabelecido. O sucesso na inibição da ligação celular pode ser explicado quanto a ligação celular, que é o estágio inicial na formação do biofilme após o condicionamento da superfície, o que cria um ambiente favorável

para a fixação bacteriana. No entanto, durante esta fase, a maior parte das células ainda está na fase fluida e, portanto, permanecendo ainda suscetíveis aos antimicrobianos (SCHILLACI et al., 2013; SELIM et al., 2014; KIM et al., 2015; KIFER et al., 2016).

Outros óleos, como o óleo de canela, utilizado pelos autores Kalia et al., (2015), reduziu em 31% a capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa*, onde o óleo foi capaz de diminuir a produção de alginato, um componente importante da matriz de EPS que mantém a integridade do biofilme, diminuindo por consequência a sua formação. Em células planctônicas foi capaz de danificar a membrana bacteriana induzindo a morte celular.

Estes estudos demonstram que óleos essenciais de diferentes origens podem variar em seus mecanismos de ação em crescimento planctônicos ou sésseis, pois a composição dos óleos é muitas vezes variável de acordo com o local de coleta, onde seus componentes desempenham um papel importante na adaptação da planta à ecologia e ao meio ambiente. Esta variabilidade nas atividades dos óleos pode também ser devido à diferença nos níveis de seus componentes principais e menores, e a um efeito sinérgico entre todos os componentes. Os óleos essenciais são substancialmente mais potentes, em comparação com constituintes químicos individuais, indicando uma possível sinergia entre os diferentes constituintes químicos dos óleos essenciais (LEE et al., 2011; KALIA et al., 2015; KIM et al., 2015; YANG et al., 2015; MERGHNI et al., 2016;).

Já existem estudos que demonstram o potencial de óleos essenciais incorporados em materiais poliméricos como uma estratégia destinada a controlar a contaminação microbiana e a prevenir a aderência superficial, conferindo atividade antimicrobiana e reduzindo o biofilme de monoespécie e multiespécies em um tempo de incubação prolongado. Os resultados dessa aplicação demonstram que a incorporação de componentes de óleo essencial não causam alterações significativas da homogeneidade da superfície, mas ao mesmo tempo torna a superfície menos hidrofóbica. Este efeito poderia desempenhar um papel importante na fase inicial da adesão bacteriana, porque uma hidrofobicidade reduzida provoca uma força atrativa mais fraca e uma menor interação entre a superfície e as bactérias, comprometendo assim a fase seguinte de formação de biomassa. Esses estudos afirmam que os óleos podem ser potencialmente utilizados para prevenir a formação de substâncias patogênicas em superfícies de instrumentos médicos e de

processamento de alimentos (NOSTRO et al., 2013; KIM et al., 2016).

Estes resultados suportam o uso medicinal e a aplicação do óleo essencial *E. staigeriana* onde sua atividade poderia ser uma boa escolha quando aplicado para a prevenção de patologias, bem como para a prevenção de contaminações ligadas a formação de biofilme, pois os produtos naturais têm sido utilizados como métodos alternativos às terapias convencionais e têm crescido no interesse dos pesquisadores (ERRIU et al., 2013).

6.4 Efeito do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* na expressão de genes de virulência

De acordo com as análises dos resultados obtidos de expressão gênica da cepa de *L. monocytogenes*, apenas o gene *sufS* apresentou uma diminuição significativa na presença do óleo essencial de *E. staigeriana* da expressão do gene. Os genes *sod* e *degU* demonstraram um maior nível de transcrição do gene na presença do óleo. Os demais genes para este micro-organismo não apresentaram mudanças significativas na expressão nas condições testadas. Não há relatos sobre atividade do óleo essencial de *E. staigeriana* sobre expressão gênica.

Em um estudo na tentativa de inibição de fatores de virulência de uma cepa de MRSA, Kim et al., (2015) demonstraram que o óleo de *Chamaecyparis obtusa*, que apresenta o limoneno como um dos seus constituintes majoritários, diminuiu significativamente a expressão gênica de enterotoxina A e gene regulador acessório em MRSA.

O gene *degU* é ortólogo a um gene regulador em *Bacillus subtilis* que está envolvido na codificação de enzimas de degradação celular e atua na expressão de genes envolvidos na motilidade, sendo um gene independente da regulação do *flaA* (WILLIAMS et al., 2005). Alguns estudos indicam que óleos essenciais apresentam diferentes caminhos para resultar em uma perda de viabilidade microbiana (NAZZARO et al., 2013). Talvez, a superexpressão do gene *degU* ocorreu devido a uma tentativa de suprir esta perda de motilidade celular, uma característica importante na infecção por este micro-organismo.

O gene *sod*, outro gene que houve uma regulação aumentada após o tratamento com o óleo essencial, catalisa a conversão de O_2^- em H_2O_2 protegendo a composição, estrutura e funções celulares ao dano oxidativo por ROS. ROS são

substâncias geradas pelo metabolismo aeróbico biológico que incluem íons oxigênio, peróxidos e radicais de oxigênio livre (ZHAO et al., 2016).

A hidrofobicidade, típica característica de óleos essenciais, leva a um aumento da permeabilidade da membrana bacteriana ocasionando também um defeito no transporte de moléculas e íons permitindo a passagem destes para dentro da célula microbiana resultando em um desequilíbrio intracelular. Conseqüentemente, isto leva a alterações na célula do micro-organismo como coagulação do plasma, desnaturação de enzimas e perda de metabólitos celular (NAZZARO et al., 2013).

O aumento da expressão do gene *sod* no tratamento com o óleo essencial de *E. staigeriana* pode vir a ser uma tentativa de eliminar a geração de ROS causados intracelularmente pelo desequilíbrio ou ruptura da membrana.

Um estudo realizado por Khan et al., (2017) revelou que o gene *sodA*, após o tratamento com timol e carvacrol, apresentou uma superexpressão em cepa de *S. mutans*, além de aumentar a expressão de outro gene que induzia a atividade de apoptose do micro-organismo.

O cluster de genes do sistema Ferro/Enxofre (Fe-S) se apresenta como um dos mais bem caracterizados e difundidos centros redox na área da biologia. As proteínas desse sistema atuam em importantes processos do metabolismo como respiração, metabolismo de aminoácidos, reparação de replicação do DNA e regulação a respostas ambientais. Dentro deste cluster, há sistemas utilizados pela bactéria para a biogênese da via Fe-S onde estes sistemas possuem em comum o envolvimento da enzima cisteína desulfurase (*sufS*) que permite a conversão de L-cisteína em L-alanina que retêm o átomo de enxofre libertado num resíduo de cisteína na forma de um persulfureto; passado isto, outra reação ocorre e a molécula de enxofre pode ser utilizada na via Fe-S. Neste estudo, observamos uma diminuição significativa da expressão do gene *sufS* após o tratamento com o óleo essencial (ZAFRILLA et al., 2010; WEBERT et al., 2014). O metabolismo microbiano tem um papel fundamental na sua sobrevivência. Metabólitos e substâncias de micro-organismos podem sofrer alteração em resposta a alterações ambientais, levando a acreditar que óleo essencial possa ter algum efeito sobre o sistema Fe-S (NAZZARO et al., 2013).

Enterococcus são micro-organismos versáteis capaz de se adaptarem a diferentes ambientes. Esta versatilidade a adaptação é atribuída à expressão gênica

que é regulada por fatores de transcrição. Essa expressão gênica ocorre a vários níveis celulares e é responsável por diversas funções como manutenção de íons, que irão ser responsáveis por alguma atividade metabólica no organismo, resposta a alterações ambientais e mecanismos de resistência (DEBROY et al., 2014).

Neste estudo, expomos um isolado de *Enterococcus* VRE a uma sub-concentração do óleo essencial de folhas secas de *E. staigeriana* e analisamos genes relacionados a resistência microbiana, como *bop*, *vanA* e *ace*, e um gene relacionado a captação férrica, *fur*. Não foi observada nenhuma diferença estatística do tratamento em relação ao controle em nenhum gene. Espécies de *E. faecalis* possuem um mecanismo complexo de resposta a estímulos através de regulação transcricional e pós-transcricional, que confere a estes micro-organismos adaptação a ambientes e substâncias presentes (DEBROY et al., 2014).

7. CONCLUSÃO

O óleo essencial extraído de folhas secas de *E. staigeriana* apresentou atividade antimicrobiana contra cepas padrão gram-positiva e espécies de *Enterococcus* VRE, no entanto, não houve resultados promissores frente a bactérias gram-negativas. Os resultados demonstraram que concentrações muito baixas do óleo foram capazes de inibir o crescimento microbiano. A análise dos resultados de inibição da formação do biofilme pelo óleo essencial, demonstrou que em todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir significativamente a formação do biofilme. Entretanto, quando este biofilme já está pré-estabelecido numa superfície de poliestireno, o óleo não apresentou grande capacidade de remoção deste biofilme, tal como no ensaio de inibição. Em relação à expressão gênica de genes de virulência e resistência de *L. monocytogenes* ATCC 7466 e *E. faecalis* VRE após a exposição do óleo essencial, foi observado que o óleo alterou a expressão de alguns genes de *L. monocytogenes*. Por outro lado, o óleo não alterou a expressão dos genes de virulência e resistência avaliados para *Enterococcus faecalis* VRE.

8. REFERÊNCIAS

Artigos:

- Acton, D.S.; Plat-Sinnige, M.J.; Van, W.W.; De, G.N.; Van, B.A. 2009. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 28:115–127.
- Adukwu, E.C.; Allen, S.C.H.; Phillips, C.A. 2012. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 113:1217-1227.
- Agnieszka, D.; Tomasz, J.; Witkowski, J.M.; Bryl, E.; Rutkowski, B.; Alicja, D. 2014. Prophages in Enterococca006C Isolates from Renal Transplant Recipients: Renal Failure Etiologies Promote Selection of Strains. *BioMed Research International*. 2014:1-6.
- Albrich, W.C.; Monnet, D.L.; Harbarth, S. 2004. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerging Infectious Diseases*. 10: 514 –517.
- Anais, A.; Besse, N.G. 2016. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiology*. 53:135-149.
- Andersson D.I.; Hughes, D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*. 12:465–478.
- Archambaud, C.; Nahori, M-A.; Pizarro-Cerda, J.; Cossart, P.; Dussurget, O. 2006. Control of *Listeria superoxide* dismutase by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 281:31812–31822.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46:446-475.
- Balli, E.P.; Venetis, C.A.; Miyakis, S. 2014. Systematic review and meta-analysis of linezolid versus daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*. 58:734–739.
- Bandeira, J.M.; Barbosa, F.F.; Barbosa, L.M.P.; Rodrigues, I.C.S.; Bacarin, M.A.; Peters, J.A.; Braga, E.J.B. 2011. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, 13(2):157-164.
- Barbosa, L.C.A.; Filomeno, C.A.; Teixeira, R.R. 2016. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. *Essential Oils*. 21:1-33.
- Behari, J.; Youngman, P. 1998. Regulation of *hly* Expression in *Listeria monocytogenes* by Carbon Sources and pH Occurs through Separate Mechanisms Mediated by PrfA. *Infection and Immunity*. 66:3635- 3642.
- Berkner, S.; Konradi S.; Scho "Nfeld, J. 2014. Antibiotic resistance and the environment—there and back again. *EMBO Reports*. 15:740–744.
- Berthelot, P.; Grattard, F.; Cazorla, C.; Passot, J.P.; Fayard, J.P.; Meley, R. 2010. Is nasal carriage of *Staphylococcus aureus* the main acquisition pathway for surgical-site infection in orthopaedic surgery? *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 29:373–382.
- Bottone E.J. 2010. *B. cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:382–398.

- Byappanahalli, M.N.; Nevers, M.B.; Korajkic, A.; Staley, Z.R.; Harwood, V.J. 2012. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76:685–706.
- Calixto, J.B. 2000 Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 33(2):179-189.
- Cassel, E.; Vargas, R.; Martinez, N.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E. 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products.* 29:171-176.
- CDC. 2002. Antimicrobial resistance: a growing threat to public health. Atlanta: Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Infectious Diseases. Centers for Disease Control.
- CDC. 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 2006–2013. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 63:328–332.
- Cetinkaya, Y.; Falk, P.; Mayhall, C.G. 2000. Vancomycin-resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews.* 13:686–707.
- Chagas, A.C.S.; Passos, W.M.; Prates, H.T.; R.C; Furlong, J.; Fortes, I.C.P. 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 39:247-253.
- Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J. J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey, E.H. 1985. Adesão de estafilococos coagulase-negativo em placas de cultura de tecidos de plástico: Um modelo quantitativo para a adesão dos estafilococos aos dispositivos médicos. *Journal of Clinical Microbiology.* 22:996-1006.
- Colagiorgi, A.; Di Ciccio, P.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Ianieri, A. 2016. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms.* 4:1-21.
- Conwell, M.; Daniels, V.; Naughton, P.J.; Dooley, S.G. 2017. Interspecies transfer of vancomycin erythromycin and tetracycline resistance among Enterococcus species recovered from agrarian sources. *BMC Microbiology.* 17:1-8.
- Corso, A.C.; Gagetti, P.S.; Rodriguez, M.M.; Melano, R.G.; Ceriana, P.G.; Faccione, D.F. 2007. Molecular epidemiology of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *International Journal Infectious Diseases.* 11:69–75.
- Cosgrove, S.E. 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases.* 42:82–89.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318–1322.
- Creti, R.; Koch, S.; Fabretti, F.; Baldassarri, L.; Huebner, J. 2006. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides.
- Davies, D. G.; Parsek, M. R.; Pearson, Costerton, J. W. Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280:295-298.
- De Noordhout, C.M.; Devleeschauwer, B.; Angulo, F.J.; Verbeke, G.; Haagsma, J.; Kirk, M.; Havelaar, A.; Speybroeck, N. 2014. The Global Burden Of Listeriosis: A Systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases.* 14:1073–1082.
- Derwich, E.; Benziane, Z.; Boukir, A. 2009. GC/MS analysis of volatile constituents

- and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 3:305-313.
- ECDC. 2014. Food - and Waterborne Diseases and Zoonoses; ECDC: Stockholm, Sweden.
- EFSA. 2015. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA.13.
- Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Scherer, S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of foodborne illness. *Molecular Nutrition Food Research*. 48:479–487.
- Ehling-Schulz, M.; Frenzel, E.; Gohar, M. 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Erriu, M.; Pili, F.M.; Tuveri, E.; Pigliacampo, D.; Scano, A.; Montaldo, C.; Piras, V.; Denotti, G.; Pilloni, A.; Garau, V.; Orrù, G. 2013. Oil Essential Mouthwashes Antibacterial Activity against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: A Comparison between Antibiofilm and Antiplanktonic Effects. *International Journal Of Dentistry*. 2013:1-5.
- Farber, J.M.; Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*. 55:476–511.
- Fiol, F.S.D.; Lopes, L.C.; Toledo, M.I.; Barberato-Filho, S. 2010. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 43:68-72.
- Flemming, H.; Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8:623–633.
- Fluit, A.D.C.; Visser, M.R.; Schmitz F. 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:836–871.
- Gardan, R.; Duché, O.; Leroy-sétrin, S.; Labadie, J. 2003. Role of ctc from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 154-161.
- Gianfranceschi, M.V.; D’ottavio, M.C.; Gattuso, A.; Bella, A.; Aureli, P. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005). *Food Microbiology*. 26:520–526.
- Gilles, M.; Zhao, J.; An, M.; Agboola, S. 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*. 119:731-737.
- Gonçalves, A.L.; Alves Filho, A.; Menezes, H. 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto de Biologia*. 72(3):353-358.
- Hall, M.; Grundström, C.; Beguma, A.; J. Lindberga, M.J.; Sauer, U.H.; Almqvist, F.; Johansson, J.; Sauer-eriksson, A.E. 2016. Structural basis for glutathione-mediated activation of the virulence regulatory protein PrfA in *Listeria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:14733-14738.
- Hiltunen, T.; Virta, M.; Laine, A. 2016. Antibiotic resistance in the wild: an ecoevolutionary perspective. *The Royal Society*. 372:1-7.
- Huang, Y.C.; Lien, R.I.; Lin, T.Y. 2015. Effect of mupirocin decolonization on subsequent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in infants in neonatal intensive care units. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 34:241–245.
- Hurler, J.; Sørensen, K.K.; Fallarero, A.; Vuorela, P.; Škalko-Basnet, N. 2013.

- Liposomes-in-hydrogel delivery system with mupirocin: In vitro antibiofilm studies and in vivo evaluation in mice burn model. *Biomed Research International*. 2013:1-8.
- Ivanek, R.; Gröhn, Y.T.; Tauer, L.W.; Wiedmann, M. 2004. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44:513-523.
- Ivanek, R.; Gröhn, Y.T.; Wiedmann, M. 2006. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: Review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathogens Disease*. 3:319–336.
- Ivy, A.; Chan, Y.C.; Bowen, B.M.; Boor, K.J.; Wiedmann, M. 2010. Growth Temperature-Dependent Contributions of Response Regulators, sB, PrfA, and Motility Factors to *Listeria monocytogenes* Invasion of Caco-2 Cells *Reid*. 7:1337-1349.
- Jackson, K.A.; Iwamoto, M.; Swerdlow, D. 2010. Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiology & Infection*. 138:1503–1509.
- Jacobson, L. 2008. Listeriosis. *Pediatrics In Review*. 29:410–411.
- Jadhav, S.; Shah, R.; Bhave, M.; Palombo, E. A. 2013. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*. 29(1):125–130.
- Jamal, A.M.; David, B.H. 2007. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*. 56:1581-1588.
- Kalia, M.; Yadav, V.K.; Singh, P.K.; Sharma, D.; Pandey, H.; Narvi, S.S.; Agarwal, V. 2015. Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One*. 10:1-18.
- Katayama, Y.; Ito, T.; Hiramatsu, K. 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother*. 44:1549-1555.
- Khan, S.T.; Khan, M.; Ahmad, J.; Rwahab, R.; Abd-Elkader, O.H.; Musarrat, J.; Alkathlan, H.Z.; Al-Kedhairi, A.A. 2017. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express*. 7:1-11.
- Kim, E.; Sun-Young Kang, S.; Kim, Y.; Lee, Y.; Choi, N.; You, Y.; Kim, K. 2015. *Chamaecyparis obtusa* Essential Oil Inhibits Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Expression of Virulence Factors. *Journal of Medicinal Food*. 18:810-817.
- Kim, Y.G.; Lee J.H.; Gwon, G.; Kim, S.I.; Park, J.G.; Lee, J. 2016. Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157: H7. *Scientific Reports*. 6:36377-36388.
- Kifer, Domagoj,; MUŽINIĆ, Vedran.; KLARIĆ, M.S. 2016. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *The Journal Of Antibiotics*. 69:689-696.
- Knudsen, G. M.; Olsen, J. E.; Dons, L. 2004. Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 240:171–179.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *B. cereus* infections. *Microbes Infectious*. 2:189–198.
- Larsson D.J. 2014. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 369.
- Lee, K.H.; Kim, B.S.; Keum, K.S.; Yu, H.H.; Kim, Y.H.; Chang, B.S.; Ra, J.Y.; Moon,

- H.D.; Seo, B.R.; Choi, N.Y.; You, Y.O. 2011. Essential Oil of *Curcuma longa* Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Journal of Food Science*. 76:226-230.
- Lemon, K.P.; Higgins, D.E.; Kolter, R. 2007. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*. 189:4418-4424.
- Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.D.; Farias, N.M.P.; Souza, E.L. 2006. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16(2):197-201.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-408.
- Lopez-Valladares, G.; Tham, W.; Parihar, V.S.; Helmersson, S.; Andersson, B.; Ivarsson, S.; Johansson, C.; Ringberg, H.; Tjernberg, I., Henriquesnormark B., M.L. 2014. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958–2010). *Epidemiology & Infectious*. 142:2251–2260.
- Macedo, I.T.F.; Bevilaqua, C.M.L.; de Oliveira, L.M.B.; Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Vieira, L.S.; Oliveira, F.R.; Queiroz-Junior, E.M.; Tomé, A.R.; Nilberto R.F. Nascimento, N.R.F. 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. 173:93-98.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Jr, V.F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. 25(3):429-438.
- Maciel M.V.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.L.; Silva, R.A.; Barros, R.S.; Sousa, R.N.; Sousa, L.C.; Brito, E.S.; Souza-Neto, M.A. 2010. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*. 167:1–7.
- Maddocks, S. E.; Oyston, P.C.F. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. *Microbiology Society*. 12:3609-3623.
- Maria-Neto, S.; Almeida, K.C.; Macedo, M.L.R.; Franco, O.L. 2015. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1-11.
- Martins, R.M.; Cortez, L.E.R.; Felipe, D.F. 2008. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregando o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. *Revista Saúde e Pesquisa*, 1(3):259-263.
- Mazzari, A.L.D.A.; Prieto, J.M. 2014. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 5:1-12.
- Mcarthur, A.G.; Wright, G.D. 2015. Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology. *Current Opinion in Microbiology*. 27:45-50.
- Merghni, A.; Marzouki, H.; Hentati, H.; Aouni, M.; Mastouri, M. 2016. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Current Research In Translational Medicine*. 64:29-34.
- Mertz, D.; Frei, R.; Periat, N.; Zimmerli, M.; Battegay, M.; Fluckiger U. 2009. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Archives of Internal Medicine*. 26:172–178.
- Miller, W.R.; Murray, B.E.; Rice, L.B.; Arias, C.A. 2016. Vancomycin-Resistant Enterococci Therapeutic Challenges in the 21st Century. 30:415-439.
- Mohamed, A.; Huang, D.B. 2007. Biofilm formation by enterococci Jamal. *Journal of Medical Microbiology*. 56:1581-1588.

- Moreira R., Alejandra G Ponce, Carlos E Del valle and Sarai Roura. (2007) Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157:H7 in blanched spinach and minced cooked beef. *J. Food Processing and Preservation* 31(4): 379-391.
- Moura, T.M.; Campos, F.S.; Juliana, C.; Franco, A.C.; Roehe, P.M.; D'azevedo, P.A.; Frazzon, J.; Frazzon, A.P.G. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48:617-621.
- Nasaj, M.; Mousavi, S.M.; Hosseini, S.M.; Arabestani, M.R. 2016. Prevalence of Virulence Factors and Vancomycin-resistant Genes among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* Isolated from Clinical Specimens. *Iranian Journal of Public Health*. 45:806-813.
- Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*. 6:1451-1474.
- Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; Botta, L.; Filocamo, A.; Marino, A.; Bisignano, G. 2013. Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm. *Applied Microbiology And Biotechnology*. 97:9515-9523.
- Oliveira, F.B.M.; Lima, L.M.; Moura, M.E.B.M.; Nunes, B.M.V.T.; Oliveira, B.M. 2011. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. *Revista Interdisciplinar*, 4:72-77.
- Painter, J.; Slutsker, L. Listeriosis In Humans. 2007. In *Listeria*, listeriosis and food safety, 3RD ED.; CRC Press Book, FL, USA. 85–109.
- Pantanella, F.; Valenti, P.; Natalizi, T.; Passeri, D.; Berlutti, F. 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*. 25:31-42.
- Penesyan, A.; Gillings, M.; Paulsen, I.T. 2015 Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. *Molecules*. 20:5286-5298.
- Prematunge, C.; Macdougall, C.; Johnstone, J.; Adomako, K.; Lam, F.; Robertson, J. 2016. VRE and VSE bacteremia outcomes in the era of effective VRE therapy: a systematic review and meta-analysis. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 37:26–35.
- Ponce A. G., Fritz R., Delvalle C. E., and Roura S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard. *Lebensmittel-wissenschaft und technologie* 36: 679-684.
- Portnoy, D. A.; Chakraborty, T.; Goebel, W.; Cossart, P. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infection and Immunity*. 60:1263-1267.
- Raygada, L.J.; Levine, P.D. 2009. Managing CA-MRSA infections: current and emerging options. *Infections in Medicine*. 26.
- Rieu, A.; Weidmann, S.; Garmyn, D.; Piveteau, P.; Guzzo, J. 2007. agr System of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:6125-6133.
- Rocourt, J.; Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*; Doyle, M.P., Buechat, L.R., Montville, T.J., Eds.; American Society for Microbiology (ASM) Press: Washington, DC, USA. 337–352.

- Ruan, L.; Crickmore, N.; Peng, D.; Sun, M. 2015. Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? Trends in Microbiology. 23:341–346.
- Santestevan, N.A.; Zvoboda, D.A.; Prichula, J.; Pereira, R.I.; Wachholz, G.R.; Cardoso, L.A.; Moura, T.M.; Medeiros, A.W.; Amorin, D.B.; Tavares, M.; D’Azevedo, P.A.; Franco, A.C.; Frazzon, J.; Frazzon, A.P.G. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 31:1935-1946.
- Saslis-Lagoudakis, C.H.; Savolainen, V.; Williamson, E.M.; Forest, F.; Wagstaffe, S.J.; Baral, S.R.; Watson, M.F.; Pendry, C.A.; Hawkins, J.A. 2012. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. PNAS. 109:15835-15840.
- Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerging Infectious Diseases Journal. 17:7–15.
- Schechner, V.; Temkin, E.; Harbarth, S.; Carmeli, Y.; Schwaber, M.J. 2013. Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. Clinical Microbiology Reviews. 26:289–307.
- Schillaci, D.; Napoli, E.M.; Cusimano, M.G.; Vitale, M.; Ruberto, A. 2013. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Essential Oil Prevented Biofilm Formation and Showed Antibacterial Activity against Planktonic and Sessile Bacterial Cells. Journal Of Food Protection. 76:1747-1752.
- Schoeni, J.L.; Wong, A.C. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. Journal of Food Protection. 68:636–648.
- Scotti, M.; Monzó, H.J.; Lacharme-lora, L.; Lewis, D.A.; Vázquez-boland, J.A. 2007. The PrfA virulence regulon. Microbes Infectious. 9:1196–1200.
- Selim, S.A.; Adam, M.E.; Hassan, S.M.; Albalawi, A.R. 2014. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). BMC Complementary And Alternative Medicine. 14:14-21.
- Seneviratne, C.J.; Silva, W.J.; Jin, L.J.; Samaranayake, L.P. 2009. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. Archives of Oral Biology. 54:2260-2269.
- Silk, B.J.; Date, K.A.; Jackson, K.A.; Pouillot, R.; Holt, K.G.; Graves, L.M.; Ong, K.L.; Hurd, S.; Meyer, R.; Marcus, R. 2012. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (foodnet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. Clinical Infectious Diseases. 54:396–404.
- Simor, A.E. 2011. Staphylococcal decolonisation: an effective strategy for prevention of infection? Lancet Infectious Diseases. 11:952–962.
- Smith, R.A.; M’ikanatha, N.M.; Read, A.F. 2015. Antibiotic resistance: a primer and call to action. Health Communication. 30:309-314.
- Singh, K.V.; Nallapareddy, S.R.; Sillanpää, J.; Murray, B.E. 2010. Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against *Enterococcus faecalis*. Experimental Endocarditis. Plos Pathogens. 6:1-13.
- Snoussi, M.; Noumi, E.; Trabelsi, N.; Flamini, G.; Papetti, A.; De Feo, V. 2015. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and

- Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*. 20:14402-14424.
- Spallberg, B.; Guidos, R.; Gilbert, D.; Bradley, J.; Boucher, H.W.; Scheld, W.M.; Bartlett, J.G.; Edwards, J.; 2008. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Disease*, 46:155-164.
- Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40:175-179.
- Sudheer Y.; Kamalesh, B.; Siddharth, S.; Indra, G.; Swetha, R.K. 2015. *Quorum sensing* inhibition, relevance to periodontics. *Journal of International Oral Health*. 7:67–69.
- Suo, Y.; Huang, Y.; Liu, Y.; Shi, C.; Shi, X. 2012. The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. *PLoS one*. 7.
- Suo, Y.; Liu, Y.; Zhou, X.; Huang, Y.; Shi, C.; Matthews, K.; Shi, X. 2014. Impact of *Sod* on the Expression of Stress-Related Genes in *Listeria monocytogenes* 4b G with/without Paraquat Treatment. *Journal of Food Science*. 79:1745-1749.
- Swamy, M.K.; Akhtar, M.S.; Sinniah, U.R. 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. 2016:1-21.
- Troxel, B.; Hassan, H.M. 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*. 3:1-13.
- Tyagi, A.K.; Bukvicki, D.; Gottardi, D.; Tabanelli, G.; Montanari, C.; Malik, A.; Guerzoni, M.E. 2014. *Eucalyptus* Essential Oil as a Natural Food Preservative: In Vivo and In Vitro Antiyeast Potential. *BioMed Research International*. 7:1-9.
- Veiga Júnior, V.F. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2):308-313.
- Verhoeven, P.O.; Gagnaire, J.; Botelho-Nevers, E.; Grattard, F.; Carricajo, A.; Lucht, F. 2014. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 12:75–89.
- Vitti, A.M.S.; Brito, J.O. 2003. Óleo essencial de Eucalipto. IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais Documentos Florestais. 17:1–26.
- Vratnica, B.D.; Đakov, T.; Šuković, D.; Damjanović, J. 2011. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*. 29:277-284.
- Vuonga, Q.V.; Chalmersb, A.C.; Bhuyana, D.J.; Bowyera, M.C.; Scarlett, C.J. 2015. Botanical, Phytochemical, and Anticancer Properties of the Eucalyptus Species. 12:907-924.
- Xu, Z.; Li, L.; Shirliff, M.E.; Peters, B.M.; Li, B.; Peng, Y.; Alam, M.J.; Yamasaki, S.; Shi, L. 2011. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001-2006. *Clinical Microbiology and Infection*. 17:714-718.
- Xu, Z.; Li, L.; Chu, J.; Peters, B.M.; Harris, M.L.; Li, B.; Shi, L.; Shirliff, M.E. 2012. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays

- on rapid detection of various types of staphylococci strains. *Food Research International*. 47:166-173.
- Walsh, S.E.; Maillard, J.Y.; Russell, A.D.; Catrenich, C.E.; Charbonneau, D.L.; Bartolo, R.G. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94:240-247.
- Wertheim, H.F.; Melles, D.C.; Vos, M.C.; Van, L.W.; Van, B.A.; Verbrugh, H.A. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*. 5:751–762.
- Webert, H.; Freibert, S.; Gallo, A.; Heidenreich, T.; Linne, U.; Amlacher, S.; Hurt, E.; Mühlhoff, U.; Banci, L.; Lill, R. 2014 Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on *Iso1* reveals the involvement of ferredoxin. *Nature Communications*. 5:1-12.
- Williams, T.; Joseph, B.; Beier, D.; Goebel, W.; Kuhn, M. 2005. Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* regulates the expression of flagella-specific genes. *FEMS Microbiology Letters*. 252:287-298.
- Whitchurch, C.B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P.C.; Mattick, J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295.
- WHO. 2000. Traditional medicine, growing needs and potential. WHO Policy Perspectives on Medicines. 21:1-6.
- WHO. 2004. Anonymous, Microbiological Risk Assessment Series, No. 5, Technical Report, Rome.
- Yang, C.; Hu, D.H.; Feng, Y. 2015. Essential oil of *Artemisia vestita* exhibits potent in vitro and in vivo antibacterial activity: Investigation of the effect of oil on biofilm formation, leakage of potassium ions and survival curve measurement. *Molecular Medicine Reports*. 4:5762-5770.
- Zafrilla, B.; Martínez-Espinosa, R.M.; Esclapez, J.; Pérez-Pomares, F.; Bonete, M.J. 2010. SufS protein from *Haloferax volcanii* involved in Fe-S cluster assembly in haloarchaea *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804:1476-1482.
- Zhao, H.; Li, W.; Zhao, X.; Li, X.; Yang, D.; Ren, H.; Zhou, Y. 2016. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) response to crude oil exposure in the polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Environmental Science and Pollution Research*. 24:616-627.

Livros:

- Adams R.P. 2005. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 469 p.
- DebRoy, S.; Gao, P.; Garsin, D.A.; Harvey, B.R.; Kos, V.; Nes, I.F.; Solheim, M. 2014. **Transcriptional and Post Transcriptional Control of Enterococcal Gene Regulation**. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet].
- Kristich, C.J.; Rice, L.B.; Arias, C.A. 2014. **Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance**. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet].
- Ferro, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, SP: Atheneu, 2006. Cap. 3.

Dissertações e Teses:

Machado SMO. 2005. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis.** Dissertação. (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Internet:

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC 14, de 31 de Março de 2010. Estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos.** 2010. ed A.N.d.V. Sanitária (Brasília: Brazilian Surveillance Agency). Disponível em: <<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

CDC - Center for Disease Control. **Antibiotic resistance threats in the United States, United States Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.** 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>>. Acesso em: 03 nov. 2016.