

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Heterothalamus* sp. SOBRE
*Enterococcus faecalis***

MATEUS DE OLIVEIRA NEGREIROS

Bacharel em Ciências Biológicas

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril de 2014

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Heterothalamus* sp. SOBRE
*Enterococcus faecalis***

MATEUS DE OLIVEIRA NEGREIROS

Bacharel em Ciências Biológicas

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos requisitos
para a obtenção do Grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente

**Orientador(a): Ana Paula Guedes Frazzon
Co-orientador(a): Amanda de Souza Motta
Colaborador: Geraldo Luiz Gonçalves Soares**

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Rose e Luiz, por todo apoio e esforço dedicado a minha educação desde o começo, principalmente pelos momentos difíceis e de sacrifício. Se não fosse essa força, com certeza a minha vida teria tomado um rumo diferente. Obrigado a minha irmã, Daiane, por me servir de exemplo e me estimular a continuar estudando, e a minha namorada, Mariana – já parte da nossa família – por toda compreensão, cumplicidade, carinho, amor e pelos momentos felizes pelos quais passamos e ainda iremos passar.

Agradeço a minha orientadora, Prof. Ana Paula Guedes Frazzon, não apenas pelos momentos de discussão sobre o trabalho ou sobre questões científicas, mas também pelos momentos alegres, descontraídos, os quais ela mais parecia minha colega de laboratório do que minha orientadora. Essas situações tornaram todo o processo mais fácil e divertido. Agradeço também a minha co-orientadora, Prof. Amanda de Souza Motta, por sempre estar disponível para esclarecer dúvidas, dar sugestões e me ajudar com pontos importantes do trabalho.

Agradeço ao Prof. Geraldo Luiz Gonçalves Soares, nosso colaborador, por aceitar a ideia do projeto e sempre ter estado disposto a ajudar da melhor maneira possível. Assim como a ele, muito obrigado a Ângela, a Diana e a Anne, por ajudarem nos procedimentos de coleta e análises cromatográficas dos óleos essenciais, assim como a disponibilização desses compostos para o desenvolvimento do meu trabalho. Em especial, agradeço a Ângela por todo o tempo gasto me ensinando a analisar a composição dos óleos essenciais.

Muito obrigado aos meus colegas de microbiologia, principalmente do laboratório 164 e 209, em especial aqueles que me ajudaram de alguma forma, como a Jaqueline, a Juliane, a Tiane e a Tiele. Também agradeço aos colegas de outros laboratórios que também me auxiliaram em algumas análises, como a Janira, a Talita, a Fernanda e o Prof. Alexandre Fuentesfria.

Agradeço aos meus colegas de herbário, os quais contribuíram para deixar o meu dia-a-dia mais alegre, com um ambiente de trabalho divertido e produtivo. Obrigado a minha chefe, Prof. Mara Rejane Ritter, por todo o apoio e compreensão nesse período.

Por fim, agradeço a UFRGS, aos Departamentos de Microbiologia, Botânica, Química e ao Centro de Microscopia Eletrônica, pela estrutura, bolsistas, técnicos, professores, e também ao CNPq pelos recursos financeiros para a realização dessa pesquisa.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Heterothalamus* sp. SOBRE *Enterococcus faecalis*¹

Autor: Mateus de Oliveira Negreiros
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon
Co-orientadora: Amanda de Souza Motta
Colaborador: Geraldo Luiz Gonçalves Soares

RESUMO

Óleos essenciais são produtos naturais produzidos no metabolismo secundário de certos vegetais, com propriedades, entre outras, de defesa contra agentes nocivos. No sul do Brasil, destacam-se duas espécies da família Asteraceae, *Heterothalamus alienus* e *Heterothalamus psiadioides*, cujas substâncias bioativas ainda são pouco estudadas quanto as suas propriedades. O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana desses óleos essenciais e a atividade antibiofilme do óleo essencial de *H. psiadioides*. Os óleos foram obtidos a partir da hidrodestilação das folhas e caracterizados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. O espectro de ação foi avaliado contra bactérias e fungos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para cocos Gram-positivos resistentes a agentes antimicrobianos, como *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ERV), e a ação antibiofilme foi avaliada tanto pela interferência dos componentes dos óleos sobre a aderência microbiana quanto por sua ação sobre biofilme estabelecido. Os óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. são constituídos por compostos terpênicos, sendo o β -pineno o componente majoritário. Ambos foram eficazes contra as bactérias Gram-positivas e fungos avaliados, porém não inibiram as bactérias Gram-negativas. A CIM variou entre 4 – 16%, sendo que isolados ERV foram também inibidos. A ação do óleo essencial de *H. psiadioides* diminuiu a aderência microbiana e, em menor escala, causou disrupção do biofilme pré-formado; no entanto, não foi verificada completa inibição do biofilme. Os resultados fornecem informações importantes sobre de ação antimicrobiana desses óleos essenciais e indicam o uso potencial dessas espécies como medicinais.

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. (88 p.) Abril, 2014.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF *Heterothalamus* sp. ESSENTIAL OILS AGAINST *Enterococcus faecalis*²

Author: Mateus de Oliveira Negreiros
Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon
Co-supervisor: Amanda de Souza Motta
Collaborator: Geraldo Luiz Gonçalves Soares

ABSTRACT

Essential oils are natural substances produced on secondary metabolism of some plants, with properties, among others, of defense against harmful agents. In southern Brazil, *Heterothalamus alienus* and *Heterothalamus psiadioides* (Asteraceae) are recognized by bioactive substances that are still little studied by their properties. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils from *Heterothalamus* sp. and the antibiofilm action of *H. psiadioides* essential oils. The oils were obtained from the hydrodistillation of the leaves and characterized by gas chromatography coupled mass spectrometry. The spectrum of action was determinate against bacteria and fungi. The minimal inhibitory concentration (MIC) was evaluated for Gram-positive cocci with antimicrobial resistance, as vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) and the antibiofilm action was assessed both by interference of the components of the oils on microbial adherence and by its action on established biofilm. The essential oils consist in terpene compounds, and the β -pinene was the major component. The essential oils were effective against Gram-positive bacteria and fungi, but did not inhibit Gram-negative bacteria. The MIC range 4 to 16% and the VRE isolates were also inhibit. The action of essential oils reduced microbial adherence and disrupted de pre-formed biofilm. However, the biofilm was not completely inhibited. These findings provide important information about the antimicrobial activity of these essential oils and indicated the potential use of this species as medicinal.

²Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (88 p.) April, 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Plantas medicinais	4
2.1.1 Produtos naturais de origem vegetal	6
2.1.2 Óleos essenciais e atividade antimicrobiana	7
2.2 A Família Asteraceae	9
2.2.1 O Gênero <i>Heterothalamus</i>	10
2.3 Agentes antimicrobianos e resistência microbiana	13
2.4 Microrganismos de importância clínica	16
2.5 O Gênero <i>Enterococcus</i>	17
2.5.1 Fatores de virulência	22
2.6 Biofilmes	23
2.6.1 A formação do biofilme	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Coleta e caracterização química dos óleos essenciais de <i>Heterothalamus</i> sp.	28
3.2 Óleos essenciais e timol	30
3.3 Microrganismos e condições de cultivo	31
3.4 <i>Screening</i> inicial da atividade antimicrobiana	33
3.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima	34
3.5.1 Diluição em Agar do óleo essencial de <i>H. psiadioides</i>	34
3.5.2 Microdiluição em Caldo do óleo essencial de <i>H. psiadioides</i>	35
3.6 Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais de <i>H. psiadioides</i>	36
3.6.1 Inibição da formação de biofilme	37
3.6.2 Erradicação do biofilme formado por 24 h	37
3.6.3 Ensaio Cristal Violeta e atividade metabólica dos biofilmes	38
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura	39

3.8	Análise Estatística	40
4.	RESULTADOS	41
4.1	Perfil químico dos óleos essenciais	41
4.2	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Heterothalamus</i>	46
4.3	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima	49
4.4	Avaliação da atividade antibiofilme	51
4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	59
5.	DISCUSSÃO	61
5.1	Composição química dos óleos essenciais.....	61
5.2	Avaliação da atividade antimicrobiana	62
5.3	Avaliação da atividade antibiofilme	68
6.	CONCLUSÕES	75
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Microrganismos padrão e isolados (origem) de <i>E. faecalis</i> resistentes a antimicrobianos utilizados no estudo.	32
TABELA 2	Composição química dos óleos essenciais de <i>H. psiadioides</i>	42
TABELA 3	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>H. alienus</i> e <i>H. psiadioides</i> pela técnica de Disco-difusão.	46
TABELA 4	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>H. alienus</i> e <i>H. psiadioides</i> pela técnica de Disco-difusão para os isolados de <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes a antibióticos.....	47
TABELA 5	Valores de concentração inibitória mínima (%) para os óleos essenciais de <i>H. psiadioides</i> (OHP1) e o para o timol sobre <i>E. faecalis</i> e <i>S. epidermidis</i>	50
TABELA 6	Porcentagem de inibição do biofilme de <i>E. faecalis</i> e <i>S. epidermidis</i> sob a ação do óleo essencial de <i>H. psiadioides</i> (OHP1) e do timol.....	54
TABELA 7	Porcentagem de erradicação do biofilme de <i>E. faecalis</i> e <i>S. epidermidis</i> sob a ação do óleo essencial de <i>H. psiadioides</i> (OHP2) e do timol por 2 h.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química de produtos naturais antimicrobianos de plantas (modificado de Cowan, 1999).....	6
FIGURA 2	Estrutura química dos monoterpênicos fenólicos Carvacrol e do Timol (modificado de Bakkali, 2008).....	9
FIGURA 3	<i>Heterothalamus alienus</i> (A e B) e <i>Heterothalamus psiadioides</i> (C e D)*	11
FIGURA 4	Estrutura química dos monoterpênicos bicíclicos α -pineno e do β -pineno (Modificado de Bakkali et al., 2008).	12
FIGURA 5	Exemplos de como a resistência a antibióticos se dissemina (CDC, 2013).....	14
FIGURA 6	Principais mecanismos de resistência a antibióticos em <i>Enterococcus</i> (Adaptado de Arias & Murray, 2012).	19
FIGURA 7	Etapas da formação de um biofilme.	26
FIGURA 8	Halo de inibição formado pela ação dos óleos essenciais de <i>H. alienus</i> (A) e <i>H. psiadioides</i> (B) sobre <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	48
FIGURA 9	Ausência de halo de inibição pela ação dos óleos essenciais de <i>H. alienus</i> (A) e <i>H. psiadioides</i> (B) sobre <i>Pseudomonas</i> sp.	48
FIGURA 10	Halo de inibição formado pelos óleos essenciais de <i>H. alienus</i> (A) e <i>H. psiadioides</i> (B) sobre <i>Candida krusei</i> 6258.....	49
FIGURA 11	Halo de inibição formado pelos óleos essenciais de <i>H. alienus</i> (A) e sua ausência <i>H. psiadioides</i> (B) sobre <i>Trichophyton rubrum</i> 42.....	49
FIGURA 12	Determinação da concentração inibitória mínima de OHP1 para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 na técnica de Diluição em Agar.	52
FIGURA 13	Determinação da concentração inibitória mínima de timol para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 na técnica de Diluição em Agar.	53
FIGURA 14	Avaliação da atividade metabólica pela técnica de MTT simultaneamente ao teste de inibição de formação de biofilme para o OHP1. Para um mesmo microrganismo letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$). ND = não determinado.....	57

FIGURA 15	Avaliação da atividade metabólica pela técnica de MTT simultaneamente ao teste de inibição de biofilme para o timol. Para um mesmo microrganismo letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$). ND = Não determinado.....	58
FIGURA 16	Avaliação da atividade metabólica pela técnica de MTT simultaneamente ao teste de erradicação de biofilme. Para um mesmo microrganismo e composto, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle positivo (C+).....	59
FIGURA 17	Imagens do MEV para biofilmes de <i>E. faecalis</i> isolado C10 formado em: Superfície de aço inox - (a) e (b) controle positivo; (c) e (d) CIM OHP2. Superfície de poliestireno – (e) e (f) controle positivo; (g) e (h) CIM OHP2.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

α – Alfa

β – Beta

% - porcentagem

> - maior

ANOVA – Análise de Variância

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS – substância de agregação

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAC - Bacitracina

BHI – Caldo Infusão de Cérebro e Coração ou *Brain Heart Infusion*

C+- controle positivo

C - átomo de carbono

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CDC – *Centre for Disease Control and Prevention*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP - Ciprofloxacina

CLO – Cloranfenicol

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

cm – centímetro

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*

EPS - Exopolissacarídeo

ERI – Eritromicina

ERV – *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina

EST - Estreptomicina

Fr – Fraco formador de Biofilme

Ft – Forte formador de Biofilme

GC-MS – Cromatografia Gasosa associada a Espectro de Massas

GC-FID - Cromatografia Gasosa com detector de ionização em chama

GEN - Gentamicina

h – Hora

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ICN – Instituto de Ciências Naturais

IRTL – Índice de retenção em temperatura linear

LEQTAX - Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia

m – metro

Md – Moderado formador de Biofilme

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Min. - minutos
mL – Mililitro
mm – Milímetro
MTT - 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaCl – Cloreto de sódio
ND - não determinado
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
nm – Nanômetro
NORF - Norfloxacina
OD – Densidade Óptica
OHA – Óleo essencial da espécie *Heterothalamus alienus*
OHP – Óleo essencial da espécie *Heterothalamus psiadioides*
P.A. – puro
PBS – Tampão fosfato-salino
RS – Rio Grande do Sul
TET - Tetraciclina
TSB – Caldo Triptona de Soja ou *Trypticase Soy Broth*
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
 μ L – Microlitro
 μ m – micrometro
v/v – volume/volume
VAN - Vancomicina

1. INTRODUÇÃO

No atual cenário mundial, o aumento na frequência de microrganismos patogênicos resistentes a substâncias antimicrobianas tem sido considerado um grande problema de Saúde Pública. Só nos Estados Unidos da América, a cada ano cerca de dois milhões de pessoas adquirem infecções graves por bactérias que são resistentes a um ou mais antibióticos, sendo que aproximadamente 23 mil pacientes morrem em resultado direto dessas infecções (CDC, 2013). Na Europa, no ano de 2007, as estimativas indicam que mais de 25 mil pessoas faleceram decorrentes de infecções causadas por bactérias resistentes (ECDC, 2009). Diversos microrganismos resistentes já foram isolados a partir de amostras clínicas, alimentares e do ambiente, inclusive no Brasil. Entre esses microrganismos encontram-se *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Candida* sp., entre outros (Andrade et al., 2003; Sherley, 2004; Oteo et al., 2005; Nostro et al., 2007; Gomes et al., 2008; Riboldi et al., 2009; Cavalcanti et al., 2011).

Os membros do gênero *Enterococcus* destacam-se por serem proeminentes patógenos oportunistas responsáveis por grande parte das infecções relacionadas à assistência à saúde nas últimas décadas. Além de naturalmente resistentes a uma gama de antimicrobianos, eles possuem a

capacidade de adquirir genes de resistência a antibióticos como tetraciclina e vancomicina (Murray, 1990; Kayzer, 2003). Outro fator relevante é a capacidade dos enterococos agregarem-se em biofilmes, que são formados por uma população de células irreversivelmente aderida a uma superfície, tornando-se difíceis de erradicar e fontes de muitas infecções crônicas (Mohamed & Huang, 2007), sendo encontrados em ambientes de processos industriais como prospecção de petróleo, processamento de alimentos, e em campos relacionados à saúde (Van Houdt & Michiels, 2010).

Apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas, poucos antibióticos novos foram descobertos nos últimos anos. Na atual situação, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas (Duarte, 2006). Ainda hoje nas regiões mais pobres do Brasil e até mesmo nas grandes cidades, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, despertando o interesse de pesquisadores de diversas áreas (Maciel et al., 2002). Diversos vegetais têm sido utilizados com fins profiláticos e curativos de infecções, os quais muitos são alvos de trabalhos em busca de novos compostos com atividade antimicrobiana (Michelin et al., 2005).

Uma abordagem interessante é a utilização de óleos essenciais, compostos que tem se mostrado como agentes potenciais no tratamento de infecções. Em especial, destacam-se os metabólitos da família Asteraceae,

cujas espécies são extensivamente estudadas quanto à composição química e atividade biológica de seus compostos, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Verdi et al., 2005). No Sul do Brasil, *Heterothalamus alienus* (Sprengel) O. Kuntze e *Heterothalamus psiadioides* Less. são utilizadas como plantas medicinais pela população (Pacciaroni et al., 2008; Schmidt-Silva et al., 2011), entretanto não existem estudos quanto à atividade antimicrobiana e antibiofilme dos seus óleos essenciais.

1.1 Objetivo geral

Verificar a atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* do óleo essencial de *Heterothalamus* sp.

1.2 Objetivos específicos

a) Determinar a composição química do óleo essencial de *Heterothalamus psiadioides*;

b) Avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* sobre bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos;

c) Verificar a ação antimicrobiana desses óleos essenciais sobre isolados resistentes a antimicrobianos;

d) Determinar a concentração mínima inibitória do óleo essencial de *H. psiadioides* e do timol sobre isolados resistentes a antimicrobianos;

e) Avaliar a ação antibiofilme do óleo essencial de *H. psiadioides* e do timol sobre microrganismos Gram-positivos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

Muito antes que a humanidade descobrisse a existência dos microrganismos, a ideia de que certas plantas tinham potencial de cura - que continham de fato o que atualmente é caracterizado como propriedades antimicrobianas - era bem aceita (Ríos & Recio, 2005). Registros de antigas civilizações, entre elas a Mesopotâmica e a Egípcia, mostram a utilização de plantas associadas à cura de males, variando de tosse a infecções parasitárias e inflamações. Ainda hoje, a vasta maioria das pessoas ainda utiliza a chamada medicina tradicional (plantas medicinais e outros materiais) para tratar de problemas relacionados à saúde (Gurib-Fakim, 2006).

Hoje, estudos com plantas medicinais são caracterizados dentro da Etnobotânica, ciência que investiga as relações entre as diversas culturas humanas e a flora ao seu entorno (Prance, 1987). Essa disciplina dedica-se basicamente ao conhecimento empírico de populações indígenas a respeito de substâncias medicinais, seus benefícios e seus riscos potenciais a saúde (Gurib-Fakim, 2006). Atualmente, de todos os produtos farmacêuticos de origem vegetal disponíveis, apenas um quarto a um meio são destinados a uso como antimicrobianos, uma vez que temos contado com produtos de bactérias e fungos para essa finalidade. Desde o advento dos antibióticos na década de

1950, o uso de antimicrobianos derivados de plantas foi virtualmente inexistente (Cowan, 1999).

Entre as centenas de milhares de plantas existentes, apenas uma fração tem sido investigada em laboratório. Essa falta de conhecimento é particularmente grave nos trópicos, regiões que concentram cerca de 50 % das espécies de angiospermas. O Brasil, que possui em torno de 55.000 espécies de plantas descritas, tem dados reportados de apenas 0,4 % de sua flora (Gurib-Fakim, 2006).

Newman & Cragg (2012) deram uma importante contribuição nessa questão. Em uma análise de novas drogas aprovadas entre os anos de 1981 e 2010, os autores verificaram que há um declínio na descoberta de novos compostos naturais (sem modificações sintéticas em laboratórios) em virtude de novas técnicas que permitem a alteração de compostos já utilizados. A necessidade de novos fármacos, por sua vez, exige uma vigorosa exploração de fontes naturais – sejam plantas, organismos marinhos ou microrganismos – pois essas podem oferecer compostos com diversidade estrutural e especificidade biológica diferentes das drogas atualmente utilizadas (Cragg & Newman, 2013).

Logo, o Brasil constitui-se em um imenso potencial ainda inexplorado, no qual pesquisas sobre compostos naturais possivelmente trarão contribuições importantes para a medicina.

2.1.1 Produtos naturais de origem vegetal

As plantas possuem habilidade imensa para sintetizar substâncias aromáticas, sendo a maioria delas metabólitos secundários. Entre as diversas funções que os metabólitos desempenham na planta, encontram-se: defesa contra patógenos (alcaloides, derivados fenólicos, flavonoides e terpenos); proporcionar fragrância (terpenos); e fornecer pigmentação (taninos e quinonas) (Cowan, 1999; Okunade et al., 2004). Na Figura 1 são mostradas fórmulas de algumas dessas substâncias:

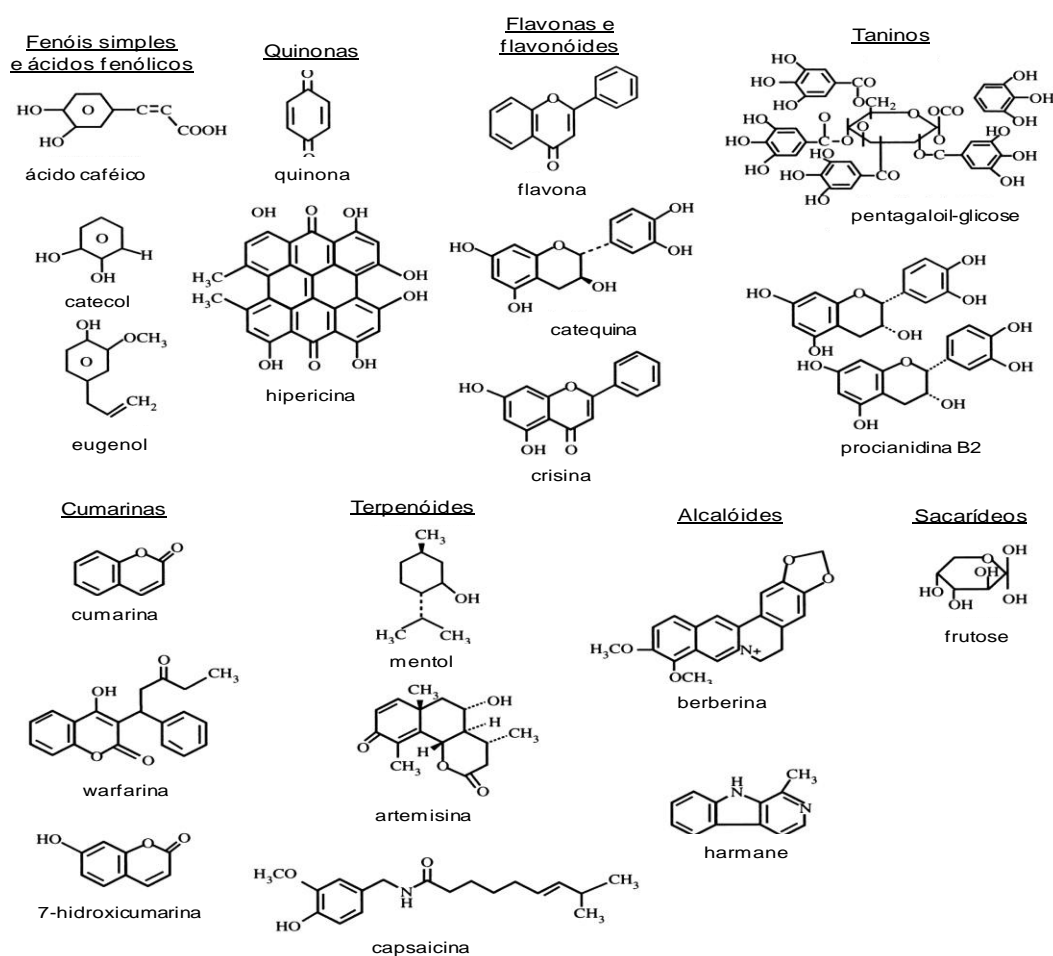


Figura 1: Estrutura química de produtos naturais antimicrobianos de plantas (modificado de Cowan, 1999)

2.1.2 Óleos essenciais e atividade antimicrobiana

Óleos essenciais são produtos naturais, complexos e voláteis caracterizados pelo forte odor e formados por plantas aromáticas. Podem ser sintetizados em diferentes órgãos vegetais, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenadas em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Desempenham papel na proteção das plantas contra microrganismos e herbívoros, podendo também atrair insetos polinizadores e dispersores de sementes. Por suas propriedades antissépticas, medicinais e por sua fragrância, são utilizados para preservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmódicos e anestésicos locais (Bakkali et al., 2008).

O método mais comum de extração dos óleos essenciais é destilação por arraste com vapor de água, mas outros métodos podem ser utilizados dependendo da finalidade (Burt, 2004). O produto extraído também pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com as condições climáticas, composição do solo, órgão vegetal e idade da planta. Masotti et al. (2003) verificaram que a composição do óleo essencial de *Artemisia molinieri* (Asteraceae) variou entre plantas no mesmo estado fenológico (por exemplo, no estado vegetativo) coletadas na primavera, no verão e no outono. No entanto, a composição dos óleos essenciais foi similar em plantas em diferentes estados fenológicos coletadas no mesmo período do ano. Logo, para se obter óleos essenciais de composição constante, eles devem ser extraídos nas mesmas condições a partir do mesmo órgão coletado

no mesmo período e sobre as mesmas condições climáticas. Uma das formas de verificar a composição é por análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Bakkali et al., 2008).

Óleos essenciais são assim denominados devido à composição de substâncias lipofílicas que se apresentam quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras (Siani et al., 2000). Constituem-se em uma mistura de componentes em diferentes concentrações, sendo geralmente dois ou três majoritários (de 20 a 70%) em comparação com outros componentes em teores traço (Bakkali et al., 2008). Entre os seus constituintes, os terpenos destacam-se como o maior grupo de metabólitos secundários em plantas, com ampla atividade biológica, incluindo defesa química e alelopatia (Ding et al., 2010). Os terpenos de óleos essenciais ocorrem como monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}) relativamente pouco polares, pois o aumento de grupos polares reduz a sua volatilidade. Quando contém elementos adicionais - geralmente o oxigênio - são denominados terpenóides. O mecanismo de ação antimicrobiana dos terpenos ainda não é completamente conhecido, mas especula-se que envolva disrupção da membrana plasmática pelos seus compostos lipofílicos (Cowan, 1999).

Estudos realizados com óleos essenciais e seus componentes isolados mostram atividade antibacteriana (Kim et al., 1995; Burt & Reinders, 2003; Fisher & Phillips, 2006; Cândido et al., 2010; Jadhav et al., 2013), antifúngica (Moreira et al., 2007; Paccianori et al., 2008; Cavalcanti et al., 2011), antiprotozoário (Machado et al., 2010; Pérez et al., 2012) e antiviral (Min et al., 2013; Dunkic et al., 2013). Além disso, outros trabalhos mostram

atividade antibiofilme contra bactérias e fungos (Nostro et al., 2007; Sandasi et al., 2008; Grumezescu et al., 2012; Palmeira-de-Oliveira et al., 2012).

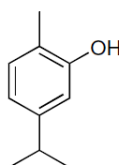
Por exemplo, o óleo essencial de espécies de orégano e seus componentes majoritários, timol (2-*isopropil*-5-metil-fenol) e carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol) (Figura 2) são bem documentados na literatura por sua atividade antimicrobiana. Esses compostos possuem amplo espectro de ação (Dorman & Deans, 2000) e atividade antibiofilme (Nostro et al., 2007; Bilge Oral., 2010). Segundo Lambert et al. (2001), esses compostos agem danificando a integridade membrana plasmática, afetando o pH e o equilíbrio iônico do citoplasma.

1. Terpenos

- Monoterpenos

Fenol

Carvacrol



Timol

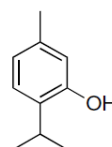


Figura 2: Estrutura química dos monoterpênicos fenólicos Carvacrol e do Timol (modificado de Bakkali, 2008).

2.2 A Família Asteraceae

Com um número estimado de 25.000 espécies, Asteraceae é considerada uma das maiores famílias de plantas floríferas do mundo (Funk et al., 2009). São plantas de hábito extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos, e raramente árvores (Heywood,

1993). Considera-se que Asteraceae é dos táxons angiospérmicos com maior sucesso na produção de metabólitos secundários que agem na defesa química. Suas espécies são extensivamente estudadas quanto à composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Verdi et al., 2005). Destacam-se estudos sobre características citotóxicas e alelopáticas (Dias et al., 2009; Schmidt-Silva et al., 2011).

As espécies dessa família estão entre as mais utilizadas pela população como medicinais, inclusive no estado do Rio Grande do Sul (Ritter et al., 2002; Vedruscolo & Mentz, 2006; Battisti et al., 2013). Por exemplo, *Artemisia absintum* L. (nome popular: losna) é conhecida por suas funções digestivas, enquanto *Baccharis trimera* (Less.) DC. (nome popular: carqueja) são empregadas na forma de infusão para tratar problemas digestivos, estomacais, hepáticos, diabetes, gripe e resfriado, entre outros (Verdi et al., 2005; Losqui et al., 2009).

2.2.1 O Gênero *Heterothalamus*

O gênero é composto por três espécies, *Heterothalamus alienus* (Spreng) O. Kuntze, *H. psiadioides* Less. e *H. rupestris* Deble, A.S. Oliveira & Marchiori, as quais são arbustos de mais ou menos 0,30 – 2 m de altura ocorrendo em solos rasos e frequentemente em beira de estradas (Barroso & Bueno, 2002; Pacciaroni et al., 2008).

Heterothalamus alienus (Figuras 3A e 3B) é nativa no Sul do Brasil, Uruguai e Argentina e é conhecida popularmente como “alecrim-do-campo”.

Suas folhas têm sido usadas interna e externamente contra febre e como estimulante (Rücker et al., 1996). Também possui atividade contra pestes de *Apis mellifera* L. (Ruffinengo et al., 2006) e antifúngica (Pacciaroni et al., 2008).

Heterothalamus psiadioides (Figuras 3C e 3D) ocorre no sul do Brasil e no Uruguai e tem como nome popular “alecrim-do-campo”, “vassoura” ou “erva formiga”. Na medicina popular, é utilizada como antipirético, antídoto para picadas de cobras e antiinflamatório (Suyenaga et al., 2004).

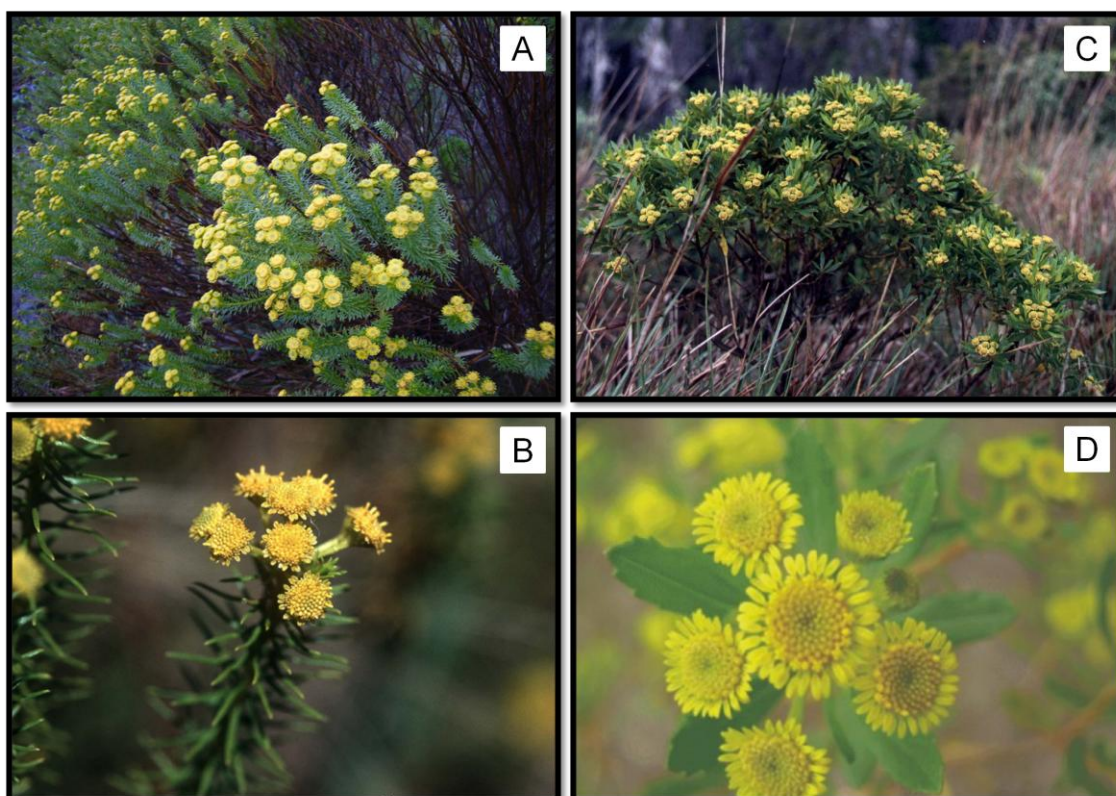


Figura 3: *Heterothalamus alienus* (A e B) e *Heterothalamus psiadioides* (C e D)*.

Fonte: (A) <http://calphotos.berkeley.edu/cqj>; (B) e (C) <http://sites.google.com/site/asteraceaegroup>; (D) <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars>

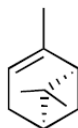
Estudos prévios demonstraram que o composto majoritário do óleo essencial de *H. alienus* e *H. psiadioides* é o β -pineno (Duschatzky et al., 2007,

Schmidt-Silva, 2012). Os monoterpenos bíciclicos α -pineno e β -pineno (Figura 4) estão entre os monoterpenos mais amplamente distribuídos em espécies de plantas e são os componentes majoritários em vários óleos essenciais.

1. Terpenos

- Monoterpenos

Alfa-pineno



Beta-pineno

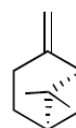


Figura 4: Estrutura química dos monoterpenos bíciclicos α -pineno e do β -pineno (Modificado de Bakkali et al., 2008).

Heterothalamus psiadioides está se tornando pioneira em regiões de Porto Alegre, RS, onde a pressão antrópica (imposta ao ambiente pelas condições socioeconômicas da colonização humana) existe, formando associações de indivíduos dessa espécie. Um dos mecanismos pelo qual *H. psiadioides* pode estar se tornando uma espécie dominante é a Alelopatia (Schmidt-Silva et al., 2011), processo que envolve principalmente metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influenciem no crescimento de sistemas biológicos tanto com efeitos positivos quanto negativos (Pinto et al., 2002).

Por essas razões, Schmidt-Silva et. al. (2011) avaliaram a citotoxicidade dos óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* sobre o meristema apical de raízes das plântulas de alface e cebola. Foi verificado que a ação desses óleos essenciais pode levar a efeitos mitóticos adversos, provavelmente relacionados à redução do comprimento da raiz em função da diminuição do índice mitótico de suas células meristemáticas e bloqueio do ciclo celular na fase metáfase-anáfase. Além disso, também foram relatadas anormalidades cromossômicas, como aderência cromossômica, c-mitose (completa inativação do eixo mitótico celular) e formação de micronúcleo (fragmento de cromossomo não incorporado ao núcleo principal). Esses resultados permitem inferir se tais óleos essenciais podem agir da mesma forma sobre a divisão celular de microrganismos eucarióticos e procariotos.

2.3 Agentes antimicrobianos e resistência microbiana

Antibióticos são importantes no controle de doenças infecciosas, inibindo ou eliminando bactérias por interrupção de uma ou mais de suas funções celulares essenciais. Entre seus modos de ação estão: a) inibição da produção de proteínas e componentes da parede celular; b) inibição da replicação do DNA; e c) ruptura das atividades da membrana celular que mantém o equilíbrio químico. Dependendo das suas características, cada grupo de bactérias (Gram-positivas ou Gram-negativas) é usualmente susceptível a apenas um grupo limitado de antimicrobianos e apresenta resistência inerente a ação de outros (ECDC, 2009).

O uso abusivo e de forma errônea dos antibióticos são os fatores que desencadeiam seleção de cepas de resistência ao redor do mundo. Além de serem as drogas mais comumente prescritas na medicina humana, cerca de 50% dos antibióticos prescritos não são necessários ou não são plenamente eficazes naquela situação. Antibióticos também são utilizados em animais de produção para prevenir, controlar, tratar doenças e promover o crescimento. A outra grande causa do aumento do número de bactérias resistentes a antibióticos é a sua dispersão de pessoa para pessoa, ou a partir de fontes não humanas no ambiente, incluindo alimentos (CDC, 2013). A Figura 5 ilustra as principais vias de transmissão de microrganismos resistentes.

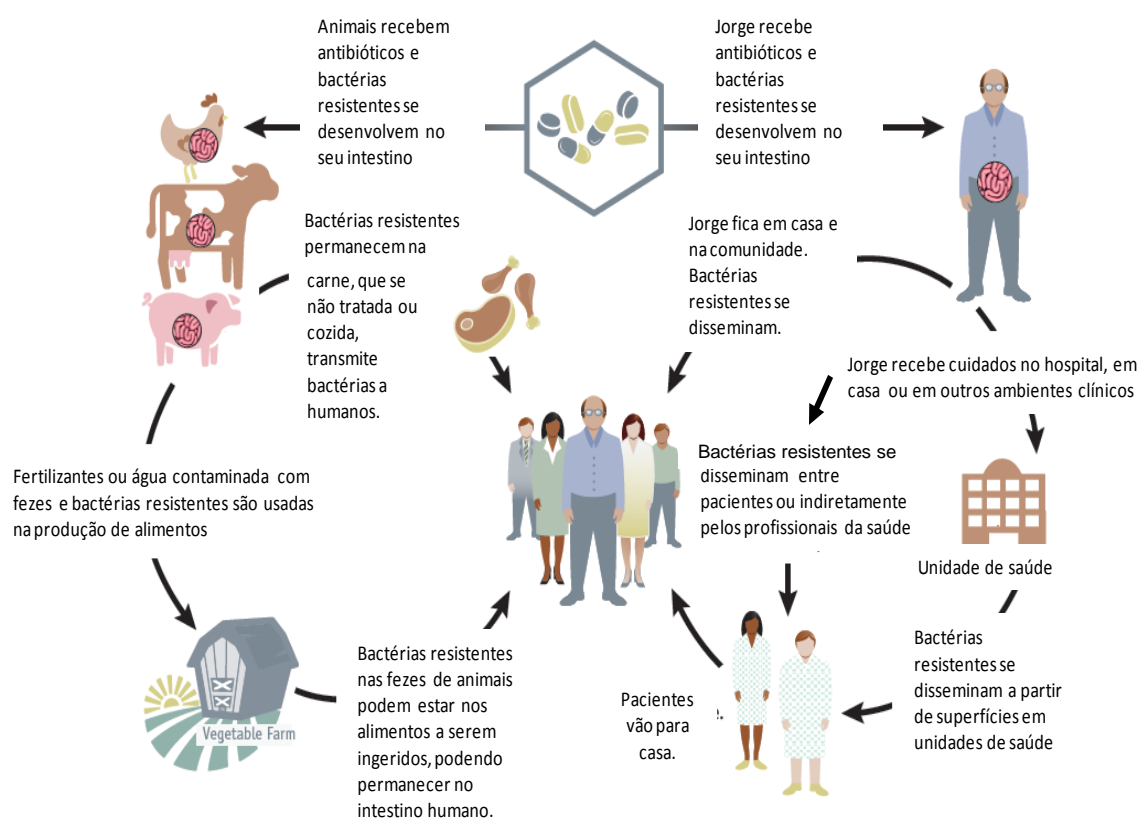


Figura 5: Exemplos de como a resistência a antibióticos se dissemina (CDC, 2013).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, lincosamidas, cloranfenicol e rifamicinas, entre outros. Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (Guimarães et al., 2010).

Ao longo do tempo, as bactérias desenvolveram mecanismos variados para resistir aos antibióticos utilizados no tratamento de infecções. De modo geral, esses mecanismos envolvem destruição ou inativação enzimática da droga, alteração da permeabilidade celular impedindo a entrada do antibiótico, alterações no sítio-alvo da droga e efluxo rápido do composto antimicrobiano (Tortora et al., 2012). Por exemplo, o principal mecanismo de resistência aos agentes β -lactâmicos é através da produção de enzimas (β -lactamases) que apresentam grupos capazes de promover a abertura do anel β -lactâmico, neutralizando assim a ação do antibiótico. O exemplo mais conhecido de resistência a esses antibióticos é o do patógeno *Staphylococcus aureus* metilina-resistente ou MRSA (Guimarães et al., 2010; Tortora et al., 2012).

Um mecanismo interessante é a resistência relatada para o gênero *Enterococcus* à tetraciclina. Genes de resistência que codificam proteínas que protegem o ribossomo e de bombas de efluxo já foram detectados em isolados clínicos, ambientais e alimentares (Chopra & Roberts, 2001; Poeta et al, 2005; Frazzon et al., 2010). Resumidamente, esses mecanismos de resistência surgiram de duas formas: mutações que alteram o DNA celular (mudança de

pares de bases, deleções e inversões); aquisição de material genético por meio de plasmídeos conjugativos e transposons (Bennet, 2008).

2.4 Microrganismos de importância clínica

Diversas espécies microbianas são a causa de infecções importantes no ambiente clínico, sendo algumas delas relacionadas com a resistência dos microrganismos a agentes antimicrobianos. Por exemplo, bactérias Gram-positivas pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* são membros da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e estão associados a infecções oportunistas em pacientes hospitalizados. Enterococos e estafilococos, especialmente, têm recebido grande atenção por serem frequentemente isoladas de aparelhos medicinais, como cateteres intravenosos (Otto, 2010; Kiss et al., 2013), principalmente pela habilidade de formarem biofilmes (Costerton et al., 1999). Outros microrganismos Gram-positivos comumente encontrados infectando seres humanos são os membros dos gêneros *Bacillus* e *Listeria*, os quais estão associados principalmente a surtos de intoxicações alimentares (Gandhi & Chikindas, 2007; Sandasi et al., 2010; Tortora et al., 2012).

Por outro lado, entre todos os problemas de resistência bacteriana, patógenos Gram-negativos são particularmente preocupantes por estarem se tornando resistentes a praticamente todas as drogas prescritas no tratamento (CDC, 2013). As infecções mais sérias são relacionadas à assistência à saúde, e os patógenos mais comuns são *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. (associadas à ingestão de alimentos contaminados), além de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. – microrganismos frequentemente isolados de UTI's

(Andrade et al., 2003; Pontes et al., 2006; Ferreira & Lala, 2010; Tortora et al., 2012).

Assim como as bactérias, fungos também são responsáveis por muitos relatos de infecções relacionadas à assistência à saúde. Os fungos microscópicos são divididos em leveduriformes e filamentosos. As leveduras são capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. Entre os fungos leveduriformes, *Candida albicans* é a principal causa de infecções por fungos em humanos, como candidíase vulvo-vaginal a candidíase bucal, sendo que para essa última, *C. tropicalis* e *C. krusei* fazem parte do curso da doença (Tortora et al., 2012; Anvisa, 2004).

Ao contrário das leveduras, os fungos filamentosos ou bolores, normalmente não fazem parte da microbiota animal e, portanto, o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos. Dois gêneros de fungos envolvidos nas micoses cutâneas são *Trichophyton* e *Microsporum*, sendo que esse último se destaca por espécies zoonóticas até aquelas que raramente causam infecções em humanos (Benites et al., 1994; Mukherjee et al., 2003).

2.5 O Gênero *Enterococcus*

Atualmente são conhecidas mais de 51 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* (Euzéby, 2013). Esses microrganismos têm a forma de cocos Gram-positivos, com dimensões entre 0,6 - 2,5 µm, arranjados aos pares ou em cadeias curtas. São catalase-negativos, anaeróbios facultativos e não

formadores de esporos. Usualmente são encontrados na microbiota do trato gastrointestinal de homens e animais, além de alimentos, na água e no solo. São capazes de sobreviver a variações de estresse e condições ambientais hostis, como temperaturas extremas (5 – 65°C), pH (4.5 – 10.0) e altas concentrações de NaCl, o que lhes permite colonizar uma grande variedade de ambientes (Fisher & Phillips, 2009).

Devido a capacidade de produção de bacteriocinas - peptídeos extracelulares com atividade antibacteriana contra espécies relacionadas - enterococos tem sido amplamente utilizados na indústria de alimentos como probióticos ou cultura “starter”, além de serem responsáveis pelas propriedades organolépticas de muitos queijos (Giraffa, 2002; Foulquié Moreno et al., 2006). Segundo Campos et al. (2006) algumas bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* são ativas contra *Listeria* spp., *Clostridium* spp. e *S. aureus*, tendo uso potencial com biopreservantes em produtos alimentícios. No entanto, o isolamento de *Enterococcus* spp. em alimentos processados, como carne, salsichas e queijos, está frequentemente associado a contaminação fecal, pois esses microrganismos são capazes de sobreviver a processos aos quais os alimentos são expostos durante a produção (Fisher & Phillips, 2009). No Brasil, *Enterococcus* já foram isolados de alimentos como carnes, vegetais e produtos lácteos (Gomes et al., 2008; Riboldi et al., 2009; Frazzon et al., 2010).

Recentemente, *Enterococcus* emergiram como patógenos oportunistas em pacientes imunossuprimidos e em UTI's. Infecções causadas por enterococos incluem infecções no trato urinário, sepsis hepatobiliares, endocardites, infecções por ferimentos cirúrgicos, bacteremia e sepse neonatal.

O aumento no número de casos de infecções relacionadas à assistência à saúde é consequência do uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e do crescente número de pacientes em estado grave prolongado (Giraffa, 2002; Fisher & Phillips, 2009).

A resistência a antimicrobianos por enterococos (exemplificado na figura 6) está relacionada com a habilidade desses microrganismos resistirem a antibióticos comumente utilizados em tratamentos, entre eles penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e clindamicina em concentrações baixas. Além disso, enterococcus possuem a capacidade de aquisição de genes de resistência - por conjugação ou mutações no DNA - apresentando resistência adquirida à antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e vancomicina (Murray, 1990; Kayser, 2003).

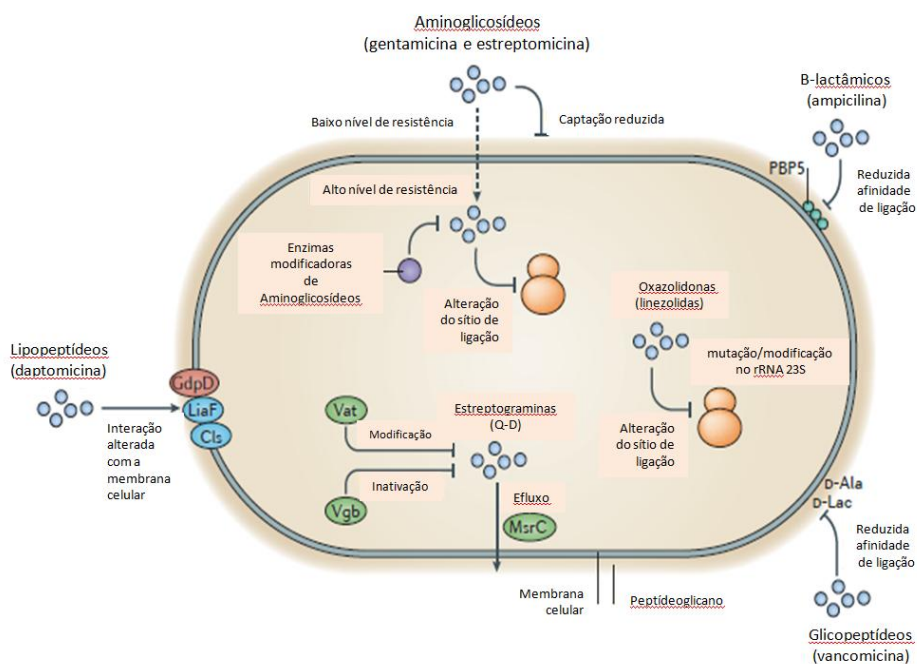


Figura 6: Principais mecanismos de resistência a antibióticos em *Enterococcus* (Adaptado de Arias & Murray, 2012).

Em especial, *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) tem ganho destaque no cenário microbiológico mundial. Desde seu primeiro isolamento, em 1988, ERV tem se disseminado com inesperada rapidez e hoje é encontrado em hospitais da maioria dos países (Courvalin, 2006). No Brasil, há relatos de isolados de ERV em amostras de alimentos e em amostras clínicas (Hörner et al., 2005; D'Azevedo et al., 2006; Riboldi et al., 2009).

Glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina, apresentam um múltiplo mecanismo de ação, inibindo a síntese do peptidoglicano, além de alterarem a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferirem na síntese de RNA citoplasmático (Anvisa, 2003). Desta forma, inibem a síntese da parede celular bacteriana. A vancomicina liga-se com alta afinidade ao resíduo terminal *D*-Alanina-*D*-Alanina de um pentapeptídeo, bloqueando a adição dos precursores de peptidoglicano na cadeia nascente (Courvalin, 2006).

Até o momento, nove tipos de resistência a vancomicina foram caracterizados tanto fenotipicamente como geneticamente (VanA, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M, e -N). Esses tipos diferem quanto ao glicopeptídeo e quanto a concentração do mesmo a que geram resistência. Por exemplo, enquanto cepas com fenótipo VanA tem elevado nível de resistência a vancomicina e teicoplanina, cepas VanB possuem níveis variados de resistência apenas a vancomicina. De um modo geral, a resistência baseia-se na alteração do precursor *D*-Ala-*D*-Ala (susceptível a vancomicina) para *D*-Ala-*D*-lactato ou *D*-Ala-*D*-serina, os quais tem cem e sete vezes menos afinidade pela

vancomicina, respectivamente (Courvalin, 2006; Fisher & Phillips, 2009; Lebreton et al., 2011).

Os genes *vanS/vanR* regulam a resistência de ERV e estafilococos vancomicina-resistentes. O sistema compreende uma proteína quinase (VanS) ligada a membrana plasmática e um regulador de resposta (VanR) no citoplasma que age como um ativador de transcrição. O sensor-quinase VanS é ativado em resposta a vancomicina, o que resulta na fosforilação do VanR e na transcrição do operon *VanHAX* (Courvalin, 2006).

A resistência VanA, que se caracteriza por altos níveis de resistência induzíveis a teicoplanina e vancomicina, é mediado pelo transposon Tn1546 e elementos relacionados. O transposon codifica VanH, uma desidrogenase que reduz o piruvato a *D*-Lac, e VanA, uma ligase que catalisa a formação *D*-Ala-*D*-Lac, o qual substitui *D*-Ala-*D*-Ala no peptídeo em formação. A VanX é uma dipeptidase que hidrolisa *D*-Ala-*D*-Ala e VanY é uma D,D-carboxipeptidase que hidrolisa o resíduo terminal *D*-Ala dos precursores tardios do peptideoglicano. Dessa forma, os precursores sensíveis à vancomicina são eliminados (Courvalin, 2006).

O fenótipo de resistência VanC foi descrito para *Enterococcus gallinarum*, *E.casseliflavus* e *E.flavescens*, que são intrinsecamente resistentes a baixos níveis de vancomicina e sensíveis a teicoplanina. O sistema possui uma proteína VanT ligada a membrana e que produz o peptídeo *D*-Ser, VanC que sintetiza *D*-Ala-*D*-Ser, e VanXY_C, uma proteína dipeptidase/carboxipeptidase, que realiza a hidrólise dos precursores terminados em *D*-Ala (Courvalin, 2006).

2.5.1 Fatores de virulência

A resistência de enterococos a antibióticos, como tal, não pode explicar a virulência desses microrganismos (Franz et al., 2001). No geral, enterococos não são particularmente virulentos quando comparados com outras bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (Moellering, 1992). Apesar disso, diversos estudos tem mostrado que eles podem carregar traços de virulência. Um fator de virulência é uma molécula efetora que aumenta a habilidade de um microrganismo causar uma doença, permitindo a colonização, a invasão, evitar o sistema imune e causar dano tecidual ao hospedeiro (Mannu et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2006; Cariolato et al., 2008).

Substâncias de agregação (AS) constituem-se em proteínas de superfície que são codificadas por plasmídeos sexuais e promovem o contato celular doador-receptor, levando a conjugação e transferência dos plasmídeos (Süssmuth et al., 2000). Essas proteínas são também responsáveis pela adesão de *Enterococcus* a células do hospedeiro, tendo um papel importante tanto na disseminação de resistência a antibióticos quanto na patogênese de infecções por enterococos (Waters & Dunny, 2001). Os genes *as* que codificam três das substâncias de agregação mais estudadas, *As1*, *Asp1* e *Asc10* já foram sequenciados e possuem elevada similaridade. A proteína *Asc10*, por exemplo, aumenta a aderência, a fagocitose e a sobrevivência de *Enterococcus* em leucócitos polimorfonucleares. Dessa forma, as células de defesa do hospedeiro podem servir como veículo até o sistema linfático

sanguíneo, facilitando a disseminação da infecção (Süssmuth et al., 2000; Waters & Dunny, 2001).

Outra proteína de superfície presente em *E. faecalis* é a Ace (Adesina de colágeno de *E. faecalis*). Essa proteína medeia a ligação a colágenos dos tipos I e IV e também a laminina, desempenhando um papel importante na patogênese de endocardites (Nallapareddy et al., 2000). A proteína extracelular de superfície (Esp) promove adesão, colonização e evasão do sistema imune do hospedeiro e pode desempenhar um papel na resistência a antibióticos (Foulquié Moreno et al., 2006). Essa proteína está associada com a capacidade dos enterococos formarem biofilme sobre superfícies abióticas (Poeta et al., 2005) e adesão a células eucarióticas como as células do trato urinário (Fisher & Phillips, 2009).

Gelatinase e citolisina/hemolisina são fatores virulentos secretados por *E. faecalis* (Koch et al., 2004). Gelatinase é uma metalo-endopeptidase capaz de hidrolisar colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. Essa enzima é transcrita por um gene cromossomal e é produzida em isolados fecais e clínicos, além de ter alta incidência em isolados alimentares (Foulquié Moreno et al., 2006). Citolisina é uma toxina bacteriana cujo gene é localizado em plasmídeos sexuais. Possui propriedades β -hemolíticas em humanos e alta incidência em isolados clínicos (Semedo et al., 2003).

2.6 Biofilmes

Na natureza, frequentemente os microrganismos são encontrados em comunidades aderidas irreversivelmente a superfícies bióticas ou abióticas, formando um sistema complexo denominado biofilme. As células em um

biofilme estão envoltas em uma matriz hidratada de substâncias exopoliméricas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos (Costerton et al., 1999).

Os microrganismos associados ao biofilme diferem da condição de vida livre (planctônica) em respeito aos genes que são transcritos (Donlan, 2002). Além disso, células em biofilme possuem vantagens únicas, incluindo a persistência durante longos períodos em privação de nutrientes, a capacidade de resistir e se multiplicar após ataques físicos, químicos e biológicos, e a habilidade de disseminação para colonizar novos locais (Cooper, 2010). Do ponto de vista clínico, patógenos humanos, quando em biofilme, são capazes de sobreviver a fagocitose de células do sistema imune do hospedeiro e a antibióticos administrados como tratamento. De fato, quando as células existem em um biofilme, elas podem se tornar de 10 a 100 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos (O'Toole et al., 2000; Mah & O'Toole, 2001; Cooper, 2010).

Bactérias podem colonizar uma grande variedade de dispositivos médicos, como cateteres, marca-passos e válvulas cardíacos artificiais, aparelhos ortopédicos, além de estarem associados com diversas doenças humanas como endocardite, infecções em ferimentos, otite crônica e fibrose cística (Costerton et al., 1999). Biofilmes também se formam em ambiente de processamento de alimentos, onde a deterioração de alimentos crus, frescos e minimamente processados resulta em enormes perdas econômicas (Van Houdt & Michiels, 2010). A aderência microbiana a oleodutos e tubulações de água

potável podem resultar em biocorrosão e, conseqüentemente, milhões de dólares para o reparo (Donlan, 2002; Palmer et al., 2007).

2.6.1 A formação do biofilme

A formação de um biofilme é um processo complexo envolvendo ligação e imobilização das células em uma superfície, interação célula-célula, formação de uma microcolônia, formação de um biofilme conflúente e estabelecimento de uma estrutura tridimensional (O'Toole et al., 2000). A Figura 7 resume as principais etapas de formação do biofilme.

Segundo Palmer et al. (2007) a adesão inicial das células bacterianas a uma superfície envolve múltiplos fatores, entre eles o condicionamento da superfície, transporte das células até o local da adesão, carga da superfície celular, hidrofobicidade, rugosidade e microtopografia da superfície. A acumulação de moléculas tanto orgânicas quanto inorgânicas pode alterar as propriedades físico-químicas da superfície, formando o chamado filme condicionante e levando a altas concentrações de nutrientes. A adesão inicial reversível das células bacterianas se caracteriza por interações de Van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas, no qual as células podem ser facilmente removidas. A adesão irreversível é o próximo passo, onde o contato ocorre pela produção de apêndices de superfície microbiana, como flagelos, fímbrias, pílí e exopolissacarídeo (EPS) (Kumar & Anand, 1998).

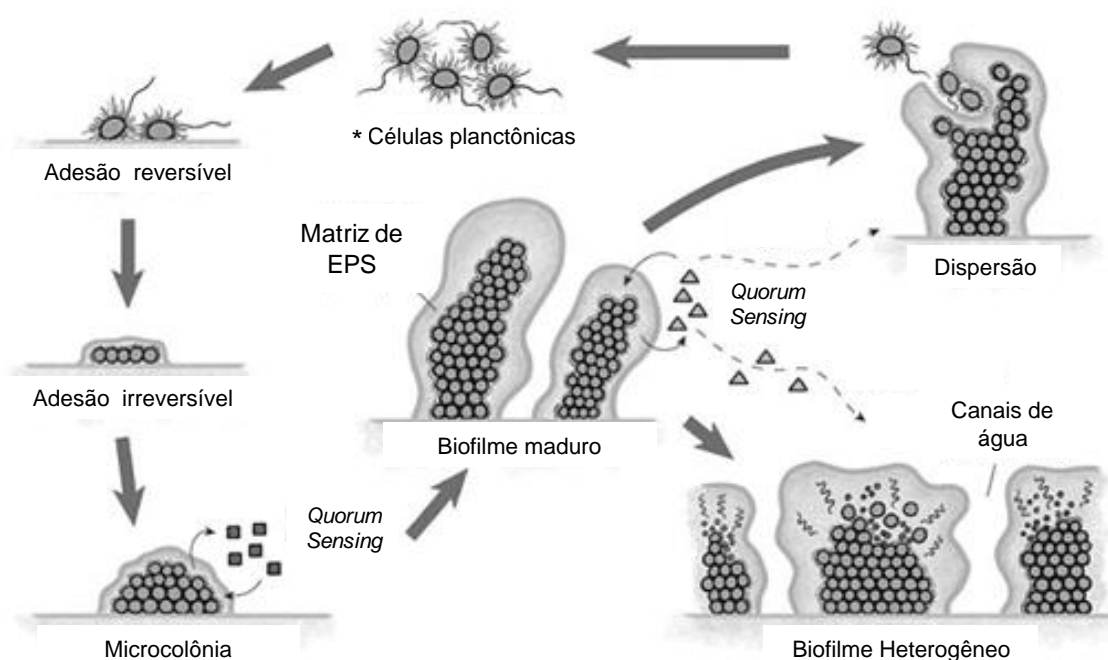


Figura 7: Etapas da formação de um biofilme. *Início do ciclo. Fonte: <http://www.becscreen.com/about/about-biofilms>.

A seguir, as células aderidas irreversivelmente dividem-se utilizando os nutrientes presentes no filme condicionante formando microcolônias. EPS adicional é sintetizado com o objetivo de ancorar as células a superfície e estabilizar a colônia em relação as flutuações do ambiente. As adesões de novas bactérias com as consequentes divisões celulares e a síntese de EPS formam o biofilme maduro. A composição pode ser heterogênea, com células de espécies diferentes dispersas em microcolônias dentro do biofilme separadas por canais intersticiais de água (Kumar & Anand, 1998; Donlan, 2002).

As bactérias que formam um biofilme são capazes de se comunicar pelo mecanismo de comunicação célula-célula, denominada *quorum sensing*, por meio de moléculas conhecidas como autoindutoras. Quando atingem um

limiar crítico, essas moléculas são detectadas por bactérias, elas respondem a esse sinal alterando a sua expressão gênica (Reading & Sperandio, 2006). Esse sistema tem um papel importante no desenvolvimento do biofilme, resistência, virulência e produção de EPS (Kerekes et al., 2013).

A fim de sobreviver ou colonizar novos nichos, as bactérias individuais ou em grupos destacam da estrutura do biofilme. Isso pode ser consequência de diversos fatores, como dinâmica do fluido, presença de certos agentes químicos no fluido ambiental ou alterações nas superfícies celulares ou do substrato (Kumar & Anand, 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e caracterização química dos óleos essenciais de *Heterothalamus* sp.

Os óleos essenciais de *Heterothalamus alienus* e *Heterothalamus psiadioides* foram obtidos junto ao Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia (LEQTAX) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS. As folhas da espécie *H. psiadioides* foram coletadas em populações localizadas no Morro Santana (Porto Alegre, RS) nos meses de maio de 2012 (denominado OHP1) e abril de 2013 (denominado OHP2), enquanto as folhas de *H. alienus* foram coletadas no município de Bagé/RS. Um exemplar de cada espécie foi depositado no Herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob os números 175007 (OHP1), 173995 (OHP2) e 153825 (*H. alienus*). As folhas, coletadas adultas e totalmente expandidas, foram submetidas à secagem em temperatura ambiente com posterior extração dos óleos essenciais em aparelho de Clevenger modificado (Gottlieb & Taveira-Magalhães, 1960).

A caracterização química do óleo essencial de *H. alienus* utilizado no presente estudo foi previamente determinada por Schmidt-Silva et al., 2012, nas mesmas condições descritas a seguir. Para os óleos essenciais de *H.*

psiadioides, a caracterização química foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química/UFRGS por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama ou GC-FID (GC17A, Shimadzu) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas ou GC-MS (GC17A, Shimadzu). As análises foram realizadas nas mesmas condições, em duplicata: injeção de 1 µL de uma solução a 1% do óleo essencial em Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com hélio e nitrogênio como gases de arraste (1 mL/min.) para GC-FID e GC-MS, respectivamente. A rampa de aquecimento iniciou a uma temperatura de 60°C, a qual foi programada para atingir 220°C a uma razão de 3°C/min, e mantida constante a 220°C por 5 minutos. A relação “Split” foi ajustada em 1:10. A temperatura de injeção foi 220°C, assim como a temperatura de detecção. A faixa de varredura de massa foi ajustada de 45 m/z a 400 m/z.

A determinação estrutural dos componentes do óleo foi feita a partir da comparação dos dados de fragmentação das substâncias desconhecidas com as existentes no banco de dados disponível (Wiley 6ªed.) e pela comparação entre os índices de retenção com programação linear de temperatura (IRPLT), obtidos experimentalmente, com os dados de fragmentação com dados obtidos na literatura especializada (Adams, 2001). Os índices de retenção foram calculados com base nos tempos de retenção de alcanos lineares (C₈-C₂₄) e os tempos de retenção dos compostos voláteis dos óleos essenciais, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{IRPLT} = 100n + 100\left(\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}\right),$$

onde n = número de átomos de carbono do alcano linear que elui antes do analito; t_{RX} = tempo de retenção do analito; t_{Rn} e t_{RN} são tempos de retenção do alcano com os números de átomos n e N , respectivamente, que eluem imediatamente antes e depois do analito (Stashenko & Martínez, 2010).

Os percentuais de cada composto na mistura foram calculados pelo método de normalização, considerando-se o somatório das áreas dos picos cromatográficos equivalente a 100% dos compostos no óleo volátil (Lanças, 1993).

3.2 Óleos essenciais e timol

Os óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* (OHP1) foram utilizados no *screening* inicial de atividade antimicrobiana; no entanto, apenas a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *H. psiadioides* foi avaliada nas análises posteriores. A utilização de cada óleo essencial (OHP1 ou OHP2) variou de acordo com o teste e está especificada no texto.

Previamente aos testes antimicrobianos, as soluções dos óleos essenciais foram preparadas por emulsificação do óleo em dimetilsulfóxido (DMSO - Nuclear) na proporção 3 óleo: 1 DMSO. A solução estoque de Timol P.A. (Sigma), também obtido junto ao laboratório LEQTAX, foi preparada por emulsificação do mesmo em água destilada estéril acrescida de 0,5% de Tween 20. As concentrações finais dos óleos essenciais e do timol (apresentados em porcentagem) foram obtidas por diluição seriada ou por inclusão do volume desejado diretamente no meio de cultura, exceto quando

indicado no texto. Os valores de densidade (D) dos óleos essenciais também foram obtidos, utilizando fórmula a seguir, adaptada de Fonseca & Librandi, 2008,

$$D = \frac{P2 - P1}{V} = \frac{mg}{ml}$$

onde P1 e P2 são os pesos de *ependorfs* antes e depois da adição de 1 mL (V) dos óleos essenciais.

3.3 Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos empregados no presente estudo foram distribuídos em três experimentos (Tabela 1). No primeiro experimento, onde o ensaio de *screening* inicial foi realizado, foram empregados microrganismos de importância clínica, entre eles: cinco cepas padrão de bactérias Gram-positivas, quatro de bactérias Gram-negativas, cinco fungos leveduriformes e três fungos filamentosos. Conforme os resultados obtidos, a mesma avaliação foi realizada sobre isolados de *E. faecalis* resistentes e multirresistentes a antibióticos, sendo esses microrganismos de origem alimentar, ambiental e clínica. No experimento de concentração inibitória mínima foram avaliadas quinze bactérias Gram-positivas e no último experimento, onde foram realizados os ensaios de atividade antibiofilme, foram avaliadas cinco bactérias Gram-positivas. Os microrganismos foram obtidos da Bacterioteca do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS) e da Micoteca pertencente ao Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, da Faculdade de Farmácia (UFRGS). A pureza das culturas foi a

Tabela 1: Microrganismos e isolados (origem) de *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos utilizados no estudo.

Microrganismos	1	2	3	Microrganismos	1	2	3
<u>Bactérias Gram-positivas</u>							
<i>Enterococcus faecalis</i>				<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984		X	X
ATCC 29212	X	X	X	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	X		
A8 (Queijo colonial)	X			<i>Streptococcus agalactii</i> ATCC 13813	X		
G12 (Queijo mozzarella)	X	X		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	X		
I8b (Repolho)	X	X		<u>Bactérias Gram-negativas</u>			
LB (Leite de Búfala)	X	X		<i>Salmonella</i> sp.	X		
114 (Cloaca de frango)	X			<i>Pseudomonas</i> sp.	X		
378 (Cloaca de frango)	X			<i>Escherichia coli</i> INCQS 0031	X		
C10 (Cenoura)		X	X	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	X		
3.3 (Ambiente)	X	X	X	<u>Leveduras</u>			
3.20 (Ambiente)	X	X		<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	X		
4.16 (Ambiente)	X	X		<i>Candida glabrata</i> ATCC 40136	X		
488 (Urina)	X			<i>Candida tropicalis</i> 24P	X		
593 (Urina)	X	X		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	X		
612 (Secreção cervical)	X	X		<i>Candida famata</i> RL08	X		
1950 (Urina)		X		<i>Trichosporum aisonii</i> TAH05	X		
1953 (Urina)		X		<u>Fungos Filamentosos</u>			
2389 (Urina)	X	X	X	<i>Microsporium canis</i> 33	X		
2390 (Sangue)		X		<i>Microsporium gypseum</i> 45	X		
				<i>Trichiphyton rubrum</i> 42	X		

1– Screening inicial; 2 – Concentração Inibitória Mínima; 3 – Atividade Antibiofilme; X – Microrganismo avaliado.

confirmada pelo método de Gram e morfologia colonial e para os isolados resistentes antimicrobianos foram realizados antibiogramas a fim de verificar o perfil de resistência.

Previamente aos testes, alíquotas de células bacterianas congeladas foram crescidas em meio Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid), por 24 h a 37°C. Os inóculos foram ajustados em solução salina 0,9% ou em meio Caldo Triptona de Soja (TSB, HiMedia) estéril a uma concentração em torno de 10^8 UFC/mL (0,5 MacFarland), exceto quando mencionado no texto. Os fungos foram cultivados em meio Agar-Sabouroud; as leveduras foram incubadas por 24 h a 37°C e os fungos filamentosos por sete dias a temperatura ambiente. Os inóculos foram padronizados conforme a escala 0,5 MacFarland para leveduras e à densidade ótica de 535 nm para os fungos filamentosos.

3.4 Screening inicial da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana e o espectro de ação dos óleos essenciais foram avaliadas pela técnica de disco-difusão em ágar, conforme Jadhav et al. (2013), com algumas modificações. As suspensões microbianas preparadas como descrito anteriormente foram inoculadas uniformemente, utilizando uma alça de Drigalski ou swabs, sobre a superfície do meio Ágar Muller-Hinton (HiMedia), sendo que para os fungos o meio de cultura foi acrescido com 2% de glicose e 0,4% de clorafenicol. As placas foram secas por 30 minutos a temperatura ambiente e, a seguir, discos de papel de filtro estéreis (diâmetro de 6 mm) foram acrescidos de 20 µl dos óleos essenciais puros – *H. alienus* ou OHP1 - e depositados no centro de cada placa de petri.

Os controles positivos foram preparados pela adição de água destilada estéril aos discos. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h para bactérias e leveduras e por 7 dias a temperatura ambiente para os fungos filamentosos. A atividade antimicrobiana foi analisada em dois ensaios independentes e avaliada pela média dos diâmetros das zonas de inibição formadas contra os microorganismos testados. Conforme os resultados obtidos nesse *screening* preliminar, os microrganismos foram selecionados para análises de concentração inibitória mínima e atividade antibiofilme.

3.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada apenas para o óleo essencial de *H. psiadioides* (OHP1 e OHP2) pelas técnicas de Diluição em Agar e Microdiluição em Caldo, de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2003) com algumas modificações. O composto Timol foi utilizado como controle, uma vez que sua atividade antimicrobiana é bem relatada na literatura.

3.5.1 Diluição em Agar do óleo essencial de *H. psiadioides*

Um gradiente de concentração entre 0,25% e 1,25% foi avaliado pelo método de Diluição em Agar. Volumes variáveis das soluções de OHP1 e do timol foram adicionados a Agar Muller Hinton (temperatura entre 45-50°C) obtendo-se um volume final de 10 mL. Após agitação, o conteúdo foi vertido em placas de Petri e deixado secar por 30 minutos a temperatura ambiente. Dois microlitros da suspensão bacteriana preparada como descrita anteriormente e

diluída até 10^7 UFC/mL foram adicionados à superfície das placas, levando a uma concentração de aproximadamente 10^4 UFC/mL. A incubação foi a 37°C por 24 h. A menor concentração cujas placas não apresentaram Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi considerada a concentração inibitória mínima. Os controles de crescimento, sem a adição do óleo ou timol foram avaliados em todos os ensaios.

3.5.2 Microdiluição em Caldo do óleo essencial de *H. psiadioides*

A concentração inibitória mínima em meio líquido foi determinada por meio de microplacas de poliestireno de 96 poços. Cem microlitros da solução do OHP1 ou OHP2 e do timol foram adicionados a um volume igual do meio de cultura nos primeiros poços da microplaca, seguido de diluição seriada nos poços subsequentes a fim de se obter um gradiente de concentração de 32% a 2% para os óleos essenciais e 1% a 0,03% para o timol. Dez microlitros da suspensão microbiana (concentração final 1×10^6 UFC/mL) foram adicionados em cada poço e incubados por 24 h a 37°C . Os controles positivos (meio de cultura e inóculo) e o de crescimento (meio de cultura, DMSO e inóculo) foram avaliados na microplaca. Os valores da CIM foram definidos como as menores concentrações dos agentes que inibiram o crescimento visível bacteriano. Para a determinação da CBM (concentração bactericida mínima), 50 μL da solução de todos os poços que não apresentaram crescimento foram inoculados sobre a superfície de placas de Agar Müller Hinton, sendo essas incubadas por 24 h a 37°C . A amostra com a menor concentração do agente que não apresentou crescimento foi considerada a

CBM. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões independentes.

3.6 Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *H. psiadioides*

Previamente aos ensaios antibiofilme, os cocos Gram-positivos utilizados na avaliação da CIM foram avaliados e classificados quanto à formação de biofilme, de acordo com Stepanović et al. (2000). Essa classificação foi obtida em placas de poliestireno de 96 poços, sendo baseada nas ODs dos biofilmes microbianos. O valor denominado *cut off* foi considerado como três desvios padrão da OD média do controle negativo. Os microrganismos foram classificados como indicado abaixo:

$OD \leq cut\ off$	Não formador de biofilme
$cut\ off < OD \leq 2 \times cut\ off$	Fraco formador de biofilme
$2 \times cut\ off < OD \leq 4 \times cut\ off$	Moderado formador de biofilme
$4 \times cut\ off \leq OD$	Forte formador de biofilme

De acordo com essa análise, foram selecionados dois microrganismo forte formadores de biofilme (*S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. faecalis* isolado C10), um moderado formador (*E. faecalis* isolado 2389), um fraco formador (*E. faecalis* isolado 3.3) e um não formador (*E. faecalis* ATCC 29212). Após a exposição aos compostos – conforme as técnicas descritas abaixo – os microrganismos foram também caracterizados quanto ao padrão de formação de biofilme.

3.6.1 Inibição da formação de biofilme

A ação antibiofilme do óleo essencial de *H. psiadooides* (OHP1) e do timol foi avaliada de acordo com Jadhav et al. (2013) com algumas modificações. Cem microlitros de cada solução emulsificada em meio TSB acrescido de 1% de glicose foram adicionados aos poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços. A seguir, 100 μ L microlitros das suspensões microbianas foram acrescentados a cada poço, a exceção do controle negativo, levando a um volume final de 200 μ L por poço. As concentrações finais dos compostos em cada poço correspondiam a CIM, 0.5XCIM e 0.25XCIM. Os testes foram realizados em quadruplicata em duas ocasiões independentes. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h sob condições estéreis para permitir a aderência celular. A formação do biofilme foi avaliada pela técnica de cristal violeta e pela atividade metabólica das células.

3.6.2 Erradicação do biofilme formado por 24 h

A avaliação de erradicação de biofilmes formados por 24 h foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços. Cem microlitros da suspensão bacteriana (*S. epidermidis* ATCC95984, *E. faecalis* isolados C10 e 2389) foram adicionados a poços contendo 100 μ L microlitros de TSB acrescido de 1 % de glicose, sendo a microplaca incubada a 37°C por 24 h para permitir a formação do biofilme. Após esse período, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril para remover células não aderidas. A seguir, 100 μ L da solução do óleo essencial de *H. psiadooides* (OHP2) e do timol, equivalentes a CIM e 0.5XCIM, foram adicionados em cada poço por um período de 2 h. O mesmo volume de água

destilada estéril foi adicionado aos poços controle. Após, as soluções foram retiradas, os poços foram novamente lavados com solução salina e o biofilme foi avaliado pelas técnicas de Cristal Violeta e de avaliação da atividade metabólica. Os ensaios foram realizados em quadruplicata em duas ocasiões independentes.

3.6.3 Ensaio Cristal Violeta e atividade metabólica dos biofilmes

A avaliação do biofilme microbiano foi realizada pela técnica de Cristal Violeta. Após as etapas citadas acima, o conteúdo de cada poço foi cuidadosamente removido e a placa foi lavada cinco vezes com solução salina estéril a fim de remover qualquer célula não aderida. A seguir, 150 µL de metanol foram adicionados em cada poço por 15 minutos. Após remoção, as placas foram completamente secas a temperatura ambiente e 150 µL da solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados por 15 minutos. O corante foi retirado e as placas foram lavadas em água corrente. Quando secas, etanol 95% foi aplicado em cada poço. A absorbância foi medida a 450 nm usando o leitor de microplaca Biochrom Anthos 2010. A porcentagem de inibição de formação do biofilme para cada concentração seguiu a seguinte fórmula, de acordo com Jadhav et al. (2013).

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left\{ \frac{\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ amostra}}{\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ controle positivo}} \right\} \times 100$$

A avaliação da atividade metabólica dos biofilmes foi determinada pela técnica de redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma), de acordo com Denizot & Lang (1986). O

método baseia-se na ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH encontradas em células vivas, as quais hidrolisam o MTT a formazan, de cor púrpura e insolúvel. O sal MTT foi previamente diluído em tampão fosfato (PBS) até uma concentração final de 5mg/mL. Assim como na técnica de Cristal Violeta, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com solução salina. Cinquenta microlitros da solução de MTT foram adicionados em cada poço e incubados por 3 h a 37°C sob condições estéreis. O formazan foi então dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida a 570nm usando uma Leitora de ELISA Espectrofotométrica (Anthos Zenyth 200).

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

A formação do biofilme foi avaliada sobre corpos de prova de poliestireno e de aço inoxidável (2 cm x 1 cm, espessura desprezível). Os corpos foram preparados previamente por imersão em solução de detergente neutro a 0,3%, por uma hora, sendo enxaguados depois com água destilada e pulverizados com etanol 70% para desinfecção. Após a secagem, os corpos de prova foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

O isolado *E. faecalis* C10 foi o escolhido para essa análise. Após o cultivo por 24 h a 37°C em Agar BHI, o inóculo foi ajustado a uma concentração em torno de 10^8 UFC/mL em meio TSB acrescido de 1% de glicose, sendo posteriormente 1 mL adicionado a frascos contendo os corpos de prova e 1 mL da solução do OHP2 (3 óleo : 1 DMSO) em meio de cultura, obtendo-se um volume final de 2 mL e uma concentração do óleo equivalente a CIM. O material foi cultivado por 24 h a 37°C. Após esse período, as superfícies com

as células aderidas, tratadas e não tratadas com o óleo, foram fixadas com glutaraldeído 3% (v/v) em tampão fosfato 0,2M pH 7.2 por 7 dias.

Após este processo, os materiais foram lavados três vezes com o mesmo tampão e desidratados num gradiente de acetona de 30% a 100% de concentração (v/v). A seguir, o material foi processado em um secador de ponto crítico (Balzers CPD030; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Na sequência, partículas de ouro e platina foram depositadas sobre as amostras. A visualização foi realizada através de um Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 5800 (JEOL, Tóquio, Japão).

3.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas com o Teste de Tukey. Diferenças com valor $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil químico dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais de *H. psiadioides* é apresentada da tabela 2. As análises cromatográficas revelaram uma complexa mistura de terpenos, sendo o β -pineno o composto majoritário – para OHP1 e OHP2 – com 44,65% e 33,13%, respectivamente. Outros compostos presentes em quantidades expressivas em ambos os óleos foram limoneno (6,50% - 5,97%), α -pineno (4,41% - 2,58%), *trans*-ocimeno (2,30% - 3,82%) e terpinoleno (1,28% - 1,87%). Alguns compostos estão presentes só no OHP1, como α -curcumeno (3,79%), enquanto outros estão presentes apenas no OHP2, como valenceno (4,39%). No total, os compostos monoterpênicos compõem 81,23% do OHP1 e 68,68% do OHP2, enquanto que os compostos sesquiterpênicos compõem 18,77% do OHP1 e 31,32% do OHP2.

O óleo essencial de *H. alienus*, cuja composição química foi determinada por Schmidt-Silva (2012), também apresenta o β -pineno (40,8%) como composto majoritário. Outros compostos químicos em quantidade expressiva são: geranil acetato (10,88%), valenceno (7,98%), limoneno (6,86%), *trans*-ocimeno (5,37%), α -pineno (4,24%) e germacreno-D (3,26%), entre outros em menor quantidade. Esses compostos estão presentes nos óleos essenciais de *H. psiadioides* em concentrações semelhantes.

Tabela 2: Composição química dos óleos essenciais de *H. psiadioides*.

Componentes	IRPLT#	OHP1		OHP2	
		IRPLT	Área (%)	IRPLT	Área (%)
<u>Monoterpenos hidrocarbonados</u>					
α -Tujeno	930	926	0,14	926	0,09
α -Pineno	939	935	4,41	934	2,58
α -Fencheno	953	949	0,23	-	-
Canfeno	954	956	0,29	949	0,14
Verbeneno	968	-	-	956	0,06
N.I.		971	0,08	971	0,06
Sabineno	975	975	0,26	974	0,37
β -Pineno	979	983	44,65	982	33,13
Mirceno	991	991	1,91	990	1,97
α -Felandreno	1003	-	-	1006	0,26
N.I.		1014	13,47	1014	11,41
α -Terpineno	1017	1018	0,15	1017	0,15
Para-Cimeno	1025	1024	0,79	1024	0,69
Limoneno	1029	1031	6,50	1030	5,97
<i>cis</i> -Ocimeno	1037	1035	0,07	1035	0,10
<i>trans</i> -Ocimeno	1050	1047	2,30	1047	3,82
γ -Terpineno	1060	1058	0,19	1058	0,17
<i>cis</i> -hidrato Sabineno	1070	-	-	1071	0,03
Terpinoleno	1089	10.89	1,28	1089	1,87
Para-Cymeneno	1091	-	-	1096	0,02
<u>Monoterpenos oxigenados</u>					
<i>trans</i> -óxido Linalool	1073	1071	0,15	-	-
Linalool	1097	1099	1,07	1099	0,65
N.I.		-	-	1112	0,04
α -Fenchol	1114	-	-	1117	0,17
Endo-Fenchol	1117	1114	0,21	-	-
N.I.		-	-	1136	0,08
<i>trans</i> -Pinocarveol	1139	1140	0,39	1139	0,22
N.I.		1149	0,08	1149	0,05
Isoborneol	1162	1163	0,16	-	-
N.I.		-	-	1163	0,10
Borneol	1169	-	-	1166	0,26
Para-mentha-1,5-dien-8-ol	1170	1159	0,33	-	-
Terpine-4-ol	1177	1166	0,35	1178	0,47

Tabela 2 (continuação)

Componentes	IRPLT#	OHP1		OHP2	
		IRPLT	Área (%)	IRPLT	Área (%)
N.I.		-	-	1186	0,03
α -Terpineol	1189	1178	0,61	1191	0,34
N.I.		1197	0,38	1197	0,22
N.I.		-	-	1218	0,03
N.I.		1222	0,08	1222	0,05
N.I.		1252	1,56	-	-
N.I.		-	-	1253	2,12
N.I.		-	-	1275	0,07
N.I.		-	-	1280	0,02
N.I.		1184	0,20	-	-
N.I.		1287	0,21	1287	0,35
N.I.		1191	0,51	-	-
N.I.		-	-	1292	0,08
N.I.		-	-	1298	0,04
N.I.		-	-	1313	0,09
N.I.		-	-	1337	0,04
<i>Trans</i> -Carvil acetato	1342	-	-	1340	0,04
<u>Sesquiterpenos hidrocarbonados</u>					
α -Cubebeno	1351	-	-	1353	0,11
N.I.		-	-	1356	0,07
α -Ylangeno	1375	-	-	1376	0,08
Isoledeno	1377	-	-	1377	0,05
α -Copaeno	1377	-	-	1380	0,20
N.I.		-	-	1388	0,04
α -Funebreno	1403	-	-	1392	0,11
β -Elemeno	1391	1395	0,56	1395	0,73
Longifoleno	1408	-	-	1399	0,05
N.I.		-	-	1402	0,08
α -Gurjuneno	1410	-	-	1415	0,23
N.I.		-	-	1419	0,05
β -Cariofileno	1419	1425	0,28	1425	0,47
N.I.		-	-	1428	0,06
N.I.		1434	0,10	-	-
β -Gurjuneno	1434	-	-	1434	0,25

Tabela 2 (Continuação)

Componentes	IRPLT#	OHP1		OHP2	
		IRPLT	Área (%)	IRPLT	Área (%)
N.I.		-	-	1439	0,10
Aromadendreno	1441	1445	0,47	1445	1,10
N.I.		1449	0,05	1449	0,12
N.I.		1451	0,05	1451	0,10
α -Himachaleno	1451	1455	0,61	1456	0,88
α -Humuleno	1455	1459	0,41	1460	0,53
N.I.		1465	0,55	1465	1,18
Alloaromadendreno	1460	1467	0,17	1467	0,37
N.I.		-	-	1473	0,04
N.I.		-	-	1475	0,06
γ -Gurjuneno	1477	1478	0,27	1478	0,51
N.I.		1483	1,45	-	-
γ -Muuroleno	1480	-	-	1484	3,81
α -curcumeno	1481	1486	3,79	-	-
γ -Curcumeno	1483	-	-	1487	2,97
Germacreno D	1485	-	-	1488	1,80
β -Selineno	1490	1493	0,46	1493	0,87
Viridifloreno	1497	1495	0,12	1496	0,33
Valenceno	1496	-	-	1504	4,39
α -Muuroleno	1500	-	-	1508	0,04
Biciclogermacreno	1500	1503	2,46	-	-
Germacreno A	1509	-	-	1510	0,05
β -Himachaleno	1505	-	-	1513	0,37
N.I.		1513	0,17	-	-
γ -Cadineno	1514	1519	0,33	1520	0,55
N.I.		-	-	1525	0,03
Δ -Cadineno	1523	1528	0,69	1528	1,23
N.I.		-	-	1531	0,08
<i>trans</i> -Cadina-1(2),4-dieno	1535	-	-	1537	0,11
N.I.		-	-	1540	0,13
α -Cadineno	1539	1539	0,23	1543	0,12
<u>Sesquiterpenos oxigenados</u>					
N.I.		-	-	1560	0,06
<i>Trans</i> -Nerolidol	1563	15,65	0,09	-	-

Tabela 2 (Continuação)

Componentes	IRPLT#	OHP1		OHP2	
		IRPLT	Área (%)	IRPLT	Área (%)
N.I.		-	-	1566	0,12
N.I.		-	-	1569	0,3
Ledol	1569	1575	0,29	1575	0,63
N.I.		-	-	1580	0,23
Espatulenol	1578	-	-	1584	1,31
N.I.		1584	1,43	-	-
N.I.		-	-	1590	0,53
Viridiflorol	1593	1590	0,32	1599	0,46
N.I.		1599	0,27	-	-
N.I.		1603	0,06	-	-
N.I.		-	-	1604	0,10
N.I.		1611	0,53	1611	0,98
N.I.		1616	0,11	1616	0,09
N.I.		-	-	1620	0,08
N.I.		-	-	1624	0,04
N.I.		-	-	1629	0,14
N.I.		-	-	1636	0,12
N.I.		1638	0,16	1638	0,18
N.I.		1644	0,12	1644	0,09
α -Muurolol	1646	-	-	1646	0,17
N.I.		-	-	1651	0,07
α -Eudesmol	1654	1660	0,22	-	-
N.I.		-	-	1657	0,29
N.I.		-	-	1660	0,37
N.I.		1683	0,19	-	-
N.I.	1800	-	-	1799	0,04
N.I.		-	-	1839	0,16
N.I.		-	-	1852	0,06

IRPLT[#], índices de retenção com programação linear de temperatura, tabelado (Adams, 2001).

IRLPT, índices de retenção com programação linear de temperatura, calculado.

A porcentagem relativa de cada componente foi obtida diretamente das áreas pico do cromatograma, considerando 100% a soma de todos os picos avaliados.

N.I., não identificado.

4.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Heterothalamus*

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Heterothalamus alienus* e *Heterothalamus psiadioides* (OHP1) sobre os microrganismos testados pode ser observado nas Tabelas 3 e 4. Quando avaliados pela técnica

Tabela 3: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* (OHP1) pela técnica de Disco-difusão.

Microrganismos	Atividade antimicrobiana	
	<i>H. alienus</i>	<i>H. psiadioides</i>
Bactérias Gram-positivas		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	1,9 ¹	2,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	ND ²	1,6
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	2,6	2,9
<i>Streptococcus agalactii</i> ATCC 13813	1,8	2,2
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	ND	5
Bactérias Gram-negativas		
<i>Pseudomonas</i> sp.	- ⁴	-
<i>Salmonella</i> sp.	-	-
<i>Escherichia coli</i> INCP5 0031	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	-
Fungos leveduriformes		
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	1,7	1,4
<i>Candida glabrata</i> ATCC 40136	2,4	1,8
<i>Candida tropicalis</i> 24P	1,7	1,0
<i>Candida krusei</i> 6258	2,7	1,6
<i>Candida famata</i> RL08	2,9	1,7
<i>Trichosporon asahii</i> TAH05	2,4	1,3
Fungos filamentosos		
<i>Microsporium canis</i> 33	-	-
<i>Microsporium gypseum</i> 45	-	4,1
<i>Trichophyton rubrum</i> 42	1,6	-

¹Valores em cm obtido pela média de duas medidas do halo de inibição;

²ND - não determinado;

³ + presença de halo de inibição;

⁴ - ausência de halo de inibição;

Tabela 4: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* (OHP1) pela técnica de Disco-difusão para os isolados de *Enterococcus faecalis* resistentes a antibióticos.

<i>E. faecalis</i>	Atividade antimicrobiana		Resistência
	<i>H. alienus</i>	<i>H. psiadioides</i>	
ATCC29212	1,9	2,1	-
A8	2,1*	2,7	ERI
18b	1,8	2,8	BAC, TET
G12	ND	2,3	ERI, GEN, TET
LB	ND	1,7	CLO, EST, ERI, NORF, TET
114	1,7	3,2	BAC, TET
378	2,4	6,8	TET
3.3	1,6	1,4	ERI, TET
4.16	0,8	3,6	CLO, ERI, TET
3.20	ND	4,3	CIP
488	ND	3,5	CIP, TET
593	0,9	1,5	ERI, NORF
612	1,1	2,0	CIP, CLO, ERI, NORF
2389	ND	1,1	VAN

*Média do halo de inibição em centímetros; ND – Não determinado, +++ muito superior ao respectivo. BAC = Bacitracina; CIP = Ciprofloxacina; CLO = Cloranfenicol; ERI = Eritromicina; EST = Estreptomicina; GEN = Gentamicina; NORF= Norfloxacino; TET = Tetraciclina; VAN = Vancomicina.

de difusão em disco, observou-se a formação de halos de inibição contra todas as bactérias Gram-positivas, inclusive contra os isolados de *Enterococcus faecalis* resistentes a antimicrobianos. Surpreendentemente, os halos formados não apresentaram o padrão circular característico dos ensaios de antibiograma (Figuras 8A e 8B). Para todas as bactérias Gram-positivas, o valor médio dos halos de inibição do óleo de *H. psiadioides* (2,1 cm – 5 cm) foi superior quando comparado com o óleo de *H. alienus* (1,8 cm – 2,6 cm). No entanto, nenhum

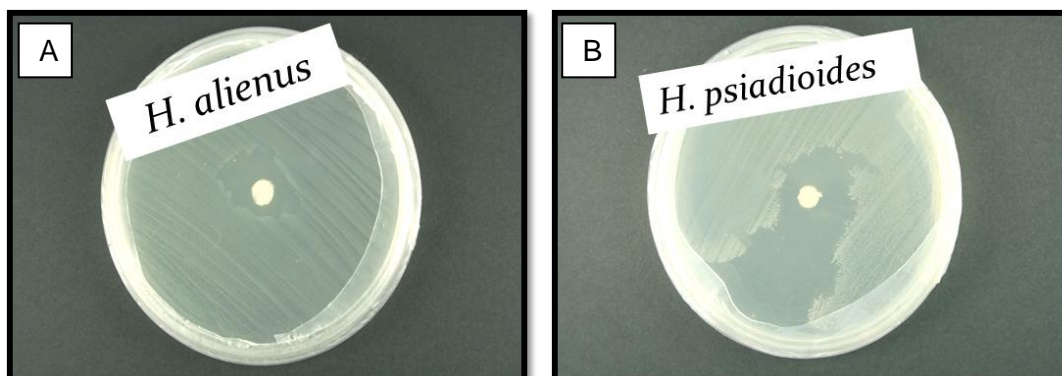


Figura 8: Halo de inibição formado pela ação dos óleos essenciais de *H. alienus* (A) e *H. psiadioides* (B) sobre *E. faecalis* ATCC 29212.

dos óleos inibiu o crescimento das bactérias Gram-negativas (Figura 9A e 9B). As leveduras foram inibidas por ambos os óleos essenciais (Figura 10A e 10B); porém ao contrário das bactérias, *H. alienus* mostrou atividade inibitória superior (1,7 cm – 2,9 cm) quando comparado a *H. psiadioides* (1 cm – 1,8 cm). Os óleos essenciais apresentaram atividade variada sobre os fungos filamentosos, como o caso *Trichophyton rubrum* 42 (Figura 11A e 11B), que foi inibido pelo óleo de *H. alienus* e cresceu normalmente quando em contato com o óleo de *H. psiadioides*. Notavelmente, *Microsporium canis* 33 não foi inibido por nenhum dos óleos essenciais.

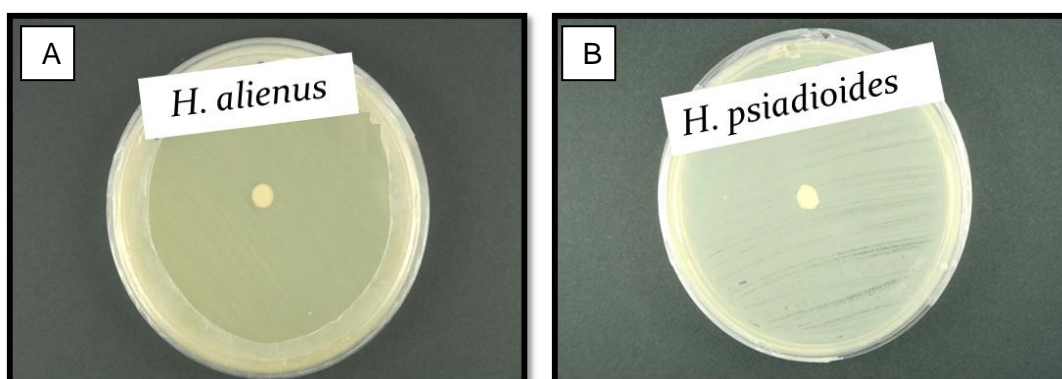


Figura 9: Ausência de halo de inibição pela ação dos óleos essenciais de *H. alienus* (A) e *H. psiadioides* (B) sobre *Pseudomonas* sp.

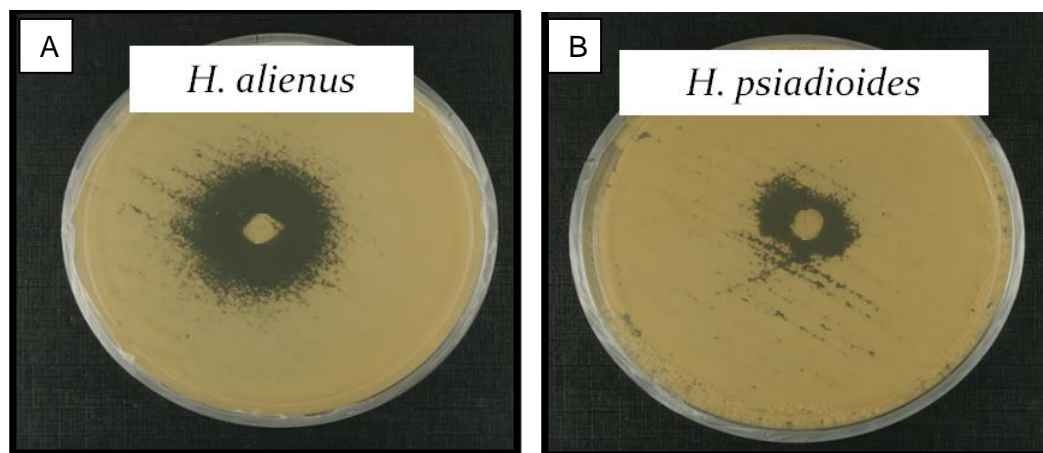


Figura 10: Halo de inibição formado pelos óleos essenciais de *H. alienus* (A) e *H. psiadioides* (B) sobre *Candida krusei* 6258.

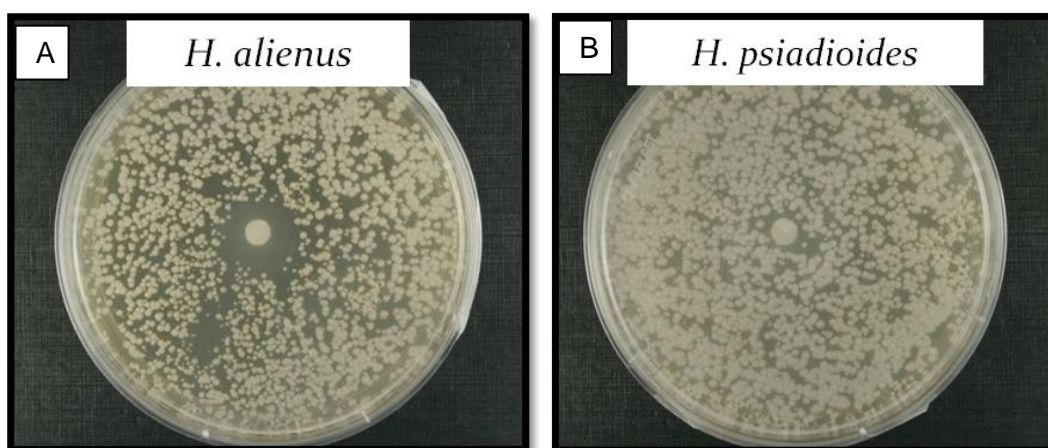


Figura 11: Halo de inibição formado pelos óleos essenciais de *H. alienus* (A) e sua ausência *H. psiadioides* (B) sobre *Trichophyton rubrum* 42.

4.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que foi possível determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *H. psiadioides* (OHP1) e do timol tanto pela técnica de diluição em agar quanto pelo ensaio de microdiluição em caldo.

Tabela 5: Valores de concentração inibitória mínima (%) para os óleos essenciais de *H. psiadioides* (OHP1 e OHP2) e o para o timol sobre *E. faecalis* e *S. epidermidis*.

Microrganismo	Diluição em Agar		Microdiluição em caldo		
	OHP1*	Timol**	OHP1*	OHP2*	Timol**
<i>Enterococcus faecalis</i>					
ATCC 29212	1,25	0,75	4	16	0,25
G12	>1,25	>1	16	-	0,5
I8b	>1,25	>1	16	-	0,5
LB	1,25	0,75	16	-	0,25
3.3	1,25	>1	16	-	0,5
3.20	1,25	>1	16	-	0,5
4.16	1,25	>1	16	-	0,5
593	1,25	0,75	16	-	0,5
612	1,25	>1	16	-	0,5
2389	1,25	0,75	4	16	0,25
1950	-	-	-	16	0,5
1953	-	-	-	8	0,5
2390	-	-	-	16	0,5
C10	-	-	-	16	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>					
ATCC 35984	-	-	16	16	0,5

*1,25% = 10,85mg/mL; 4% = 34,72mg/mL; 8% = 69,44 mg/mL; 16% = 138,88 mg/mL.

** 0,25% = 25 mg/mL; 0,5% = 50 mg/mL; 0,75% = 75 mg/mL; 1% = 100mg/mL.

(-) não avaliado

Nota-se que, para um mesmo isolado, a CIM dos óleos essenciais foi maior no cultivo em meio líquido em relação ao meio sólido, como por exemplo, para *E. faecalis* G12. No entanto, o contrário foi observado para o timol. Curiosamente, a cepa padrão *E. faecalis* ATCC 29212 e o isolado

resistente a vancomicina (2389) foram inibidos pelas mesmas concentrações nas duas técnicas realizadas, os quais constituem-se nas menores encontradas para CIM nesse estudo. Essas concentrações equivalem a 1,25 % e 4% de OHP1 para as técnicas de diluição em agar (Figura 12) e microdiluição, respectivamente, e 0,75% e 0,25% de timol para as técnicas de diluição em agar (Figura 13) e microdiluição, respectivamente. Além disso, a avaliação com OHP2 mostrou que isolados resistentes a vancomicina (2389, 1950, 1953 e 2390) também foram inibidos, com CIM variando entre 8% e 16%. Já o isolado C10, sensível a ampicilina, eritromicina, cloranfenicol, vancomicina, ciprofloxacina, tetraciclina e gentamicina, também apresentou CIM de 16%. Entre as concentrações avaliadas, não foi possível determinar a CBM para o óleo essencial; contudo, para o timol a CIM mostrou-se também ser a CBM.

4.4 Avaliação da atividade antibiofilme

A atividade do óleo essencial de *H. psiadioides* (OHP1) e do timol sobre a formação do biofilme microbiano foi testada sobre isolados de *E. faecalis* classificados como: não-formador de biofilme (*E. faecalis* ATCC 29212); fraco formador de biofilme (*E. faecalis* 3.3); moderado formador de biofilme (*E. faecalis* 2389) e forte formador de biofilme (*E. faecalis* C10 e *S. epidermidis* ATCC 35984). Os resultados estão apresentados na Tabela 6. De um modo geral, as concentrações avaliadas foram capazes de inibir a formação do biofilme, porém nenhuma levou a sua completa inibição.

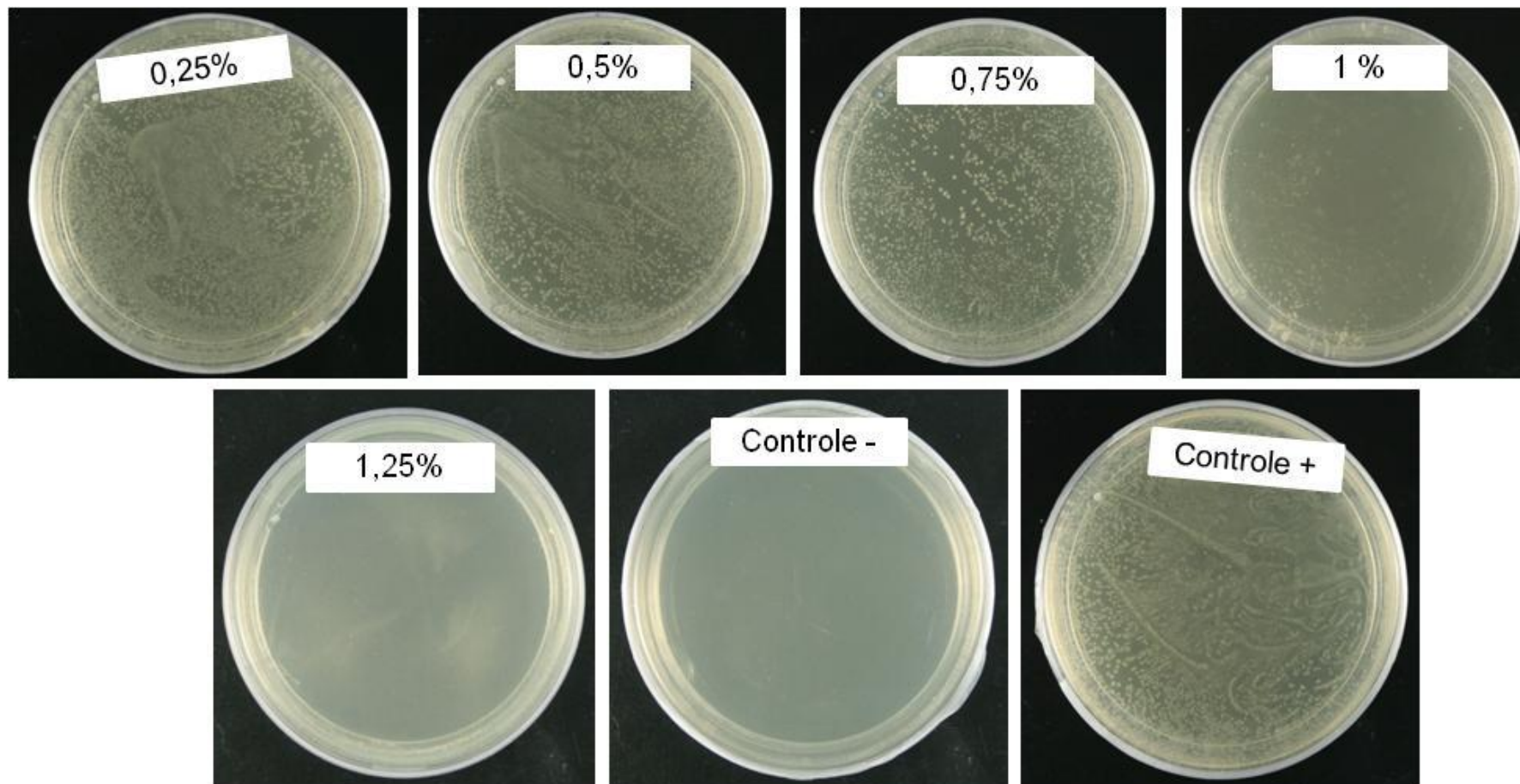


Figura 12: Determinação da concentração inibitória mínima de OHP1 para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 na técnica de Diluição em Agar.

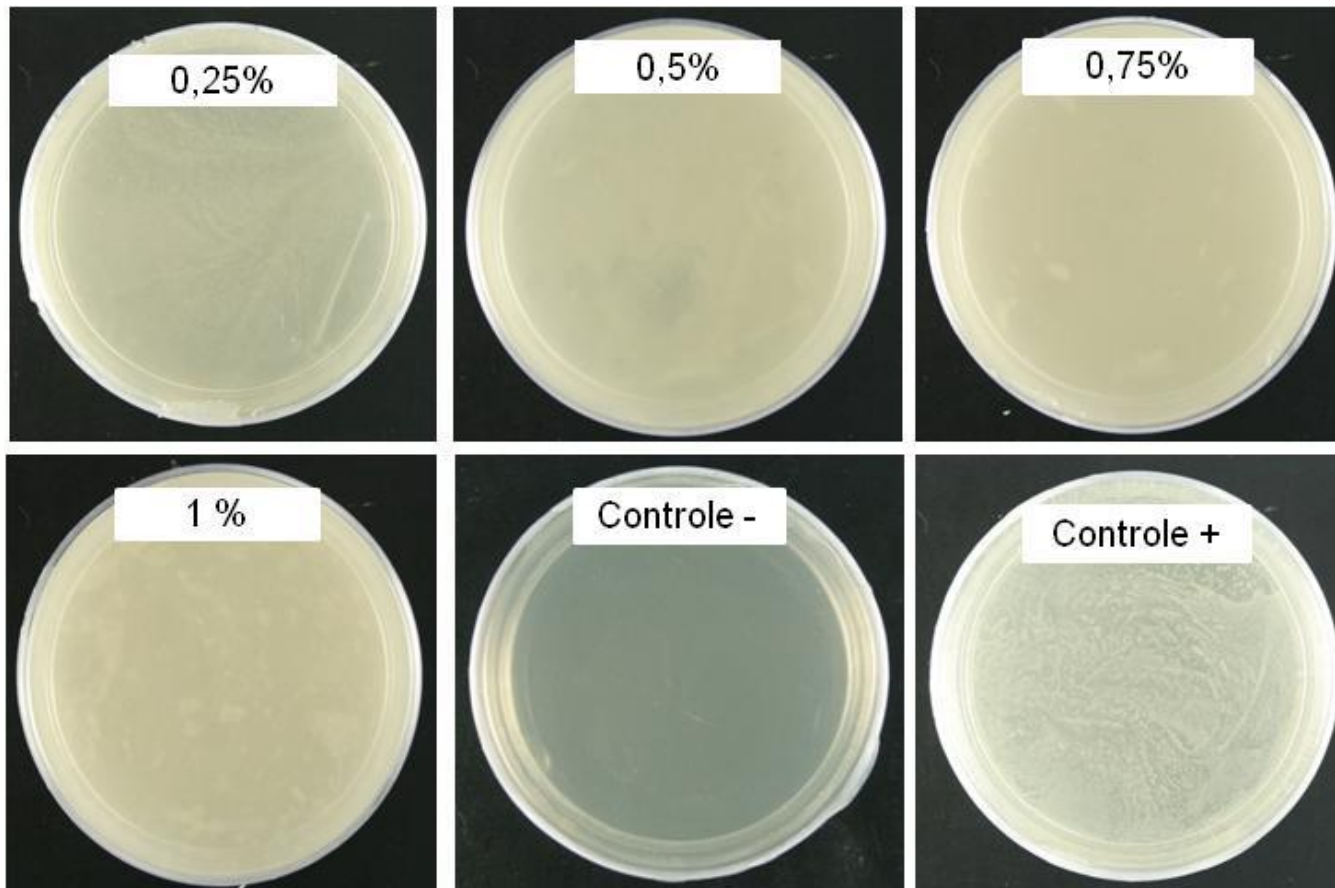


Figura 13: Determinação da concentração inibitória mínima de timol para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 na técnica de Diluição em Agar.

Tabela 6: Porcentagem de inibição do biofilme de *E. faecalis* e *S. epidermidis* sob a ação do óleo essencial de *H. psiadioides* (OHP1) e do timol.

Microrganismos	Padrão controle	OHP1 % de inibição (fenótipo)			Timol % de inibição (fenótipo)		
		CIM	0,5X CIM	0,25X CIM	CIM	0,5X CIM	0,25X CIM
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	C+ ^a (N)	17,1 ^a (N)	10,4 ^a (N)	1,9 ^a (N)	40,2 ^a (N)	32,1 ^a (N)	-58,0 ^b (N)
<i>E. faecalis</i> 3.3	C+ ^a (Fr)	30,2 ^b (Fr)	34,2 ^b (Fr)	61,3 ^c (N)	59,4 ^b (N)	59,8 ^b (N)	63,3 ^b (N)
<i>E. faecalis</i> 2389	C+ ^a (Md)	-35,8 ^a (Md)	-74,4 ^a (Md)	-112,1 ^b (Md)	61,2 ^c (N)	-8,6 ^b (Md)	-3,3 ^a (Md)
<i>E. faecalis</i> C10	C+ ^a (Ft)	52,7 ^b (Md)	40,0 ^b (Md)	30,4 ^b (Md)	75,4 ^b (N)	74,4 ^b (N)	67,8 ^b (N)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	C+ ^a (Ft)	75,8 ^b (Fr)	58,4 ^b (Md)	23,3 ^c (Md)	90,1 ^b (N)	90,7 ^b (N)	89,6 ^b (N)

Cada bactéria foi avaliada individualmente e os valores são expressos em porcentagem. Para cada bactéria e composto, letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0.05$). Valores negativos (-) indicam estímulo na formação de biofilme. Valores entre parênteses indicam o padrão de formação do biofilme. CIM = Concentração inibitória mínima. C+ = Controle positivo sem a adição do óleo essencial de *H. psiadioides*.

(N) = não formador de biofilme; (Fr) = fraco formador de biofilme; (Md) = Formador moderado de biofilme; (Ft) = Forte formador de biofilme

O efeito do óleo essencial na inibição da aderência microbiana a superfície de poliestireno foi significativo para *S. epidermidis* e para o *E. faecalis* isolado C10, os quais a CIM levou a inibição de formação de biofilme na ordem de 75,8% e 52,7%, respectivamente, além de alterar o padrão de formação de forte para fraco. Mesmo para *E. faecalis* ATCC 29212, considerada não formador de biofilme, houve redução na aderência a superfície nas concentrações avaliadas. No entanto, para o isolado *E. faecalis* 3.3 a maior inibição de biofilme (61,3%) foi obtida com 0,25XCIM, a menor concentração testada. Já para o isolado *E. faecalis* 2389 houve estímulo na

formação do biofilme em todas as concentrações quando comparado com o grupo controle, apesar de o padrão de formação moderado de biofilme não ter alterado.

O timol inibiu significativamente o biofilme das bactérias consideradas formadoras de biofilme. Houve inibição superior a 50% para *E. faecalis* isolado C10 e 3.3 e para *S. epidermidis*, a qual se destacou por sofrer em torno de 90% de inibição nas três concentrações avaliadas. A cepa ATCC 29212 de *E. faecalis* teve sua formação de biofilme inibida em 40,2% pela CIM, sendo que 0,25XCIM estimulou a formação de biofilme. A CIM inibiu em 61,2% a aderência microbiana para o isolado *E. faecalis* 2389; contudo, assim como o óleo essencial, as concentrações de 0,5XCIM e 0,25XCIM do timol estimularam a formação do biofilme. Com exceção dessas últimas, o timol modificou o padrão das bactérias para não formadoras de biofilme nas concentrações avaliadas.

Para o ensaio de erradicação foram avaliados os isolados classificados como moderado (*E. faecalis* 2389) e fortes formadores (*E. faecalis* C10 e *S. epidermidis* ATCC 35984). Tanto o OHP2 quanto o timol foram capazes de reduzir o biofilme formado por 24 h quando aplicados sobre ele por 2h, mas nenhuma concentração levou a sua erradicação completa (Tabela 7).

Como esperado, o efeito de erradicação de biofilme para *S. epidermidis* ATCC 35984 foi menor quando comparado ao teste de inibição de biofilme para os dois compostos avaliados, pois nenhuma concentração alterou significativamente o padrão forte formador de biofilme. As maiores reduções obtidas foram 15,3% para a CIM do OHP2 e 11,3% para 0,5XCIM do timol.

Tabela 7: Porcentagem de erradicação do biofilme de *E. faecalis* e *S. epidermidis* sob a ação do óleo essencial de *H. psiadioides* (OHP2) e do timol por 2 h.

Microrganismos	Padrão controle	OHP2 % erradicação (Fenótipo)		Timol % erradicação (Fenótipo)	
		CIM	0,5XCIM	CIM	0,5XCIM
<i>E. faecalis</i> 2389	C+ ^a (Md)	41,8 ^b (Fr)	34,4 ^a (Fr)	48,1 ^b (Fr)	32,0 ^a (Fr)
<i>E. faecalis</i> C10	C+ ^a (Ft)	67,5 ^b (Md)	20,2 ^a (Ft)	64,6 ^b (Md)	77,5 ^b (Md)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	C+ ^a (Ft)	15,3 ^a (Ft)	-0,3 ^a (Ft)	5,1 ^a (Ft)	11,3 ^a (Ft)

Cada bactéria foi avaliada individualmente e os valores são expressos em porcentagem. Para cada bactéria e composto, letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0.05$). Valores negativos (-) indicam estímulo na formação de biofilme. Valores entre parênteses indicam o padrão de formação do biofilme. CIM = Concentração inibitória mínima. C+ = Controle positivo sem adição do óleo essencial de *H. psiadioides*.

(N) = não formador de biofilme; fraco formador de biofilme; (Md) = Formador moderado de biofilme; (Ft) = Forte formador de biofilme.

Para *E. faecalis* isolado C10 os resultados foram semelhantes nos dois testes, destacando-se a CIM do óleo essencial - o qual reduziu o biofilme significativamente em 67,5% - e as duas concentrações do timol, que alteraram o padrão de formação do biofilme de forte pra moderado. No entanto, o efeito estimulante de biofilme não se repetiu para *E. faecalis* isolado 2389, indicando que para tal isolado a ação do óleo essencial e do timol sobre o biofilme pode depender do momento de aplicação. Para esse isolado, a CIM de ambos compostos reduziu significativamente o biofilme e alterou o padrão de formação de moderado para fraco.

Além da redução da carga microbiana aderida a superfície, foi possível também verificar uma inibição da atividade metabólica das células que compõe os biofilmes nas duas condições avaliadas. No teste de inibição de

formação de biofilme, com algumas exceções houve redução na atividade metabólica dos biofilmes tratados em comparação com o grupo controle (Figura 14). Em especial, tanto a CIM quanto 0,5XCIM do OHP1 levaram a uma redução significativa no metabolismo de *S. epidermidis* ATCC 35984, sendo que a CIM também foi a mais eficaz para *E. faecalis* C10 e 3.3. Em acordo com os resultados da técnica de Cristal Violeta, o biofilme do isolado *E. faecalis* 2389 apresentou estímulo na atividade metabólica em relação ao controle, mostrando correspondência entre o aumento do número de células e do metabolismo do biofilme. O timol, com exceção do isolado resistente a vancomicina, reduziu significativamente a atividade metabólica das demais bactérias nas três concentrações analisadas (Figura 15).

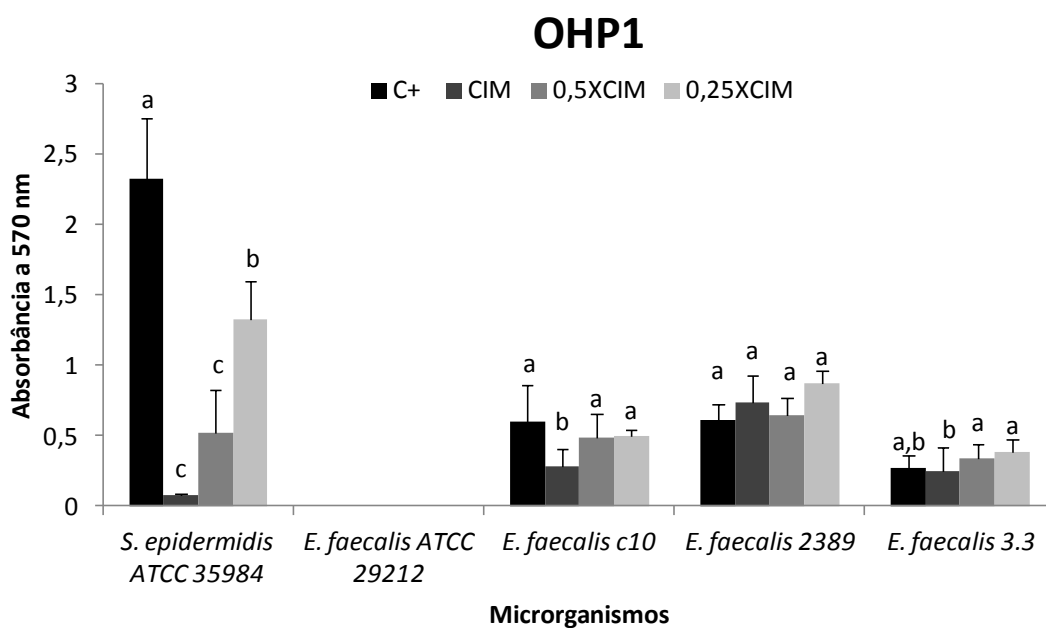


Figura 14: Avaliação da atividade metabólica pela técnica de MTT simultaneamente ao teste de inibição de formação de biofilme para o OHP1. Para um mesmo microrganismo letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$). ND = não determinado.

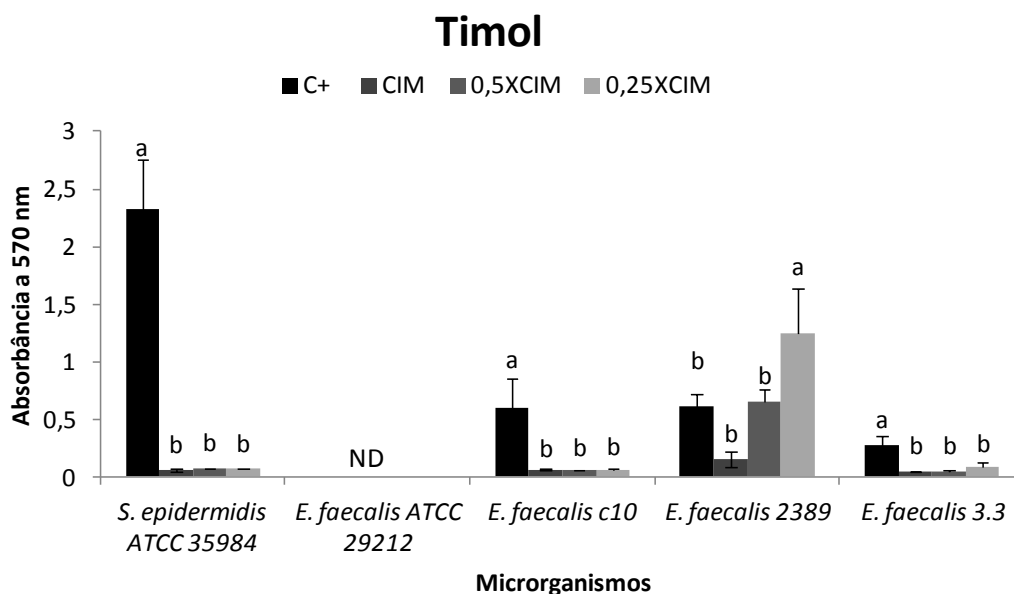


Figura 15: Avaliação da atividade metabólica pela técnica de MTT simultaneamente ao teste de inibição de biofilme para o timol. Para um mesmo microorganismo letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$). ND = Não determinado

Quando avaliados os resultados do teste MTT em relação ao teste de erradicação de biofilme (Figura 16) verificamos que as diferentes concentrações dos compostos diminuíram a atividade metabólica associada aos biofilmes, embora no caso do OHP2 apenas a CIM para o isolado *E. faecalis* 2389 a tenha inibido significativamente. Assim como no teste de inibição de formação de biofilme, o timol foi mais eficiente em inibir a metabolização microbiana, inclusive sobre o isolado citado acima.

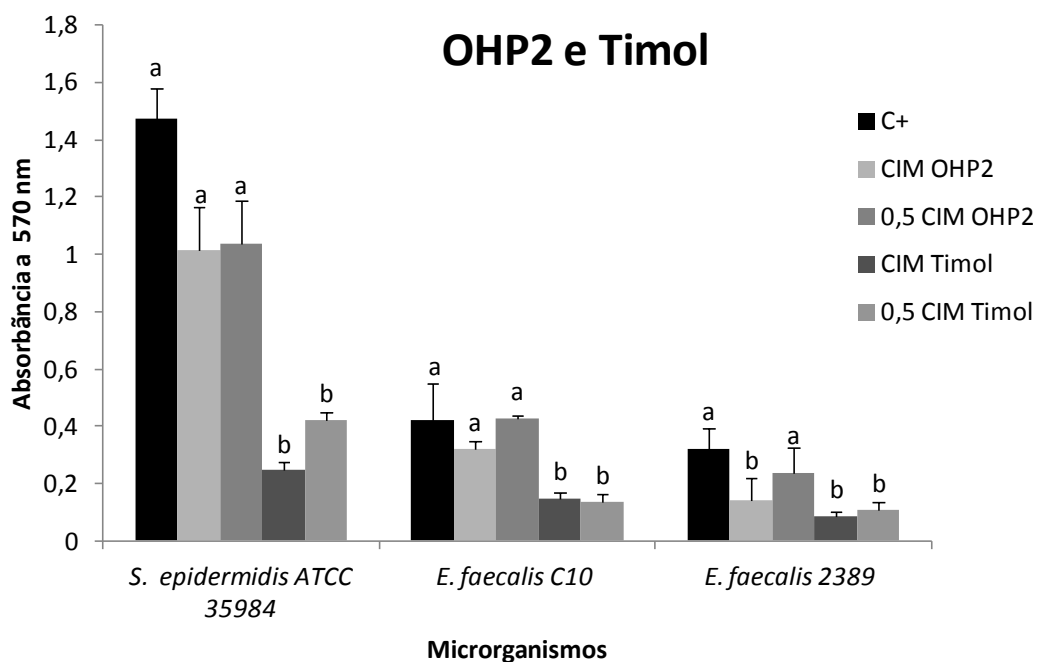


Figura 16: Avaliação da atividade metabólica pela técnica de MTT simultaneamente ao teste de erradicação de biofilme. Para um mesmo microrganismo e composto, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo (C+).

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Sobre a superfície de aço inox e poliestireno, *E. faecalis* isolado C10 forma um biofilme complexo, tridimensional, com células evidentes e canais típicos de biofilmes bacterianos (Figura 17a, b, e, f). A ação do óleo essencial de *H. psidioides* (OHP2) inibe a formação do biofilme na superfície de aço inox, levando as células a formarem pequenos grupos e não se agregarem em uma estrutura característica de biofilme (Figura 17c, d). O mesmo ocorre sobre a superfície de poliestireno, onde é observado mais contato célula-superfície do que entre as células (Figura 17g, h).

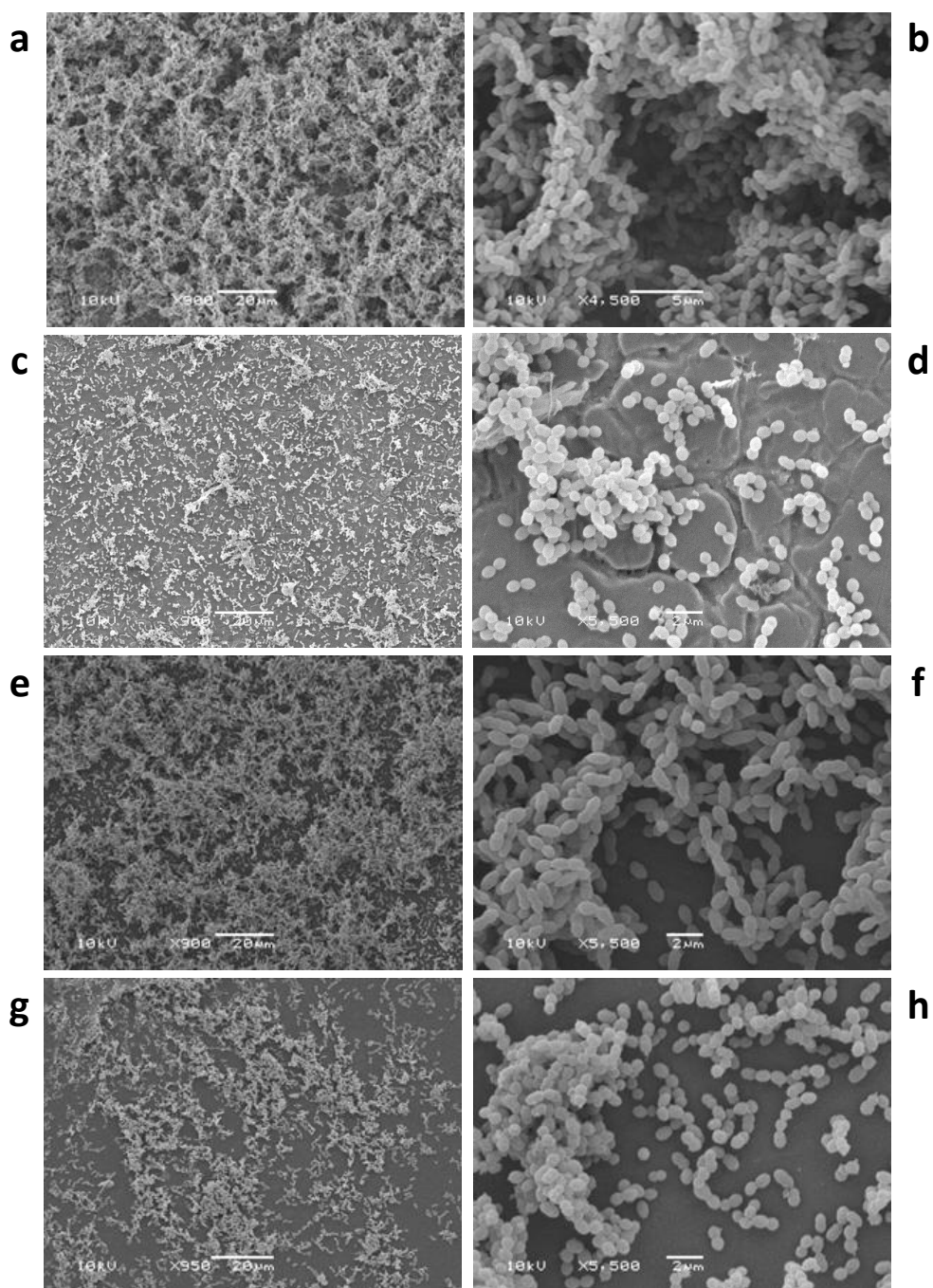


Figura 17: Imagens do MEV para biofilmes de *E. faecalis* isolado C10 formado em: Superfície de aço inox – controle positivo (a) aumento X900 e (b) aumento X4.500; CIM OHP2 (c) aumento X900 e (d) aumento X5.500. Superfície de poliestireno – controle positivo (e) aumento X900 e (f) aumento X5.500; CIM OHP2 (g) aumento X950 e (h) aumento X5.500.

5. DISCUSSÃO

5.1 Composição química dos óleos essenciais

Em acordo com relatos anteriores da literatura para os óleos essenciais de *Heterothalamus* (Duschatzky et al., 2007; Schmidt-Silva, 2012) os compostos monoterpênicos também estavam presentes em maiores quantidades nos óleos essenciais de *H. psiadioides* empregados no presente estudo. No entanto, quando comparados entre si, OHP1 e OHP2 apresentaram variação na porcentagem dos compostos mono- e sesquiterpênicos. Essa diferença na composição pode estar relacionada com alterações ambientais, uma vez que os cuidados de padronização da coleta, extração, cromatografia e estocagem dos óleos essenciais foram devidamente tomados. Segundo Simões & Spitzer (2007) a composição do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas condições ambientais são capazes de causar variações significativas nessa composição.

A técnica de CG-MS utilizada permite a identificação tentativa dos compostos, baseada no reconhecimento estrutural e no espectro de massa do composto a ser identificado quando se observa sua similaridade com um

composto de um banco de dados específico (Stashenko & Martínez, 2010). Em relação a óleos essenciais, sabe-se que a identificação de terpenos é difícil, pois alguns dos compostos presentes apresentam espectros de massas similares (especialmente os sesquiterpenos) e muitas co-eluições podem ocorrer, prejudicando a correta identificação e o processo de quantificação (Shellie & Marriot, 2003). Mesmo assim, os compostos químicos em maior porcentagem foram identificados, sendo o β -pineno o majoritário.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides*. De acordo com as metodologias empregadas, os óleos essenciais avaliados apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, fungos leveduriformes e filamentosos. O óleo de *H. psiadioides* foi mais eficiente para controlar bactérias Gram-positivas, enquanto o óleo de *H. alienus* foi mais eficaz contra fungos leveduriformes e filamentosos. Embora a composição química seja semelhante entre ambos, as variações nas concentrações dos componentes podem ter influenciado os resultados encontrados no *screening* inicial. Até o momento, não existem muitos dados na literatura que avaliam a atividade antimicrobiana destes óleos frente a bactérias; apenas o óleo essencial de *H. alienus* teve sua ação antifúngica relatada por Pacciaroni et al. (2008).

A técnica de Disco-difusão surpreendeu em virtude dos halos de inibição irregulares observados contra todos os microrganismos Gram-positivos avaliados. Técnicas como essa, preconizadas pelo CLSI, avaliam a ação antimicrobiana de antibióticos convencionais e não devem ser seguidas a risca

devido às propriedades químicas apresentadas pelos óleos essenciais. A distribuição desigual dos componentes lipofílicos na superfície do Agar resulta em concentrações desiguais causando a formação de regiões com atividade microbiana variável, o que pode ser o responsável pela irregularidade dos halos de inibição (Nascimento et al., 2007; Hood et al., 2003).

A sensibilidade das bactérias Gram-positivas frente aos óleos essenciais é um importante achado do nosso estudo, principalmente pela ação inibitória contra isolados de *E. faecalis* resistentes e multirresistentes a agentes antimicrobianos. Em especial, o óleo de *H. psiadioides* se destacou pela inibição de isolados de enterococos resistentes à vancomicina, fato de relevada importância na clínica médica. Desde seu isolamento, o ERV se tornou uma preocupação frequente, uma vez que vancomicina é considerada a última alternativa antibiótica para tratamento de infecções relacionadas à assistência a saúde (Riboldi et al., 2009).

Selim (2011) avaliou a ação de óleos essenciais de plantas de diferentes famílias sobre *E. faecalis* resistente a vancomicina e *Escherichia coli* O157:H7. A autora verificou que os óleos essenciais foram eficientes contra ambos os microrganismos, sendo que a CIM pela técnica de diluição em agar variou entre >2 % e 0,25%, valores similares aos encontrados para os óleos de *Heterothalamus* com a mesma técnica. Outro estudo mostrou que o óleo essencial de *Cleistocalyx operculatus* (Myrtaceae), composto principalmente por mono- e sesquiterpenos, foi eficaz contra microrganismos como *S. aureus* resistente a metilicina e ERV (Dung et al., 2008). Essas informações, aliadas

ao presente estudo, contribuem na busca de formas de controlar infecções por ERV.

A ação de dois dos principais compostos fitoquímicos, α -pineno e β -pineno, dos óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* sobre cocos Gram-positivos foi determinada por Leite et al. (2007). Nesse estudo, os autores observaram que valores de CIM até 40 $\mu\text{L/mL}$ de β -pineno e até 20 $\mu\text{L/mL}$ de α -pineno inibiram o crescimento de espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* potencialmente causadoras de endocardites, inclusive cepas resistentes à penicilina e gentamicina. Esses resultados indicam que α -pineno e β -pineno, além de majoritários, podem ser os responsáveis pela ação antimicrobiana determinada no nosso estudo. No entanto, alguns estudos relatam que o óleo essencial puro pode ter um efeito biológico superior quando comparado com a ação de seus fitoquímicos isolados, sugerindo que os componentes minoritários são também críticos para a atividade e podem ter um efeito sinérgico (Carson et al., 2002; Burt, 2004).

A ausência de ação antimicrobiana frente aos microrganismos Gram-negativos está de acordo com muitos estudos encontrados na literatura. Alguns autores relatam que as bactérias Gram-negativas são ligeiramente menos sensíveis a óleos essenciais quando comparadas com bactérias Gram-positivas devido à sua superfície altamente hidrofílica, a qual bloqueia a penetração de compostos hidrofóbicos e evita a acumulação do óleo essencial na membrana da célula-alvo. Os ácidos lipoteicóicos da membrana das células Gram-positivas facilitariam a entrada de compostos hidrofóbicos (Canillac & Mourey, 2001; Bezić et al, 2003).

A composição do óleo essencial também pode influenciar no seu espectro de ação. Utilizando o óleo essencial de *Picea excelsa* (Pinaceae), Canillac & Mourey (2001) verificaram que concentrações de até 0,06% inibiram o crescimento de microrganismos Gram-positivos isolados de queijo, como *L. monocytogenes* e *S. aureus*; no entanto, o mesmo óleo essencial não inibiu isolados de bactérias Gram-negativas, entre elas *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, na concentração de 16%, a mais alta avaliada. Os compostos majoritários do óleo essencial de *P. excelsa* estudado são β -pineno (26,41%), α -pineno (16,43%), limoneno (10,9%) e canfeno (9,5%), compostos monoterpênicos também presentes nos óleos das espécies de *Heterothalamus*, porém em concentrações diferentes. Esses resultados indicam que esses compostos podem não ter efeito contra bactérias Gram-negativas. Além disso, outros relatos sugerem que as bactérias Gram-negativas são susceptíveis a óleos essenciais com grandes quantidades de compostos fenólicos e oxigenados, como carvacrol, timol, eugenol e geraniol (Burt, 2003; Bilge Oral et al., 2010; Cândido et al., 2010).

Como esperado, o timol foi eficaz em inibir o crescimento de cocos Gram-positivos, inclusive isolados resistentes a antibióticos, tanto em meio líquido como em meio sólido. O óleo essencial de orégano e seus dois compostos majoritários, carvacrol e timol, tem sua atividade antibacteriana bem relatada na literatura científica. Nostro et al. (2007) estudando a ação do óleo essencial de orégano e seus compostos majoritários sobre cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, encontraram valores de CIM até 0,125%, sendo que para o timol o maior valor foi 0,062% para um isolado de infecção ocular de *S. aureus*.

Em todos os casos, a CBM foi o dobro da CIM. Da mesma forma, Bilge Oral et al. (2010) determinaram a CIM entre 0,1% e 0,8% para isolados de *Staphylococcus* sp. e *E. coli* para o óleo essencial de orégano. Em função da natureza hidrofóbica, esses compostos interagem com a membrana celular, aumentando sua permeabilidade e levando a perda de material, como íons fosfato e ácidos nucleicos, e alteração do pH interno (Ultee et al, 1999; Lambert et al., 2001).

Outro resultado importante encontrado foi à ação antifúngica apresentada pelos óleos essenciais. A sensibilidade de células eucarióticas aos óleos utilizados nesse estudo já foi demonstrada sobre células de raiz de cebola e alface, as quais os compostos volatilizados dos óleos essenciais induziram alterações no índice mitótico e anormalidades cromossômicas (Schmidt-Silva et al., 2011). Assim, se acreditava que as células fúngicas também sofreriam algum tipo de alteração quando expostas aos óleos essenciais e, conseqüentemente, alteração no seu desenvolvimento e/ou crescimento. Ao contrário dos halos de inibição obtidos para as bactérias, os halos contra os fungos mantiveram o padrão circular característico de teste de disco-difusão, possivelmente em virtude do volume e peso maiores das células eucarióticas em relação às procarióticas, o que poderia causar “resistência” a dispersão irregular dos componentes dos óleos essenciais sobre o meio de cultura.

Todas as leveduras avaliadas foram sensíveis à ação dos óleos essenciais, com inibição levemente superior para o óleo essencial de *H. alienus*. Estudos relatam que o possível alvo de ação dos componentes dos

óleos essenciais contra fungos é a membrana plasmática celular. Ahmad et al. (2011) mostraram que o óleo essencial da espécie *Coriaria nepalensis* causou alteração na membrana citoplasmática em 80% das células do gênero *Candida* avaliadas, indicando que o mecanismo de ação do óleo testado envolve uma lesão na membrana celular, seguido da morte da célula. Nesse mesmo estudo, os autores também verificaram diminuição na produção de ergosterol - um lipídio característico da membrana desses microrganismos - sendo sua síntese bloqueada na CIM do óleo essencial. Outros estudos com óleos essenciais e seus componentes sobre *Candida* sp. sugerem ação antibiofilme e diminuição da atividade metabólica de cepas padrão e isolados clínicos (da Silva et al., 2012; Grumezescu et al., 2012; Palmeira-de-Oliveira et al., 2012).

Ao contrário das leveduras, a ação contra fungos filamentosos foi variada. Enquanto *M. gypseum* 45 e *T. rubrum* 42 foram inibidos pelo óleo essencial de *H. alienus*, *M. canis* 33 apresentou crescimento normal, mesmo sendo exposto ao óleo essencial puro. No estudo realizado por Pacciaroni et al. (2008), o extrato metanólico de *H. alienus* e seus compostos isolados – como sakuranetina e (2R,3R)-Dihidroquercetina-7-3'-4'-trimetil-éter – foram eficazes em inibir o crescimento de fungos dessas espécies em concentrações de até 1000, 62,5 e 125 µg/mL, respectivamente. Outro estudo realizado por Moreira et al. (2007) investigou os efeitos inibitórios do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) e do β-pineno, um dos seus compostos majoritários, sobre fungos filamentosos de diversos gêneros. Os valores da CIM apresentaram intenso efeito fungicida, com exceção das cepas *Cladosporium resinae* e *Chaetomium globosum*, as quais se mostraram

resistentes ao fitoquímico β -pineno. Isso pode indicar que o β -pineno exerce um efeito sinérgico com outros fitoquímicos presentes no óleo essencial. No presente estudo, mesmo os óleos essenciais puros não foram completamente eficazes em eliminar os fungos filamentosos testados, indicando que não apenas a composição do óleo essencial, mas também as características das cepas influenciem a atividade antifúngica.

5.3 Avaliação da atividade antibiofilme

De modo geral, o óleo essencial de *H. psiadioides* e o timol foram capazes de inibir a formação e reduzir o biofilme previamente formado por 24h de *S. epidermidis* e *E. faecalis*. Infecções por bactérias Gram-positivas, especialmente por estafilococos e enterococos, tem se mostrado particularmente difíceis de serem tratadas com as terapias atuais devido à resistência natural e adquirida a antibióticos. Além disso, quando em biofilme, as células tem mostrado reduzida susceptibilidade ao sistema imune do hospedeiro bem como a agentes antimicrobianos, como antibióticos e desinfetantes (Raad et al., 1995; O'Toole et al., 2000; Donlan, 2002).

A aderência microbiana a superfície é o estágio inicial da formação do biofilme, seguido do condicionamento da superfície (Kumar & Anand, 1998) por meio da adsorção de nutrientes, moléculas orgânicas e inorgânicas importantes para o crescimento celular e que promovam a adesão celular (Sandasi et al., 2010). A adição de OHP1 e timol junto aos microrganismos antes da formação do biofilme pode, além de eliminar uma parte das células planctônicas que formariam o biofilme, condicionar a superfície abiótica tornando-a menos propícia à adesão celular. Ambos os compostos inibiram

significativamente ($p < 0.05$) a formação do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. faecalis* C10, microrganismos considerados fortes formadores de biofilme, tanto na CIM quanto em concentrações menores.

De modo geral, o uso de compostos naturais para condicionar as superfícies e fazê-las menos apropriadas a adesão parece ser uma abordagem útil para lidar com a adesão microbiana em ambientes de processamento de alimentos (Sandasi et al., 2010). Por exemplo, biossurfactantes, como surfactina (um lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*) e ramnolipídio (um glicolipídio produzido por *P.aeruginosa*) tornam a superfície de poliestireno menos hidrofóbica e, conseqüentemente, reduzem a adesão celular, podendo ser explorados para controlar a adesão microbiana a superfícies e desagregação de biofilmes (Gomes & Nitschke, 2012).

No entanto, a presença de certos compostos em extratos de plantas também pode proporcionar a formação de um filme condicionante promovendo a adesão microbiana (Sandasi et al., 2010). Por exemplo, lecitinas de plantas comestíveis podem se ligar a células da mucosa da boca e funcionar como receptores de glicanos de bactérias, aumentando a adsorção e a aderência microbiana (Ofek et al., 2003). No nosso estudo, após exposição a OHP1 e ao timol, foi detectado aumento na formação de biofilme para isolado de *E. faecalis* resistente a vancomicina (2389) nas concentrações avaliadas, com exceção da CIM para o timol. Sandasi et al. (2008) verificaram que cinco monoterpenos comuns em óleos essenciais, entre eles α -pineno e limoneno, aumentaram exponencialmente a massa do biofilme formado por *L. monocytogenes*. Segundo os autores, a falta de capacidade em inibir o

crescimento do biofilme pelos componentes dos óleos essenciais confirma que biofilmes são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que bactérias planctônicas. Mesmo com o estímulo na formação de biofilme, o isolado ERV permaneceu apresentando um perfil fenotípico de formador moderado de biofilme.

De acordo com Nostro et al. (2007) os óleos essenciais podem também interagir com proteínas da superfície celular – como o fator de virulência Esp - levando a sua alteração e em parte comprometendo a fase inicial de aderência microbiana a placas de poliestireno. Além disso, podem também afetar o sistema de *quorum sensing* das células presentes em um biofilme. Kerekes et al. (2013) verificaram que óleos essenciais de diferentes espécies atuam como inibidores de *quorum sensing*, interferindo com a produção de violaceína - um pigmento produzido pela bactéria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum* - cuja síntese é controlada pelo sistema de *quorum sensing*. Os óleos essenciais continham como compostos majoritários substâncias terpênicas, as quais não foram tão eficazes em inibir a comunicação celular quanto testadas isoladamente. Novas análises deverão ser realizadas para verificar se a ação do óleo essencial de *H. psiadioides* se dá por condicionamento da superfície abiótica e/ou alterações na superfície celular.

Quando os compostos foram aplicados sobre biofilmes formados por 24h, apesar da redução significativa da carga microbiana associada a *E. faecalis*, não foi verificado erradicação do biofilme. Segundo Mah & O'Toole (2001), múltiplos mecanismos, que variam com a bactéria e com o biocida

aplicado são responsáveis pela resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos. Como barreira inicial, a matriz de exopolissacarídeo (EPS) previne o acesso de certos antibióticos às células bacterianas embebidas na comunidade de um biofilme. Outras características como a formação de um biofilme denso, crescimento lento das células, heterogeneidade (gradientes de nutrientes, metabólitos e fatores de sinalização dentro do biofilme), resposta ao estresse iniciado por crescer dentro do biofilme, *quorum sensing* e alterações fenotípicas, estão também relacionadas a resistências encontradas em biofilmes.

Cândido et al. (2010) verificaram que o óleo essencial de *Myrcia ovata* (Myrtaceae) reduziu o biofilme formado por *E. faecalis* ATCC 29212 quando aplicado sobre ele por 10 minutos em uma concentração equivalente a 16XCIM. Comparativamente, no nosso estudo, a CIM do OHP2 também levou a redução do biofilme quando aplicado sobre ele por 2 h. Ambos os óleos essenciais possuem monoterpenos como seus componentes principais. Claramente, há uma relação entre a concentração de óleos essenciais e o tempo de contato com o biofilme, indicando que esses fatores devem ser otimizados em análises futuras. Da mesma forma, outros trabalhos mostram que o estágio do desenvolvimento do biofilme também influencia na atividade de óleos essenciais, sendo eles mais eficazes em inibir a adesão inicial celular em comparação com biofilmes pré-formados (Sandasi et al., 2010; Jadhav et al., 2013).

Segundo Nostro et al. (2007), concentrações de 0,5% de timol são suficientes para erradicar o biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35984

com o tempo de contato de 24 h. No nosso estudo, a mesma concentração não foi tão eficiente sob 2 h de tempo de contato, levando apenas a uma leve redução do biofilme, tanto para o timol quanto para o OHP2. Possivelmente, o timol não teve tempo suficiente para se difundir através da matriz de EPS e desestabilizar o biofilme. No entanto, no mesmo período o timol foi eficiente em reduzir o biofilme de *E. faecalis*, indicando que essas cepas são mais sensíveis ao timol e/ou produzem uma quantidade menor de EPS em comparação com *S. epidermidis*.

Embora os ensaios antibiofilme tenham, no geral, informado que os compostos estudados são eficazes em diminuir a carga microbiana dos biofilmes, eles não fornecem informações sobre a viabilidade das células que ali estavam. Segundo Koudhi et al. (2010), o ensaio MTT cora células viáveis e aderidas à superfície, enquanto o ensaio Cristal Violeta cora todas as células aderidas, sejam ou não viáveis. Quando comendo um biofilme, as células microbianas apresentam reduzida atividade metabólica devido ao lento crescimento, limitação de nutrientes e suplemento de oxigênio (Costerton et al., 1999; Mah & O'Toole, 2001). De fato, muitos agentes antimicrobianos, como β -lactâmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas, são efetivos contra células de crescimento rápido, porém menos eficientes contra células de crescimento lento comendo um biofilme (Lewis, 2001).

No presente estudo, os resultados do ensaio MTT comprovam que o óleo essencial de *H. psiadioides* e o timol não apenas inibiram o biofilme bacteriano, como também reduziram a atividade metabólica das células associadas, embora nem sempre com diferença significativa em relação ao

controle. A diminuição do metabolismo celular pode ser explicada pelo fato de que a maioria dos óleos essenciais são hidrofóbicos e mantêm-se associados as paredes celulares ricas em lipídios, possivelmente levando ao aumento da permeabilidade e eventualmente a morte celular (Jadhav et al., 2013).

A fim de verificar o possível alvo de ação do óleo essencial de *H. psiadioides*, foi realizado um estudo de Microscopia Eletrônica de Varredura com *E. faecalis* isolado C10, considerado forte formador de biofilme. Essa é uma ferramenta valiosa para melhorar a compreensão do impacto qualitativo e quantitativo de amostras sobre as bactérias (Trentin et al., 2011). Para tanto, além da superfície de poliestireno, a superfície de aço inox foi adicionada a análise por ser uma superfície comum em ambientes industriais e de processamento de alimentos. No geral, assume-se que a superfície de poliestireno é hidrofóbica e o aço inox é hidrofílica, sendo que superfícies hidrofóbicas são apontadas como as mais favorecedoras da adesão microbiana (Djordjevic et al., 2002). No entanto, alguns relatos da literatura discordam da natureza do aço inox, considerando-o também hidrofóbico (Sinde & Carballo, 2000).

Claramente, as micrografias confirmam a habilidade de *E. faecalis* C10, isolado a partir de cenoura, de aderir-se a superfícies abióticas e de formar uma estrutura complexa e densa de biofilme em ambientes de processamento de alimentos. Tanto na superfície de poliestireno quanto na de aço inox observou-se uma redução no número de células das amostras tratadas com o óleo essencial em comparação com as amostras não tratadas. A análise do biofilme tratado não permitiu verificar lesões ou alterações nas

superfícies celulares das células individuais, indicando que o efeito do OHP2 influencia diretamente a adesão microbiana às superfícies estudadas. Essas informações corroboram os resultados obtidos nas análises anteriores e permitem especular sobre o possível alvo da ação antibiofilme do óleo essencial de *H. psidioides*.

6. CONCLUSÕES

A composição química dos óleos essenciais das espécies de *Heterothalamus* constitui-se de compostos mono- e sesquiterpênicos, sendo o componente majoritário o β -pineno, o qual os dados da literatura indicam ser um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana de certos óleos essenciais.

Os óleos essenciais de *H. alienus* e *H. psiadioides* possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e alguns fungos que causam importantes infecções hospitalares.

Os óleos essenciais de *H. alienus*, *H. psiadioides* e o timol apresentam atividade antimicrobiana contra isolados de *Enterococcus faecalis* resistentes e multirresistentes a antibióticos, fato de relevada importância no atual cenário clínico mundial, principalmente quando considerada a atividade contra os isolados resistentes a vancomicina.

Concentrações inibitórias mínimas de até 16% dos óleos essenciais de *H. psiadioides* e 0,5% de timol são capazes de inibir o crescimento microbiano em cultivo em meio líquido. Em especial, a CIM de 4% do OHP1 é capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis* resistente a vancomicina.

Os óleos essenciais de *H. psiadioides* e o timol possuem atividade antibiofilme sobre *S. epidermidis* e *E. faecalis*, tanto inibindo a formação quanto

diminuindo o biofilme microbiano pré-formado. Essas substâncias são também responsáveis pela redução da atividade metabólica associada aos biofilmes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou um estudo inicial sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies do gênero *Heterothalamus*. Para corroborar os dados obtidos e fornecer novas informações sobre as propriedades antimicrobianas desses compostos novas abordagens devem ser seguidas, entre elas:

- Verificar a ação do β -pineno como possível composto ativo dos óleos essenciais de *Heterothalamus*;
- Determinar o(s) alvo(s) de ação dos componentes dos óleos essenciais de *Heterothalamus*, bem como a relação entre concentração e tempo de contato, sobre cocos Gram-positivos;
- Verificar os mecanismos genéticos que possam ser influenciados sob a ação dos componentes dos óleos essenciais;
- Analisar possíveis alterações nas características das superfícies abióticas e microbianas devido à ação dos óleos essenciais;
- Avaliar a toxicidade dos óleos essenciais sobre células de mamíferos;
- Avaliar e expandir o conhecimento da ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Heterothalamus* sobre outros microrganismos, como fungos, protozoários e vírus.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, p. 456, 2001.

AHMAD, A. et al. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611–617, 2011.

ANDRADE, S.S. et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 140–141, 2003.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2004. **Deteção e Identificação os Fungos de Importância Médica**. Mod VII. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso 04 de set. de 2013.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2003. **Antimicrobianos- Bases teóricas e usos clínicos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/glicopeptideos.htm. Acesso em: 06 jan.2014.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–78, 2012.

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

BARROSO, G.; BUENO, O. **Compostas**: subtribo Baccharidinae. In 'Flora Ilustrada Catarinense' (Ed. R. Reitz) p. 765-1065. (Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, Brazil). 2002.

BATTISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões , RS , Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 338–348, 2013.

BENITES, N.R. et al. Surtos interespecíficos de dermatomicoses por *Microsporium canis* e *Microsporium gypseum*. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 337–340, 1994.

BENNETT, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 347–357, 2008.

BEZIĆ, N. et al. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. **Phytother Res.**17(9):1037-40. 2003.

BILGE ORAL, L. et al. Effect of Oregano Essential Oil on Biofilms Formed By Staphylococci and *Escherichia coli*. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 16, p. 23–29, 2010.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CALLAWAY, T. R. et al. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 11, n. 2, p. 67–80, 2009.

CAMPOS, C. A. et al. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v. 39, p. 356–364, 2006.

CÂNDIDO, C.S.A. et al. Effects of *Myrcia ovata* Cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 621–627, 2010.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v. 18, p. 261–268, 2001.

CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v. 19, p. 886–892, 2008.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914–1920, 2002.

CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D.; PADILHA, W.W.N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**, v. 20 (52), p. 68–73, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. p. 11, 14, 22, 59, 73, 87, 2013.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65 (2), p. 232–260, 2001.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M7-A6**. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada, v. 20, 2003.

COOPER, I.R. Microbial biofilms: case reviews of bacterial and fungal pathogens persisting on biomaterials and environmental substrata. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 807–817, 2010.

COSTERTON, A.J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infection. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical infectious diseases**, v. 42, p. S25–34, 2006.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12 (4), p. 564–582, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Biochimica et Biophysica Acta Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and antimicrobial Resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 48, p. 11–16, 2006.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271–277, 1986.

DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 469–474, 2009.

DING, L. et al. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the Ent-Kaurene diterpenoid ramosin B. **Journal of chemical ecology**, v. 36, p. 553–63, 2010.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L.A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950–2958, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DORMAN, H.J.; DEANS, S G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, 2006.

DUNG, N.T.; KIM, J.M.; KANG, S.C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. **Food and chemical toxicology**, v. 46, p. 3632–3639, 2008.

DUNKIĆ, V. et al. Composition and antiviral activity of the essential oils of *Eryngium alpinum* and *E. amethystinum*. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, p. 1894–902, 2013.

DUSCHATZKY, C. B. et al. Essential oil composition of *Heterothalamus alienus* (Spreng.) Kuntze (Romerillo) from Argentina: Effect of harvesting period on the essential oil composition. **Flavour and Fragrance Journal**, p. 39–41, 2007.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **The bacterial challenge: time to react**. p. vi, 1. 2009.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature- Genus *Enterococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>> Acesso em: 10 jan. 2014.

FERREIRA, H.; LALA, E.R.P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev. Panam Infectol**, v. 12, p. 44–50, 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of applied microbiology**, v. 101, p. 1232–40, 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749–1757, 2009.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 44, n. 2, p. 271–277, 2008.

FOULQUIÉ-MORENO, M.R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International journal of food microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–24, 2006.

FRANZ, C.M.A.P. et al. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4385–4389, 2001.

FRAZZON, A.P.G. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 365–370, 2010.

FUNK, V.A. et al.; **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. International Association for Plant Taxonomy (IAPT). p. 45. 2009.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International journal of food microbiology**, v. 113, p. 1–15, 2007.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, p. 163–171, 2002.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C. ; . Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food microbiology**, v. 25, p. 668–675, 2008.

GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, p. 441–447, 2012.

GOTTLEIB, O.R.; TAVEIRA-MAGALHÃES, M. Modified distillation trap. **Chemist-analyst.**, v. 49, p.114-115, 1960.

GRUMEZESCU, M.C. et al. Hybrid Nanomaterial for Stabilizing the Antibiofilm Activity of *Eugenia carryophyllata* Essential Oil. **IEEE Transactions on nanobioscience**, v. 11, n. 4, p. 360–365, 2012.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. London, Battsford, p. 335. 1993.

HOOD, J.R.; WILKINSON, J.M.; CAVABAGH, H.M.A. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. **Journal of Essential Oil Research** Vol.15, p. 428-433, 2003.

HÖRNER, R. et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, p. 391–395, 2005.

JADHAV, S. et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125–130, 2013.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 255–262, 2003.

KEREKES, E.B. et al. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. **Journal of applied microbiology**, v. 115, p. 933–942, 2013.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2839–2845, 1995.

KISS, F. S. et al. Prevalência da colonização por *Streptococcus agalactiae* em uma amostra de mulheres grávidas e não grávidas de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. **Scientia Medica**, v. 23, n. 3, p. 169–174, 2013.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, p. 822–30, 2004.

KOUIDHI, T.; BAKHROUF, A.; ZMANTAR, T. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. **Anaerobe**, v. 16, p. 566–571, 2010.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, p. 9–27, 1998.

LAMBERT P.N. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. 1^a ed. São Carlos: Acta Eventos, 240p. 1993.

LEBRETON, F. et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4606–4612, 2011.

LEITE, E. de O. et al. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth os potencial infectious envdocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43 (1), p. 121–126, 2007.

LEWIS, K.; LEWIS, K.I.M. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999 – 1007, 2001.

LOSQUI, Y.R. et al. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(4): 931-936, Out./Dez. 2009

MACHADO, M. et al. Anti-*Giardia* activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. **Parasitology research**, v. 106, p. 1205–1215, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F. Plantas Medicinais: A Necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MANNU, L. et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291–304, 2003.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J.M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 7115–7121, 2003.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316–320, 2005.

MIN, L. et al. In vitro and in vivo anti-tobacco mosaic virus activities of essential oils and individual compounds. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 771–778, 2013.

MOELLERING, R.C. Emergence of *Enterococcus* as a Significant Pathogen. **Clinical infectious diseases**, v. 14, p. 1173–1178, 1992.

MOHAMED, J.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, p. 1581–1588, 2007.

MOREIRA, A.C.P. et al. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil β -pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 33–38, 2007.

MUKHERJEE, P.K. et al. Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 82–86, 2003.

MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, p. 46–65, 1990.

NALLAPAREDDY, S.R. et al. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infection and immunity**, v. 68, n. 9, p. 5218–24, 2000.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108–113, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of medical microbiology**, v. 56, p. 519–523, 2007.

O'TOOLE, G.O.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 49–79, 2000.

OFEK, I.; HASTY, D.L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, p. 181–191, 2003.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1017–32, 2004.

OTEO, J. et al. Antimicrobial-resistant Invasive *Escherichia coli*, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 1–8, 2005.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the “accidental” pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555–567, 2010.

PACCIARONI, A. del V. et al. Antifungal activity of *Heterothalamus alienus* metabolites. **Phytotherapy research: PTR**, v. 22, p. 524–528, 2008.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. et al. The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: effect upon pre-formed biofilm. **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, p. 379–383, 2012.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, p. 577–88, 2007.

PÉREZ, S.G. et al. Antiprotozoa activity of some essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 2901–2908, 2012.

PINTO, A.C.; HELENA, D.; SILVA, S. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45–61, 2002.

POETA, P. et al. Characterization on Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. **J. Vet. Med. B** 52, p.396-402. 2005.

PONTES, V.M.O. et al. Antimicrobianos nas Unidades de Terapia Intensiva e Semi-Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 2, p. 123–126, 2006.

PRANCE, G.T. **Etnobotânica e algumas tribos Amazônicas**. Suma Etnológica Brasileira. Etnobiologia. Ribeiro G.B. (Ed), Vozes/Finep, Petrópolis, p.119-133. 1987.

RAAD, I. et al. Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2397–2400, 1995.

READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 254, n. 1, p. 1–11, 2006.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial resistance profile os *Enterococcus* spp. isolated from doof in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 125–128, 2009.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–4, 2005.

RITTER, M.R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 51–62, 2002.

RUCKER, G. et al. Peroxides and other constituents from *Heterothalamus alienus*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 297–300, 1996.

RUFFINENGO, S.R. et al. Laboratory evaluation of *Heterothalamus alienus* essential oil against different pests of *Apis mellifera*. **The Journal of Essential Oil Research** 18, 704–707. 2006.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 1070–1075, 2008.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 50, p. 30–35, 2010.

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

SCHMIDT-SILVA, V. et al. Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany**, v. 59, p. 681–690, 2011.

SCHMIDT-SILVA, V. **Potencial Alelopático do Óleo Essencial de Espécies de *Heterothalamus* Less. (Asteraceae) nativas do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado, UFRGS. Porto Alegre, RS. 2012.

SELIM, S. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (vre) and *Escherichia coli* O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 187–196, 2011.

SEMEDO, T. et al. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? **Systematic and applied microbiology**, v. 26, p. 13–22, 2003.

SHERLEY, M. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 150, p. 1539–1546, 2004.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 16, p. 38–43, 2000.

SILVA, A.C.R. et al. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305–16, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, p.467-498. 2007.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel , rubber and polytetra fluor-ethylene : the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439–447, 2000.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometria de massa. **Scientia Chromatographica**, Vol. 2, p. 29-47. 2010.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

SÜSSMUTH, S.D. et al. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. **Infection and immunity**, v. 68, n. 9, p. 4900–4906, 2000.

SUYENAGA, E.S. et al. Essential oil composition of *Heterothalamus psiadioides* Less. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 83–86, 2004.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas : resistência do estafilococo , do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281–301, 2000.

TRENTIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–35, 2011. Elsevier Ireland Ltd.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia** 10^a Ed. Porto Alegre, Artmed. p.308, 310, 316, 330, 574, 601., 2012.

ULTEE, A.; KTES, E.P.W.; SMID, J.A. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65 (10), p. 4606–4610, 1999.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa , Porto Alegre , Rio Grande do Sul . **Iheringia, Sér. Bot.**, , n. 1987, p. 83–103, 2006.

VERDI, L.G. et al. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

WATERS, C.M.; DUNNY, G.M. Analysis of Functional Domains of the *Enterococcus faecalis* Pheromone-Induced Surface Protein Aggregation Substance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5659–5667, 2001.

WHITE, T.C. et al. Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1704–1713, 2002.

WILHEIM, A.B. et al. The resistance to fluconazole in patients with esophageal candidiasis. **Arq. Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 32–37, 2009.