

FÁBIO ASSAD FÉRES RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Actinobacillus pleuropneumoniae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696a  
2017  
Rodrigues, Fábio Assad Féres, 1992-  
Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme *in vitro*  
de óleos essenciais em *Actinobacillus pleuropneumoniae* / Fábio  
Assad Féres Rodrigues. – Viçosa, MG, 2017.  
xvii, 80f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.62-80.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Plantas medicinais.  
3. Fitoterapia. 4. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 5. Suínos -  
Infecções. 6. Suínos - Doenças. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 547.71

FÁBIO ASSAD FÉRES RODRIGUES

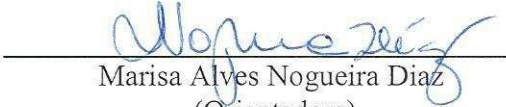
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2017

  
\_\_\_\_\_  
Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

  
\_\_\_\_\_  
Mateus Ferreira Santana

  
\_\_\_\_\_  
Marisa Alves Nogueira Diaz  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar meus caminhos e por ter me ajudado em todas as vezes que pedi forças para continuar.

À UFV e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa e à FAPEMIG e CNPq pelo financiamento do projeto.

Aos meus pais, André Rodrigues e Eliane Assad, e minha irmã, Fabiane Assad, por todo o apoio e por serem a minha fonte de inspiração.

À toda a minha família pelo apoio incondicional.

À professora Marisa Diaz, por ter me recebido, me orientado e me aconselhado. Agradeço por todas as nossas ideias, pelas conversas no cafezinho, pelas sugestões e pelo apoio no projeto. Agradeço pela paciência na explicação de novas técnicas e de novos experimentos. Muito obrigado!

Aos colegas do laboratório BioNat, pelo companheirismo e por toda ajuda no decorrer do projeto.

À professora Denise Bazzoli, pela autorização em utilizar a estrutura do LGMB.

Aos colegas do LGMB, por terem me recebido, me ajudado e aconselhado durante o projeto.

Agradeço ao Giarlã Silva, meu amigo desde a 5ª série, por todo companheirismo, descontração, sugestões e apoio.

À Larissa Monteiro, pelas revisões no texto e apoio durante a o projeto.

À Vanessa Ribeiro, pela revisão do texto e ajuda na análise dos dados.

À doutora Andreza Ferreira, pelo apoio, motivação e inspiração.

À professora Janine Bossé, pelos conselhos e sugestões de experimentos do projeto.

Ao professor Cláudio Mafra, por todos os ensinamentos e por ter fixado valores como ética e integridade na pesquisa.

Ao professor Antônio Galvão, por todos os conselhos no decorrer da minha vida acadêmica.

Ao professor Cosme Damião e ao laboratório de Bioinformática, por todo apoio desde a época da graduação.

Ao professor Moysés Nascimento, pelas dicas e sugestões na etapa da estatística e análise dos dados.

À professora Monique Eller, pelo apoio e pela motivação em continuar os estudos.

Aos professores da Bioquímica, por todo o ensinamento.

Aos amigos da Bioquímica e da Microbiologia, pela companhia e palavras de apoio e motivação.

Aos amigos da Biologia, por terem me acompanhado e apoiado desde a graduação.

Ao professor Mateus Santana, pela participação na banca, pela orientação, colaboração e pelos momentos de descontração.

Ao doutor Marcelo Vaz, pela participação na banca, por todo apoio, colaboração e pela ajuda em mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Por fim, um agradecimento especial aos que falaram que eu não conseguiria. Vocês foram os responsáveis pela motivação necessária para que eu fosse capaz de terminar essa etapa.

Muito obrigado!

“Você não fez mais do que a sua obrigação”

(André Luiz Rodrigues)

## **BIOGRAFIA**

FÁBIO ASSAD FÉRES RODRIGUES, filho de André Luiz Rodrigues e Eliane Assad Féres Rodrigues, nasceu em Manhumirim, Minas Gerais no dia 05 de novembro de 1992.

Em março de 2011 iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 2016 graduou-se como Biólogo, com ênfase em Microbiologia, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2016 iniciou o mestrado em Bioquímica Aplicada, pela Universidade Federal de Viçosa, na área de Bioprospecção de produtos naturais.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Óleos essenciais.....	2
2.1.2. Óleos essenciais com propriedades antimicrobianas.....	3
2.2. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	5
2.3. Biofilme bacteriano.....	7
2.4. Utilização de antibióticos no tratamento da pleuropneumonia .....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1. Microrganismos utilizados .....	12
3.2. Obtenção dos óleos essenciais.....	12
3.3. <i>Screening</i> dos óleos essenciais.....	18
3.4. Análises cromatográficas .....	19
3.5. CIM dos óleos essenciais com atividade antibacteriana.....	19
3.6. CBM dos óleos essenciais com atividade antibacteriana .....	20
3.7. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme pré-formado .....	21
3.8. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme em formação .....	23
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
4.1. Óleos essenciais com atividade antimicrobiana contra <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	25
4.2. Análises cromatográficas dos óleos essenciais ativos .....	26
4.3. CIM e CBM dos óleos essenciais:.....	36

4.4. Biofilme pré-formado.....	43
4.5. Biofilme em formação.....	50
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - Absorbância

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - Infusão de Cérebro e Coração Bovino

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CIM - Concentração Inibitória Mínima

D.O. - Densidade Ótica

EPS - *Extracellular polymeric substances*

LPS – Lipopolissacarídeos

NAD - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
<b>Figura 1.</b> Estados brasileiros com maior produção de carne suína em 2015.....	5
<b>Figura 2.</b> Etapas na formação do biofilme bacteriano. Estágio 1 – Aderência das células de forma reversível. Estágio 2 – Aderência de forma irreversível, mediado pela EPS. Estágio 3 – Primeiro estágio de maturação do biofilme. Estágio 4 – Biofilme formado, apresentando as células em seu interior e a camada de EPS no exterior. Estágio 5 – Estágio de dispersão.....	8
<b>Figura 3.</b> Fórmula da estrutura química do antibiótico florfenicol.....	10
<b>Figura 4.</b> Transformação da resazurina (corante azul) em resorufina (coloração rosa), indicando a viabilidade celular nas diluições analisadas.....	18
<b>Figura 5.</b> Exemplo do experimento em microplaca de 96 poços com o ensaio de CIM utilizando a resazurina como reagente para observar a viabilidade celular. Poços com coloração rosa indicam bactérias viáveis. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.....	20
<b>Figura 6.</b> Exemplo do ensaio de CBM utilizando quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Cada quadrante da placa de Petri recebeu um tratamento com um óleo essencial diferente. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....	21
<b>Figura 7.</b> Esquema placa de biofilme pré-formado, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+: Controle positivo. C-: Controle negativo.....	23
<b>Figura 8.</b> Esquema placa de biofilme em formação, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+: Controle positivo. C-: Controle negativo.....	24
<b>Figura 9.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de canela. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de canela. <b>B</b> – Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	27
<b>Figura 10.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de coentro. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de coentro. <b>B</b> – Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	28

<b>Figura 11.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de hortelã do campo. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de hortelã do campo. <b>B</b> – Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	29
<b>Figura 12.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de hortelã pimenta. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de hortelã pimenta. <b>B</b> – Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	30
<b>Figura 13.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de tomilho. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de tomilho. <b>B</b> – Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	31
<b>Figura 14.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de manjerona. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de manjerona. <b>B</b> - Estrutura química dos principais componentes.....	33
<b>Figura 15.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de eucalipto. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de eucalipto. <b>B</b> - Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	34
<b>Figura 16.</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de louro. <b>A</b> – Cromatograma do óleo de louro. <b>B</b> - Principais componentes. <b>C</b> – Estrutura química dos principais componentes.....	35
<b>Figura 17.</b> Ensaio de CIM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MV518, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 - Hortelã do campo; 2 - Hortelã pimenta. Óleos na placa B: 1 – Manjerona; 2 - Louro. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.....	38
<b>Figura 18.</b> Ensaio de CIM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MV780, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 – Louro; 2 - Canela. Óleos na placa B: 1 – Coentro; 2 - Hortelã pimenta. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.....	38
<b>Figura 19.</b> Ensaio de CIM para a bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MV1022, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 – Canela; 2 - Hortelã do campo. Óleos na placa B: 1 – Coentro; 2 - Hortelã pimenta. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.....	38
<b>Figura 20.</b> Ensaio de CIM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MIDG2331, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 - Hortelã do campo; 2 - Manjerona. Óleos na placa B: 1 – Hortelã pimenta; 2 - Louro. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.....	39

<b>Figura 21.</b> Ensaio de CIM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , S1 (ATCC), sorotipo 1. Óleos na placa A: 1 – Coentro; 2 - Tomilho. Óleos na placa B: 1 – Louro; 2 - Eucalipto. +: Controle positivo. –: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.....	39
<b>Figura 22.</b> Ensaio de CBM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MV518, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....	40
<b>Figura 23.</b> Ensaio de CBM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MV780, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....	40
<b>Figura 24.</b> Ensaio de CBM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MV1022, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....	41
<b>Figura 25.</b> Ensaio de CBM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , isolado MIDG2331, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....	41
<b>Figura 26.</b> Ensaio de CBM para bactéria <i>A. pleuropneumoniae</i> , S1 (ATCC), sorotipo 1, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....	42
<b>Figura 27.</b> Produção de biofilme pelas bactérias do presente estudo....	43
<b>Figura 28.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MV518. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, p < 0,05).....	46

<b>Figura 29.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MV780. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	47
<b>Figura 30.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MV1022. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	48
<b>Figura 31.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MIDG2331. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	49
<b>Figura 32.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MV518. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5%. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	52
<b>Figura 33.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MV780. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5%. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	53
<b>Figura 34.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MV1022. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5%. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	54
<b>Figura 35.</b> Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MIDG2331. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5%. * - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett, $p < 0,05$ ).....	55

## LISTA DE TABELAS

	PÁGINAS
<b>Tabela 1.</b> Países que mais consumiram antibióticos na alimentação animal no ano de 2010.....	10
<b>Tabela 2.</b> Principais constituintes e propriedades relatadas dos óleos essenciais utilizados no presente trabalho e nome popular e nome científico das plantas das quais foram extraídos.....	13
<b>Tabela 3.</b> Valores de inibição da análise de <i>screening</i> (mg/mL). Óleos essenciais que apresentaram valores de inibição iguais a 10 mg/mL ou a 1 e 10 mg/mL foram selecionados para as análises posteriores.....	25
<b>Tabela 4.</b> Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) dos óleos essenciais nas bactérias testadas.....	37
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem do rompimento do biofilme pré-formado dos quatro isolados de <i>A. pleuropneumoniae</i> , sorotipo 8, pelos óleos essenciais.....	45
<b>Tabela 6.</b> Porcentagem da inibição do biofilme em formação dos quatro isolados de <i>A. pleuropneumoniae</i> , sorotipo 8, pelos óleos essenciais.....	51

## RESUMO

RODRIGUES, Fábio Assad Féres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme *in vitro* de óleos essenciais em *Actinobacillus pleuropneumoniae***. Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientador: Gaspar Diaz Muñoz.

A antibioticoterapia é a forma de tratamento mais utilizada para o combate de doenças causadas por bactérias, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Entretanto, o uso indiscriminado desses compostos favorece a seleção de bactérias resistentes. Uma alternativa no combate a estes patógenos é a utilização de óleos essenciais. Estes são compostos sintetizados pelas plantas a partir do metabolismo secundário e desempenham funções de atração de polinizadores e alelopatia. Neste trabalho, foi analisado o efeito antimicrobiano e antibiofilme de óleos essenciais contra isolados da bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente causal da pleuropneumonia suína. Essa doença é de grande importância na suinocultura devido às significativas perdas econômicas. Recentemente, foi observado que isolados desta bactéria apresentam genes de resistência a diversos antibióticos comerciais, tornando a prospecção e desenvolvimento de novos fármacos uma medida imediata para melhor controle da doença. Para isso, dezoito óleos essenciais foram utilizados para triagem de atividade antimicrobiana e antibiofilme em quatro isolados de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 (MV518, MV780, MV1022 e MIDG2331) e em um isolado do sorotipo 1 (S1). Oito óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana, sendo, então, selecionados: canela, coentro, hortelã pimenta, hortelã do campo, tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Estes óleos foram analisados por cromatografia gasosa para avaliar seus componentes. Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) foram realizados com os oito óleos ativos. Os valores de CIM e CBM foram idênticos para todos os óleos em todos os isolados, com valores variando de 5 mg/mL a 0,3125 mg/mL. O óleo de coentro (0,3125 mg/mL) e o de canela (0,625 mg/mL) apresentaram valores de CIM e CBM mais baixas para a maioria dos isolados testados, sendo considerados os mais efetivos. Adicionalmente, foram realizadas as análises de rompimento do biofilme pré-formado e da inibição do biofilme em formação. Seis óleos, na maior concentração (4xCIM), foram capazes de romper em mais de 30 % o biofilme pré-formado das bactérias analisadas, sendo que os óleos de

canela e eucalipto em sua menor concentração analisada (1/8xCIM), foram capazes de romper o biofilme do isolado MV1022 em 21,29 % e 30,68 %, respectivamente. Na avaliação do biofilme em formação, cinco óleos foram capazes de inibi-lo em mais de 30 %. Entretanto, apesar do efeito no rompimento e formação do biofilme, os óleos de tomilho e coentro, dependendo da concentração utilizada, induziram o aumento na formação do biofilme. Esses resultados evidenciam a possível utilização destes óleos essenciais como sanitizantes e no combate a patógenos bacterianos. Assim, esses óleos se tornam uma possível alternativa no tratamento a doenças causadas por bactérias resistentes, a exemplo da *A. pleuropneumoniae*.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Fábio Assad Féres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Evaluation of antibacterial and antibiofilm activity *in vitro* of essential oils against *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-adviser: Gaspar Diaz Muñoz.

Antibiotic therapy is the most used form of treatment against diseases caused by bacteria, both in human and veterinary medicine. However, the indiscriminate use of these substances causes the selection of resistant bacteria. An alternative strategy of treatment against these pathogens is the utilization of essential oils. These are synthesized by aromatic plants from the secondary metabolism and perform functions of the attraction of pollinators and allelopathy. In this work, we analyzed the antimicrobial and antibiofilm effect of essential oils in isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, causative agent of swine pleuropneumonia. This disease is of great importance in swine farming due to significant economic losses. Recently, it was observed that isolates of this bacterium present resistance genes to several commercial antibiotics, which makes the need for prospecting and development of new drugs an immediate measure for better control of the disease. For this, eighteen essential oils were initially used for screening antimicrobial and antibiofilm activity in four isolates of *A. pleuropneumoniae* serotype 8 (MV518, MV780, MV1022 and MIDG2331) and a serotype 1 (S1) isolate. Eight essential oils showed antibacterial activity and were selected for future analyses: cinnamon, coriander, peppermint, mint, thyme, marjoram, eucalyptus, and laurel. These oils were analyzed by gas chromatography and presented antimicrobial components in their composition. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) tests were performed with the eight active oils. MIC and MBC values were identical for all oils in all isolates, with values ranging from 5 mg/mL to 0.3125 mg/mL. Coriander oil (0.3125 mg / mL) and cinnamon oil (0.625 mg / mL) showed lower MIC and MBC for most of the tested isolates, being considered the most effective oil. In addition, the analyses of rupture of the preformed biofilm and the inhibition of the biofilm in formation were performed. Six oils, in the highest concentration (4xMIC), were able to disrupt in more than 30% the preformed biofilm of the analyzed bacteria, being the oils of cinnamon and eucalyptus in its lowest concentration analyzed (1/8xMIC), were able to break the

biofilm of isolate MV1022 in 21.29 % and 30.68 %, respectively. In the evaluation of the biofilm in formation, five oils were able to inhibit this biofilm in more than 30 %. However, despite the effect on biofilm breakdown and formation, the thyme and coriander oils, depending on the concentration used, induced increased biofilm formation. These results show the possible use of essential oils as sanitizers and in the treatment against bacterial pathogens. Thus, these oils become a possible alternative in the treatment of diseases caused by resistant bacteria, such as *A. pleuropneumoniae*.

## 1. INTRODUÇÃO

Antibióticos são utilizados como linha de frente no tratamento de diversas doenças em animais. Entretanto, a resistência bacteriana a esses compostos vem sendo um dos principais problemas enfrentados atualmente. Estudos vêm relatando o surgimento de bactérias multirresistentes a antibióticos comerciais. Os vários mecanismos de transferência de genes, como a transformação natural, e a pressão seletiva causada pela utilização indiscriminada desses compostos vêm favorecendo a disseminação da resistência em diversas espécies bacterianas. A diminuição da eficácia dos antibióticos convencionais aumenta, dessa forma, a necessidade da prospecção e desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana.

Nesse contexto, a utilização de óleos essenciais surge como alternativa isolada ou em sinergismo com antibióticos convencionais para o tratamento de doenças causadas por microrganismos. Os óleos essenciais são produtos naturais sintetizados pelas plantas aromáticas a partir do metabolismo secundário e desempenham funções como alelopatia e atração de polinizadores. Óleos essenciais são misturas de compostos orgânicos, os quais estão presentes em diferentes concentrações e geram as características bioativas observadas. A atividade antimicrobiana e antibiofilme dos óleos essenciais, usados isoladamente ou em sinergismo com antibióticos comerciais, já é comprovada contra várias bactérias patogênicas incluindo membros da família Pasteurellaceae.

Esta família engloba diversas espécies causadoras de doenças respiratórias em animais, a exemplo da pleuropneumonia suína, cujo agente causal é a bactéria Gram-negativa *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Essa bactéria é classificada em dois biótipos de acordo com o requerimento do fator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para o crescimento. Esses biótipos subdividem-se em 16 sorotipos, classificados em relação às propriedades antigênicas da cápsula. Isolados dessa bactéria já foram relatados como resistentes à antibióticos comerciais, a exemplo do florfenicol, cloranfenicol, ampicilina e tetraciclina. Visando o desenvolvimento de novos compostos com atividade antibacteriana, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais em *A. pleuropneumoniae*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1.1. Óleos essenciais**

Produtos naturais são substâncias orgânicas, produzidos pelo metabolismo secundário e podem estar relacionados com o aumento das vantagens competitivas, como defesa, comunicação e reprodução (Hanson, 2003). Além disso, diversos produtos naturais apresentam atividade antifúngica (Maskey et al., 2003), anticancerígena (Loboda et al., 2005), cicatrizante (Talmadge et al., 2003) e antiviral (Zandi et al., 2012). Nos últimos anos, aproximadamente 50 % de todas as drogas aprovadas para a produção, bem como cerca de um terço das vendas de fármacos foram de produtos naturais ou moléculas inspiradas neles (Strohl, 2000; Bolzani et al., 2012; Newman & Cragg, 2012), o que mostra a importância da prospecção de produtos naturais objetivando o tratamento e a terapia de diversas doenças.

Neste contexto, os óleos essenciais são produtos naturais com características hidrofóbicas, responsáveis muitas vezes pelos odores característicos das plantas, atração de polinizadores, proteção contra patógenos e contra mudanças drásticas na temperatura ambiente (Krishna et al., 2000; Retta et al., 2012). Tais substâncias são produzidas, acumuladas e liberadas das glândulas secretoras (Bruneton, 1987; Bouwmeester et al., 1995; Krishna et al., 2000; Svoboda & Greenaway 2003). Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas partes e órgãos das plantas como flores, folhas, caules, raízes, frutas, sementes, dentre outras. Dentre as espécies de plantas conhecidas, 10 % contêm óleos essenciais, sendo denominadas plantas aromáticas (Svoboda & Greenaway, 2003).

Para a extração dos óleos essenciais, é utilizada a técnica de hidrodestilação a arraste a vapor (Wang & Weller, 2006). Para isso, as partes das plantas ficam em contato com a água em ebulição, e a temperatura do vapor rompe as células vegetais, liberando e evaporando o óleo e a água ali presentes. Posteriormente, no condensador, ocorre a separação das fases e o óleo é retirado (Meyer-Warnod, 1984). A demanda de óleos essenciais no mundo, no ano de 2015, foi de aproximadamente 178 mil toneladas. Esse montante foi responsável por movimentar cerca de seis bilhões de dólares entre países produtores e consumidores (GVR, 2016).

Os óleos essenciais são misturas de compostos que variam em quantidade (entre 20 a 60) e concentração dos componentes. A grande maioria possui entre dois a três componentes principais, sendo que as concentrações destes somados constituem

aproximadamente 70 % do óleo essencial (Bowles, 2003; Pichersky et al., 2006). Na maioria das vezes esses constituintes principais são os responsáveis pela bioatividade do óleo. As análises destes constituintes são, na maioria das vezes, realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) e se destacam moléculas da classe dos terpenos, terpenoides e os fenilpropanoides (Silva et al., 2003; Bakkali et al., 2008). Dentre esses, os terpenoides e os fenilpropanoides são os principais conhecidos por apresentar atividade antibacteriana (Dorman & Deans, 2000).

Entretanto, a atividade destes óleos pode se dar devido ao sinergismo desses constituintes principais com os constituintes traços (Croteau et al., 2000). Estes componentes variam em relação à sazonalidade de quando as partes da planta foram coletadas para se extrair o óleo. Diversos fatores podem alterar a constituição dos óleos essenciais, dentre eles a temperatura e luminosidade, estágio de desenvolvimento da planta, quantidade de água e horário da coleta (Voirin et al., 1990; Simon et al., 1992; Mattos, 1996). Diversos óleos essenciais, ou seus constituintes purificados, são amplamente utilizados na indústria alimentícia e aromaterapia por serem geralmente reconhecidos como seguros (em inglês “GRAS”), a exemplo do óleo de tomilho e orégano (Cosentino et al., 1999; Nedorostova et al., 2009; Pandey et al., 2016).

### **2.1.2. Óleos essenciais com propriedades antimicrobianas**

Estudos evidenciaram a bioatividade de óleos essenciais contra diversas espécies de bactérias, dentre elas *Pseudomonas aeruginosa* (Mimica-Dukic et al., 2004; Saïdana et al., 2007), *Escherichia coli* (Hong et al., 2004; Mimica-Dukic et al., 2004; Saïdana et al., 2007), *Bacillus subtilis* (Mimica-Dukic et al., 2004), *Staphylococcus aureus* (Hong et al., 2004; Sartorelli et al., 2007) e *Salmonella typhimurium* (Hong et al., 2004). Geralmente, bactérias Gram-negativas apresentam maior resistência aos óleos essenciais quando comparadas com as Gram-positivas (Trombetta et al., 2005). Um dos motivos dessa resistência está relacionado com a membrana externa presente nas Gram-negativas, que impede parcialmente a passagem de compostos hidrofóbicos, como os óleos essenciais (Nikaido, 1994).

Os óleos essenciais, sendo misturas de compostos, apresentam diferentes mecanismos de ação nas células bacterianas. A hidrofobicidade dos óleos essenciais é responsável pela interação com os lipídios da membrana plasmática, gerando alterações

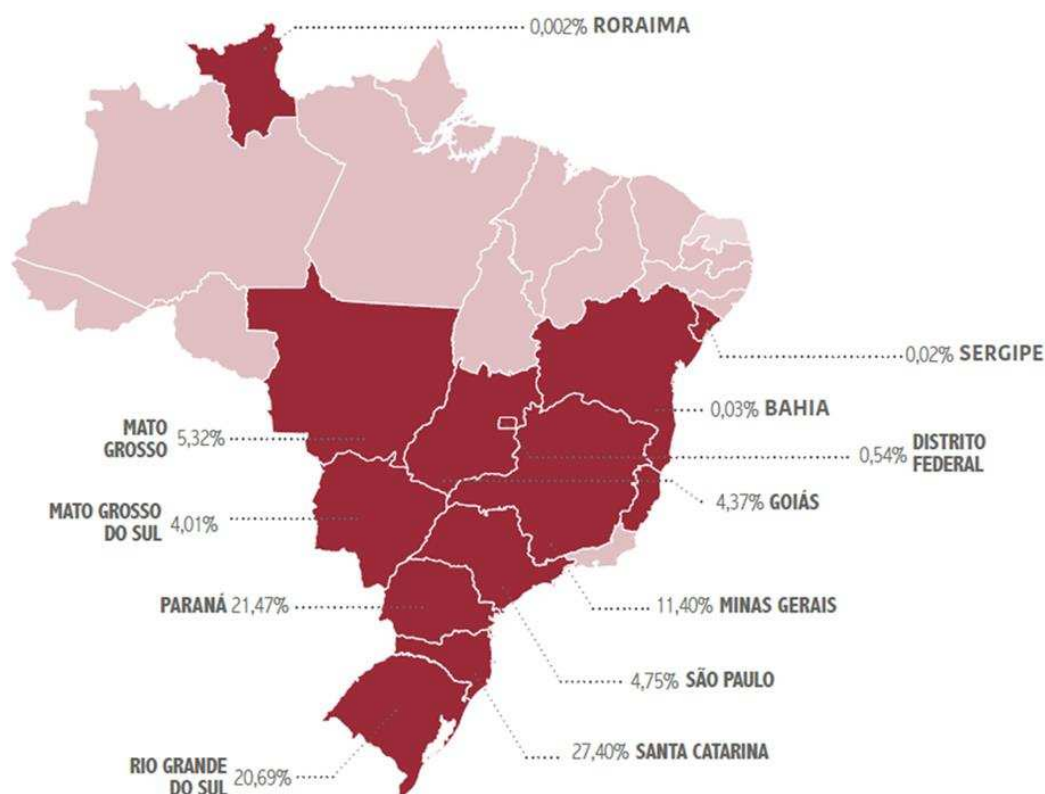
na estrutura e destruindo a célula (Knobloch et al., 1988). Os componentes dos óleos podem interagir com as proteínas da divisão celular (Domadia et al., 2007), degradar a parede de peptidoglicano (Helander et al., 1998) e alterar a morfologia e a fisiologia da célula bacteriana (Hafedh et al., 2009; Di Pasqua et al., 2013).

Devido a esses diversos mecanismos de ação, os produtos fitoterápicos, em especial os óleos essenciais, podem ser utilizados como alternativa ou em sinergismo com os antibióticos, sendo de grande importância no desenvolvimento de novos fármacos com atividade antibacteriana. Estes produtos podem fornecer uma estratégia alternativa de tratamento a diversas doenças de interesse médico e veterinário.

A característica antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido observada em espécies de diversas famílias bacterianas, a exemplo da família Pasteurellaceae (Hussain et al., 2008; Mayaud et al., 2008). Essa família engloba espécies bacterianas que são agentes etiológicos de doenças do trato respiratório de suínos (Olsen et al., 2005). Representantes dessa família foram descritos apresentando resistência a antibióticos e causando grandes prejuízos na produção de carne suína em todo o mundo (Chang et al., 1987; Azad et al., 1992; Christensen et al., 2014).

## 2.2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

A produção e o consumo de carne suína vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos. Em 2016, foram produzidos cerca de 110 milhões de toneladas, sendo a China, EUA e União Europeia os maiores produtores. A expectativa global é um aumento de 1 % para o final de 2017 em relação ao ano anterior (USDA, 2017). O Brasil encontra-se em quarto lugar, tanto no quesito de produção quanto no de exportação de carne suína, com uma produção de aproximadamente 3.643 toneladas. Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais é o quarto maior produtor, sendo os estados da região sul os líderes de produção (Figura 1) (ABIPECS, 2016).



**Figura 1.** Estados brasileiros com maior produção em porcentagem de carne suína em 2015. Fonte: ABIPECS, 2016.

Entretanto, os produtores de carne suína no mundo enfrentam diversos problemas, dentre eles as doenças do trato respiratório que afetam os animais da criação (Barcellos et al., 2008). Dentre as diversas doenças, a pleuropneumonia suína (PPS) tem se destacado como uma das mais importantes, visto as significativas perdas econômicas. Essas perdas englobam o custo com medicamentos, vacinação, manejo e o abate precoce dos animais (Gottschalk, 2012). Porcos de todas as idades podem ser acometidos pela pleuropneumonia, que pode variar da fase aguda à fase crônica dependendo de fatores como a virulência dos agentes etiológicos e do sistema imune do hospedeiro (Rogers et al., 1990; Cruijssen et al., 1995). O confinamento dos animais, gerado pela produção intensiva, tem agravado a transmissão dos agentes causadores dessa doença, aumentando os custos para os produtores de carne suína (Coelho et al., 2004).

A bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae*, membro da família Pasteurellaceae, é o principal agente etiológico da pleuropneumonia suína. Esse patógeno é um cocobacilo encapsulado Gram-negativo, que pode ser transmitido por aerossol a curtas distâncias e pelo contato direto entre porcos (Biberstein, 1990; Frey, 1995; Ferri et al., 2002; Loera-Muro et al., 2013). Tal bactéria foi isolada, classificada e nomeada em 1961 como *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews & Pattison, 1961). Entretanto, em 1983, pesquisas utilizando dados fenotípicos e genéticos concluíram que se tratava de um gênero diferente, propondo a atual classificação no gênero *Actinobacillus* (Pohl et al., 1983). *A. pleuropneumoniae* pode ser isolada da cavidade nasal, vias aéreas superiores, amígdalas, cavidade auditiva média e pulmões de indivíduos infectados (Sidibe et al., 1993; Xu et al., 2008).

*A. pleuropneumoniae* é classificada em dois biotipos de acordo com a necessidade do fator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para o crescimento, sendo o biótipo 1  $\beta$ -NAD dependente e o biótipo 2  $\beta$ -NAD independente, podendo a bactéria sintetizá-los a partir de precursores (Nicolet, 1992). Dentre esses dois biotipos, 16 sorotipos são subdivididos, classificados de acordo com propriedades antigênicas dos polissacarídeos da cápsula (Perry et al., 1990; Blackall et al., 2002; Sarkozi et al., 2015).

A distribuição e a prevalência global dos sorotipos são variáveis, havendo diferenças em relação ao tempo da observação e das regiões geográficas (Xu et al., 2010; Yoo et al., 2014). Como exemplo, o sorotipo 8, é o mais comum no Reino Unido, na América do Norte e no sudeste do Brasil. (O'Neill et al., 2010; Rossi et al., 2013; Gottschalk & Lacouture, 2014; Li et al., 2016) enquanto que o sorotipo 1 é mais

disseminado na Coréia do Sul (Yoo et al., 2014). Apesar de todos os sorotipos serem capazes de causar a doença, há diferenças significativas no índice de mortalidade causada por eles (Rosendal et al., 1985; Rogers et al., 1990). Por exemplo, os sorotipos 1, 5, 9 e 11 são os mais virulentos, causando maior mortalidade e lesões pulmonares (Nicolet, 1992), enquanto o sorotipo 8 causa uma alta morbidade (Frey, 2011).

As diferenças nas taxas de mortalidade podem estar relacionadas com fatores de virulência descritos em estudos anteriores (Bossé et al., 2002). A virulência de *A. pleuropneumoniae* é multifatorial, tendo como fatores de virulência a cápsula polissacarídica (Dubreuil et al., 2000), lipopolissacarídeos (LPS) (Chiers et al., 2010), proteínas de ligação ao ferro (transferrina) (Klirgaard et al., 2012) e as toxinas da família *Repeat in toxin* (RTX). Estas são consideradas como os principais fatores de virulência e possuem a capacidade de causar hemólise e citólise, formando poros nas membranas celulares (Frey, 2011). Essas toxinas são classificadas em quatro tipos (*ApxI*, *ApxII*, *ApxIII* e *ApxIV*) e são secretadas em diferentes combinações pelos isolados dos 16 sorotipos (Chien et al., 2009; Frey, 2011). Tais toxinas são importantes na taxonomia dos isolados, visto que os genes que as codificam são utilizados para classificá-las utilizando técnicas de *polymerase chain reaction* (PCR) (Gram et al., 2000; Rayamajhi et al., 2005; Guo-Sheng et al., 2006). Outro fator de virulência de *A. pleuropneumoniae* são as fímbrias, responsáveis pela adesão das células aos tecidos do hospedeiro. Essas são de extrema importância na fixação do patógeno na superfície das células epiteliais e, conseqüentemente, favorecendo a formação do biofilme bacteriano (Craig et al., 2004).

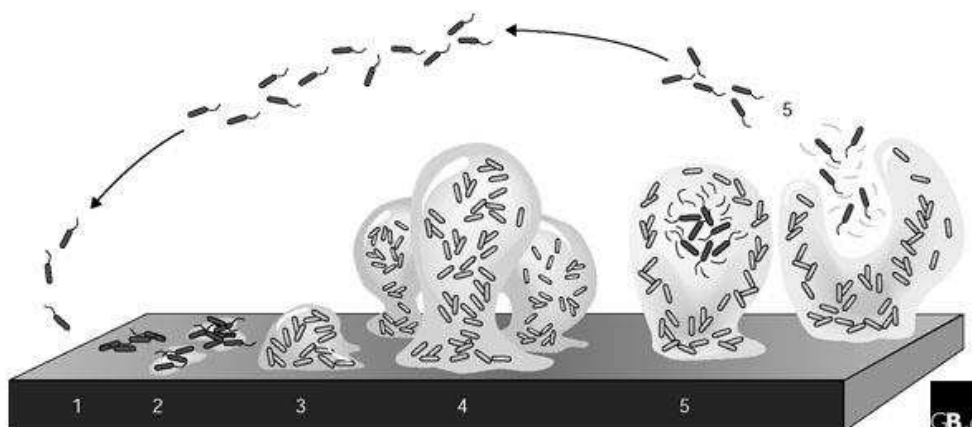
### **2.3. Biofilme bacteriano**

O biofilme bacteriano é um agregado de células envoltas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas (em inglês “EPS”), dentre as quais se destacam os polissacarídeos e as proteínas (Donlan & Costerton, 2002; Hall-Stoodley et al., 2006). Os biofilmes podem ser compostos por apenas uma espécie bacteriana, ou múltiplas espécies, com a capacidade de aderir em superfícies bióticas ou abióticas (Archibald & Gaynes, 1997).

A formação e a maturação do biofilme engloba cinco etapas. O primeiro estágio está relacionado com a adesão das bactérias na superfície, de forma reversível, por meio

de proteínas adesinas. Em um segundo estágio ocorre a produção de EPS, sendo as células envoltas por este, em um processo irreversível. Os estágios três e quatro estão relacionados com o crescimento e a maturação do biofilme por meio da maior produção de EPS e da agregação das células em microcolônias. Por fim, o estágio cinco se dá pela liberação de células envoltas pela matriz EPS. Estas células retornam à forma de vida planctônica, possuindo a capacidade de formar biofilme em outras superfícies (Figura 2) (Sauer et al., 2002; Stoodley et al., 2002).

Aproximadamente 80 % das infecções bacterianas estão diretamente relacionadas com a formação e a fixação do biofilme nos tecidos do hospedeiro, causando problemas na saúde pública e perdas econômicas (Davies, 2003; Shi & Zhu, 2009). O biofilme é extremamente importante na persistência da infecção, visto ajudar às células a escapar do sistema imune do hospedeiro (Li et al., 2008; Jensen et al., 2010).



**Figura 2.** Etapas na formação do biofilme bacteriano. Estágio 1 –Aderência das células de forma reversível. Estágio 2 – Aderência de forma irreversível, mediado pela EPS. Estágio 3 – Primeiro estágio de maturação do biofilme. Estágio 4 – Biofilme formado, apresentando as células em seu interior e a camada de EPS no exterior. Estágio 5 – Estágio de dispersão (Sauer, 2003).

Estudos demonstraram a importância do biofilme bacteriano na resistência a tratamentos com antibióticos (Mah & O’Toole, 2001; Singh et al., 2010). Células envoltas ou em formação no biofilme são aproximadamente 100 a 1.000 vezes mais resistentes a antibióticos, antimicrobianos e agentes desinfetantes, quando comparadas com células planctônicas (Xu et al., 2000; Mah & O’Toole, 2001; Stoodley et al., 2002; Hoiby et al., 2010). Essa resistência é devido, por exemplo, a fatores como a lenta

difusão do agente antimicrobiano na matriz do biofilme, diminuindo a quantidade disponível para atuar nas células (Mah & O'Toole, 2001). Adicionalmente, estudos relataram que baixas concentrações de antimicrobianos aumentavam a produção de biofilme em espécies bacterianas (Ichimiya et al., 1996; Hathroubi et al., 2015). Portanto, a formação e a instalação do biofilme nos órgãos do hospedeiro estão relacionadas com a transmissão, patogênese e persistência do patógeno no indivíduo (Labrie et al., 2010).

Outro fato relevante é que em células presentes na formação do biofilme, os mecanismos de transferência horizontal de genes ocorrem com maior frequência, sendo transferidos, por exemplo, plasmídeos contendo genes de resistência de vários agentes antimicrobianos (Donlan, 2002). Neste contexto, *A. pleuropneumoniae* é uma bactéria naturalmente competente, sendo capaz de adquirir material genético do meio por transformação. Dessa forma, a formação de biofilme para esta espécie pode facilitar a aquisição de material genético do ambiente, a exemplo de genes de resistência a antibióticos (Bossé et al., 2004). Além disso, o biofilme produzido por *A. pleuropneumoniae* pode interferir no tratamento da pleuropneumonia suína, visto que o patógeno se torna mais resistente ao tratamento com diversos antimicrobianos (Tremblay et al., 2013).

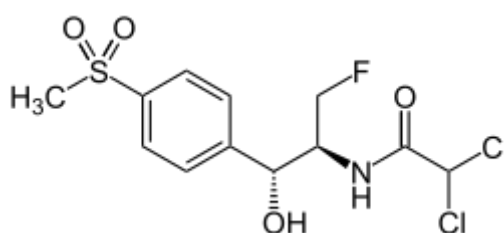
#### **2.4. Utilização de antibióticos no tratamento da pleuropneumonia**

A principal forma de combate a infecções bacterianas é pelo uso de antibióticos. Em 2010 foram consumidos cerca de cem mil toneladas destes compostos, sendo que aproximadamente 63 mil toneladas foram para o consumo animal (Tabela 1) (Van Boeckel et al., 2015).

**Tabela 1.** Países que mais consumiram antibióticos na alimentação animal no ano de 2010 (Van Boeckel et al., 2015).

País	% de consumo de antibióticos
China	23%
EUA	13%
Brasil	9%
Índia	3%
Alemanha	3%

O Brasil encontra-se em terceiro lugar no ranking de maiores consumidores de antibióticos para utilização na pecuária. Dentre estes, destaca-se a utilização do antibiótico florfenicol (Figura 3) no tratamento de diversas doenças animais, dentre elas a pleuropneumonia suína causada por *A. pleuropneumoniae* (SINDAN, 2013). O florfenicol pertence à classe dos fenicois, produzido a partir de substituições em radicais na molécula do antibiótico cloranfenicol (Shaw, 1983). Seu mecanismo de ação é devido à ligação reversível a peptidiltransferase na subunidade 50S do ribossomo de procariotos (Schlünzen et al., 2001).



**Figura 3.** Fórmula da estrutura química do antibiótico florfenicol.

Nesse contexto, o aumento no número de bactérias resistentes aos mais variados antibióticos tem gerado um alerta para pesquisadores e agências do mundo todo, com o objetivo de prospectar e desenvolver novos agentes antimicrobianos (WHO, 2014). Custos de 1,5 bilhões de euros por ano são estimados devido ao tratamento e perdas

econômicas causadas por bactérias resistentes na Europa (EMA & ECDC, 2009). Já nos EUA, esse custo pode chegar a 20 bilhões de dólares por ano (CDC, 2013). Estudos recentes relataram isolados de *A. pleuropneumoniae* resistentes aos antibióticos florfenicol e cloranfenicol (Bossé et al., 2015; Da Silva et al., 2017), sulfonamida, estreptomicina e ampicilina (Yoo et al., 2014). Nesse contexto, a prospecção de compostos para o controle da pleuropneumonia suína se torna imediata.

Assim, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais em isolados da bactéria *A. pleuropneumoniae*. Os objetivos específicos foram: realizar o *screening* inicial para atividade antibacteriana de dezoito óleos essenciais; determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais que apresentarem atividade antibacteriana no ensaio de *screening*; determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais que apresentarem atividade antibacteriana no ensaio de *screening*; avaliar a capacidade dos óleos essenciais, que apresentaram atividade antibacteriana, no rompimento do biofilme pré-formado e em formação produzido pelos isolados de *A. pleuropneumoniae* e analisar, por meio da cromatografia gasosa, os principais constituintes dos óleos essenciais ativos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**




#### **3.1. Microrganismos utilizados**





Os isolados de *A. pleuropneumoniae* foram adquiridos do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Para as análises, foram utilizados quatro isolados pertencentes ao sorotipo 8, provenientes do Brasil (MV780, MV518 e MV1022) e do Reino Unido (MIDG2331) e um isolado do sorotipo 1 (S1 – ATCC), totalizando cinco isolados. Para o estoque, as bactérias foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (HiMedia), suplementado com NAD 0,01 % (BHI + NAD) (Sigma-Aldrich), a 37 °C e agitação de 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente, uma amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, estes centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante retirado. O pellet foi ressuspendido em 800 µL de meio BHI + NAD, e 200 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram imersos durante um minuto em nitrogênio líquido e posteriormente transferidos para ultrafreezer a -80 °C. Para a preparação do inóculo nos experimentos, uma amostra foi retirada do ultrafreezer, inoculada em frascos de cultura contendo meio BHI + NAD e incubadas a 37° C e agitação de 180 rpm até atingirem a concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. As suspensões, quando necessário, foram diluídas com meio BHI + NAD.





#### **3.2. Obtenção dos óleos essenciais**





Neste estudo foram utilizados dezoito óleos essenciais, todos extraídos por hidrodestilação. Na tabela 2 encontram-se algumas informações dos óleos essenciais utilizados no presente trabalho. Os óleos de alecrim, canela, coentro, noz moscada, laranja-doce, manjerona, hortelã do campo, louro, limão, curry e café foram fornecidos pela empresa Laszlo Aromaterapia e Aromatologia (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os óleos essenciais de hortelã-pimenta, gengibre e tomilho foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Enquanto os óleos essenciais de melaleuca, tangerina, lima-comum e eucalipto foram adquiridos do Laboratório de Síntese de Agroquímicos (LASA) da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Todos os óleos foram diluídos utilizando Tween 80 (Vetec) como solvente.




**Tabela 2.** Principais constituintes e propriedades relatadas dos óleos essenciais utilizados no presente trabalho e nome popular e nome científico das plantas das quais foram extraídos.

Nome científico	Nome comum	Principais componentes	Propriedades relatadas	Referências
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<p>Canela</p> 	$\alpha$ -Pinoeno, limoneno, cinamaldeído, eugenol	inseticida, afrodisíaco, antibacteriano	<p>Samarasekera et al., 2005; Ooi et al., 2006; Shahverdi et al., 2007; Joshi et al., 2009, Unlu et al., 2010</p> <p><a href="http://www.alwaysayurveda.com/cinnamomum-zeylanicum/">http://www.alwaysayurveda.com/cinnamomum-zeylanicum/</a></p>
<i>Citrus aurantifolia</i>	<p>Lima-comum</p> 	limoneno	antioxidante, antimicrobiano, antineoplásico	<p>Moufida &amp; Marzouk, 2003; Garau et al., 2007; Fisher &amp; Philips, 2008; Razzaghi-Abyaneh et al., 2009</p> <p><a href="https://www.britannica.com/plant/lime">https://www.britannica.com/plant/lime</a></p>
<i>Citrus limonum</i>	<p>Limão</p> 	limoneno, ocimeno, valenceno	antioxidante, antibacteriano, inseticida	<p>Wilson et al., 1997; Moreira et al., 2005; Bertuzzi et al., 2013</p> <p><a href="http://www.meupomar.com.br/ver_produto/produto/43/Limão">http://www.meupomar.com.br/ver_produto/produto/43/Limão</a></p>

<i>Citrus reticulata</i>	<p>Tangerina</p> 	limoneno, geraniol, citral	antioxidante, antimetastásica, antifúngico	<p>Moufida &amp; Marzouk, 2003; Fisher &amp; Philips, 2008; Chutia et al., 2009</p> <p><a href="http://www.exotic-plants.de/seeds/fruit-trees/Citrus-reticulata.php">http://www.exotic-plants.de/seeds/fruit-trees/Citrus-reticulata.php</a></p>
<i>Citrus sinensis</i>	<p>Laranja-doce</p> 	limoneno, linalol	antifúngico, antibacteriano	<p>Moufida &amp; Marzouk, 2003; Fisher &amp; Philips, 2008; Sharma &amp; Tripathi, 2008</p> <p><a href="http://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_929.aspx">http://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_929.aspx</a></p>
<i>Coffea arabica</i>	<p>Café</p> 	fenilacetoneitrila álcool benzílico	antifúngico, odorante	<p>Del Terra et al., 2013; Quijano-Célis et al., 2015</p> <p><a href="http://www.colhefort.com.br/noticias/noticias/index/89">http://www.colhefort.com.br/noticias/noticias/index/89</a></p>
<i>Coriandrum sativum</i>	<p>Coentro</p> 	decanal, decenal	antifúngico, repelente, antibacteriano	<p>Matasyoh et al., 2009; Silva et al., 2011; Benelli et al., 2013</p> <p><a href="http://www.spicesmedicinalherbs.com/coriander-herb-annual.html">http://www.spicesmedicinalherbs.com/coriander-herb-annual.html</a></p>

<p><i>Eucalyptus citriodora</i></p>	<p>Eucalipto-limão</p> 	<p><math>\alpha</math>-pineno, 1,8-cineol, pinocarveol</p>	<p>antibacteriano, anti- inflamatório, antitérmico</p>	<p>Delaquis et al., 2002; Gbenou et al., 2013; Grichi et al., 2016</p> <p><a href="http://www.omcseeds.com/eucalyptus-citriodora-lemon-scented-gum-50.html">http://www.omcseeds.com/eucalyptus-citriodora-lemon-scented-gum-50.html</a></p>
<p><i>Laurus nobilis</i></p>	<p>Louro</p> 	<p>1,8-cineol, <math>\alpha</math>-terpineno, sabineno</p>	<p>antioxidante, antifúngico, antibacteriano</p>	<p>Dadalioglu &amp; Evrendilek, 2004; Cherrat et al., 2014; Da Silveira et al., 2014; Caputo et al., 2017</p> <p><a href="http://florawww.eeb.uconn.edu/198500843.html">http://florawww.eeb.uconn.edu/198500843.html</a></p>
<p><i>Melaleuca alternifolia</i></p>	<p>Melaleuca</p> 	<p>terpinen-4-ol, <math>\alpha</math>-terpieno,</p>	<p>antibacteriano</p>	<p>Cox et al., 2001; Gómez-Rincón et al., 2014; Souza et al., 2017</p> <p><a href="https://www.lifestyle.com.au/plant-guide/tea-tree-2306.aspx">https://www.lifestyle.com.au/plant-guide/tea-tree-2306.aspx</a></p>
<p><i>Mentha piperita</i></p>	<p>Hortelã-pimenta</p> 	<p>mentol mentona 1,8-cineol</p>	<p>antiespasmódico antiemético, analgésico</p>	<p>Rohloff, 1999; Ciobanu et al., 2013; Ferreira et al., 2014</p> <p><a href="http://worddirection.com/comparative-study-on-the-effect-of-different-methods-of-drying-on-mentha-piperita-essence-2/">http://worddirection.com/comparative-study-on-the-effect-of-different-methods-of-drying-on-mentha-piperita-essence-2/</a></p>

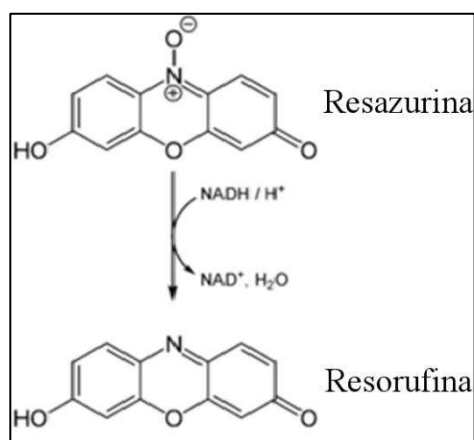
<i>Mentha spicata</i>	Hortelã do campo 	carvona, limoneno, 1,8-cineol	antifúngico, odorante	Adam et al., 1998; Znini et al., 2011  <a href="http://www.jardimcor.com/catalogo-de-especies/mentha-spicata/">http://www.jardimcor.com/catalogo-de-especies/mentha-spicata/</a>
<i>Murraya koenigii</i>	Curry 	$\alpha$ -pineno, $\beta$ -cariofileno	antiemético, antibacteriano	Wong & Tie; 1993, Raina et al., 2002  <a href="http://snaplant.com/herbs/helichrysum-italicum-or-curry-plant/">http://snaplant.com/herbs/helichrysum-italicum-or-curry-plant/</a>
<i>Myristica fragrans</i>	Noz moscada 	sabineno, terpine-4-ol, safrol	antibacteriano, antioxidante	Dorman & Deans, 2000; Singh et al., 2005; Subarnas et al., 2010  <a href="http://hermionesgarden.blogspot.com.br/2011/12/notorious-nutmeg-myristica-fragrans.html">http://hermionesgarden.blogspot.com.br/2011/12/notorious-nutmeg-myristica-fragrans.html</a>
<i>Origanum majorana</i>	Manjerona 	timol, 3-careno	antibacteriano antioxidativo antifúngico	Daferera et al., 2000; Busatta et al., 2008  <a href="http://anandanicosmeticosnaturais.blogspot.com.br/2013/04/oleo-essencial-de-manjerona-origanum.html">http://anandanicosmeticosnaturais.blogspot.com.br/2013/04/oleo-essencial-de-manjerona-origanum.html</a>

<i>Rosmarinus officinalis</i>	<p>Alecrim</p> 	<p><math>\alpha</math>-Pineno canfeno linalol</p>	<p>antioxidativo, acaricida, anticancerígeno</p>	<p>Gachkar et al., 2007; Erkan et al., 2008; Wang et al., 2008; Wang et al., 2012</p> <p><a href="http://www.vcmhc.com/rosemary-rosmarinus-officinalis-good-as-a-food-spice-good-as-a-health-cure-part-1/">http://www.vcmhc.com/rosemary-rosmarinus-officinalis-good-as-a-food-spice-good-as-a-health-cure-part-1/</a></p>
<i>Thymus vulgaris</i>	<p>Tomilho branco</p> 	<p>p-cimeno timol</p>	<p>antibacteriano, antioxidante, anticancerígeno</p>	<p>Reddy et al., 1998; Rota et al., 2008; Nikolić et al., 2014</p> <p><a href="http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/tomilho-thymus-vulgaris/">http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/tomilho-thymus-vulgaris/</a></p>
<i>Zingiber officinale</i>	<p>Gengibre</p> 	<p>geranial neral <math>\alpha</math>-zingibereno</p>	<p>antibacteriano, antioxidante, antiinflamatório</p>	<p>Sacchetti et al., 2005; Singh et al., 2008</p> <p><a href="http://www.snqc.org/zingiber-officinale/">http://www.snqc.org/zingiber-officinale/</a></p>

### 3.3. *Screening* dos óleos essenciais

A triagem dos óleos essenciais com atividade antibacteriana foi realizada de acordo com a técnica descrita por Aligiannis e colaboradores (2001), com modificações. As soluções dos óleos essenciais, diluídas em Tween 80, foram novamente diluídas para concentrações de 10 mg/mL e 1 mg/mL, utilizando meio BHI + NAD. 100 µL das soluções dos 18 óleos essenciais foram adicionados em poços de uma microplaca contendo 96 poços. Posteriormente, 100 µL de inóculo bacteriano, contendo  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados em cada poço. A microplaca foi incubada durante 24 horas a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Para a avaliação dos resultados, 50 µL de resazurina (0,01 %) (Sigma-Aldrich) foram adicionados em cada poço sendo a placa novamente incubada durante 2 – 3 horas a 37 °C, e posteriormente observada a coloração.

Os sais de resazurina são utilizados como indicador de oxirredução em testes de *screening* e CIM (Elshikh et al., 2016). Para isso, a resazurina (corante azul) é reduzida a resorufina (coloração rosa), indicando a presença e a viabilidade celular na diluição testada (Sarker et al., 2007) (Figura 4). Os óleos que apresentaram atividade bactericida ao menos na concentração 10 mg/mL foram selecionados para o prosseguimento do estudo. O antibiótico florfenicol (em sua CIM) foi utilizado como controle positivo por ser amplamente comercializado no tratamento contra *A. pleuropneumoniae* na suinocultura brasileira (SINDAN, 2013). Como controle negativo foi utilizado uma solução de meio BHI + NAD contendo Tween 80. Os testes foram realizados em triplicata.



**Figura 4.** Redução da resazurina (corante azul) em resorufina (coloração rosa), indicando a viabilidade celular nas diluições analisadas.

### **3.4. Análises cromatográficas**

As análises cromatográficas dos óleos essenciais com atividade antibacteriana foram realizadas em aparelho CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A, presente no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Para isso, foi preparada uma solução contendo o óleo essencial e hexano como solvente, na concentração de 10 mg/mL. Posteriormente, essa solução foi adicionada a uma coluna cromatográfica DB-5 de 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 micrômetros de espessura do filme. Para a temperatura, foi utilizada a faixa de 220 °C, modo Split, com 40 °C (2 minutos), tendo um aumento de 3 °C por minuto até 240 °C, por 10 minutos. A passagem do fluxo de gás foi de 1,8 mL/min.

### **3.5. CIM dos óleos essenciais com atividade antibacteriana**

O protocolo utilizado foi descrito por Elshikh e colaboradores (2016), com modificações e está de acordo com os manuais da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2015). Em uma microplaca de 96 poços, 100 µL de meio BHI + NAD foram adicionados em cada poço. Posteriormente, foram feitas as soluções contendo o óleo essencial e meio BHI + NAD. Cada poço inicial do teste recebeu 100 µL dessa solução, sendo a primeira concentração de 10 mg/mL. Após a homogeneização, foram realizadas as diluições seriadas. Onze concentrações do óleo essencial foram testadas (10 mg/mL – 0,009 mg/mL). Após a diluição seriada, 100 µL de inóculo bacteriano a  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados em cada poço. A microplaca foi então incubada durante 24 horas a 37 °C. Para a avaliação dos resultados, 50 µL de resazurina (0,01 %) foram adicionados em cada poço, e a placa novamente incubada durante 2 – 3 horas a 37 °C, e posteriormente observada a coloração. O valor da CIM foi considerado como a menor diluição do óleo essencial em que não houve a mudança na coloração azul nos poços (Figura 5).

A atividade dos óleos foi classificada de acordo com Djabou e colaboradores (2013), variando de inativo a extremamente ativo. Os seguintes valores foram utilizados para a classificação dos óleos essenciais (mg/mL):

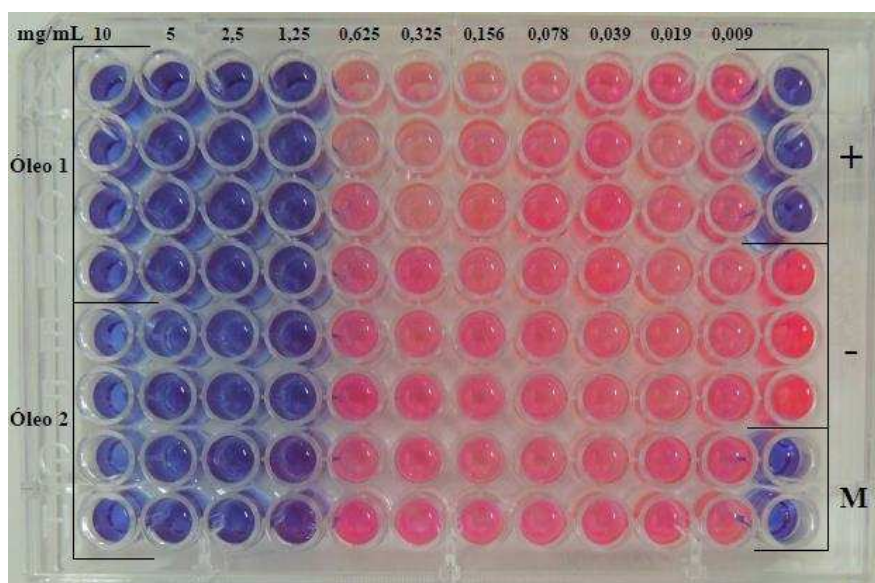
CIM > 12,5 (Inativo)

12,5 ≤ CIM < 1,5 (Moderadamente ativo)

1,5 ≤ CIM < 0,2 (Ativo)

CIM ≤ 0,2 (Extremamente ativo)

Para controle positivo foi utilizado a CIM do antibiótico florfenicol para cada isolado e para controle negativo foi utilizado meio BHI + NAD com Tween 80. Os testes foram realizados em triplicata biológica.

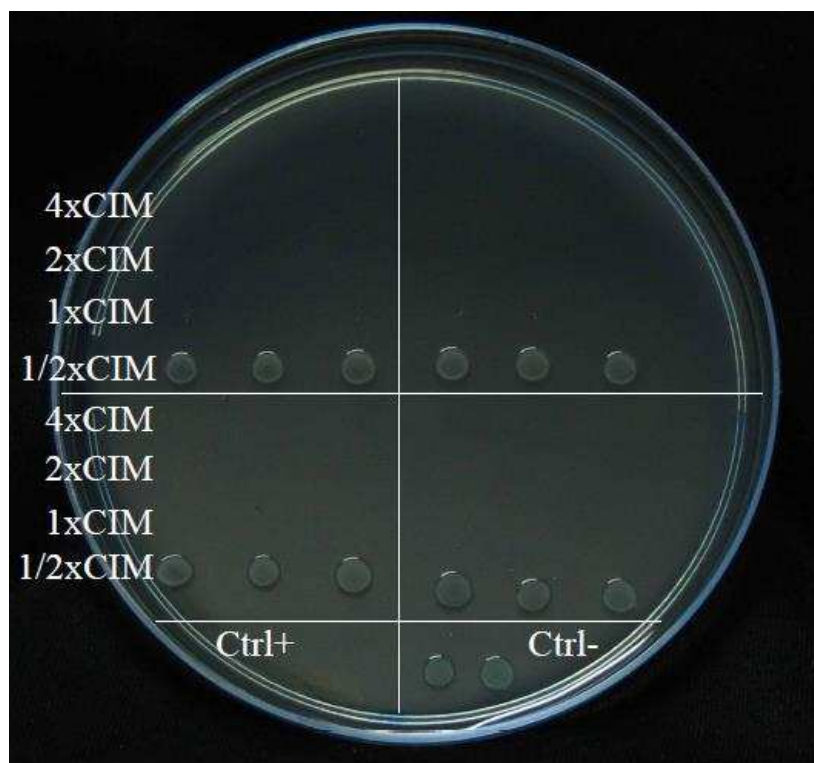


**Figura 5.** Exemplo do experimento em microplaca de 96 poços com o ensaio de CIM utilizando a resazurina como reagente para observar a viabilidade celular. Poços com coloração rosa indicam bactérias viáveis. A CIM de ambos os óleos foi 1,25 mg/mL. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.

### 3.6. CBM dos óleos essenciais com atividade antibacteriana

A concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais foi determinada de acordo com Mah (2014), com modificações. Em uma microplaca 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio BHI + NAD, juntamente com 100 µL de uma solução de óleo essencial e, posteriormente, realizadas 11 diluições seriadas (10 mg/mL – 0,009 mg/mL). Após isso, foram adicionados 100 µL de inóculo bacteriano a  $1 \times 10^6$  UFC/mL por poço e a placa incubada durante 24 horas, a 37 °C. A partir dos valores de CIM de cada óleo essencial para cada isolado, *spots* de 1,5 µL foram inoculados em placa de

Petri contendo meio BHI + NAD ágar (HiMedia). As seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM foram plaqueadas e a placa de Petri, contendo os inóculos, foi incubada durante 18 horas a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. A CBM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano nos inóculos transferidos para a placa de Petri (Figura 6). Os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 6.** Exemplo do ensaio de CBM utilizando quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Cada quadrante da placa de Petri recebeu um tratamento com um óleo essencial diferente. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.

### 3.7. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme pré-formado

As bactérias estudadas foram classificadas quanto a sua capacidade de formar biofilme de acordo com Stepanović e colaboradores (2007). Para isso, 100 µL de meio BHI + NAD foram adicionados em cada poço de uma microplaca 96 poços. Posteriormente 100 µL de bactéria na concentração  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram inoculadas nos poços e incubadas em estufa 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. A avaliação do

crescimento bacteriano ocorreu visualmente pela turbidez do meio nos poços. O meio foi então retirado e 200 µL de cristal violeta 0,1 % (Sigma-Aldrich) foram adicionados. A placa foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos, o cristal violeta retirado cuidadosamente e os poços lavados com água destilada. Posteriormente, 250 µL de ácido acético 33 % foram adicionados em cada poço durante 10 minutos. 150 µL dessa solução presentes em cada poço foram transferidos para uma nova microplaca e as leituras de absorvância realizadas com D.O.<sub>570nm</sub>. BHI + NAD com Tween 80 foi utilizado como controle negativo. As bactérias foram classificadas de acordo os seguintes conceitos propostos por Stepanović e colaboradores (2007), utilizando a densidade óptica (D.O.<sub>570nm</sub>) da quantificação do biofilme:

$D.O.c = \text{Média da D.O. do controle negativo} + (3 \times \text{Desvio padrão da média})$

Sendo que:

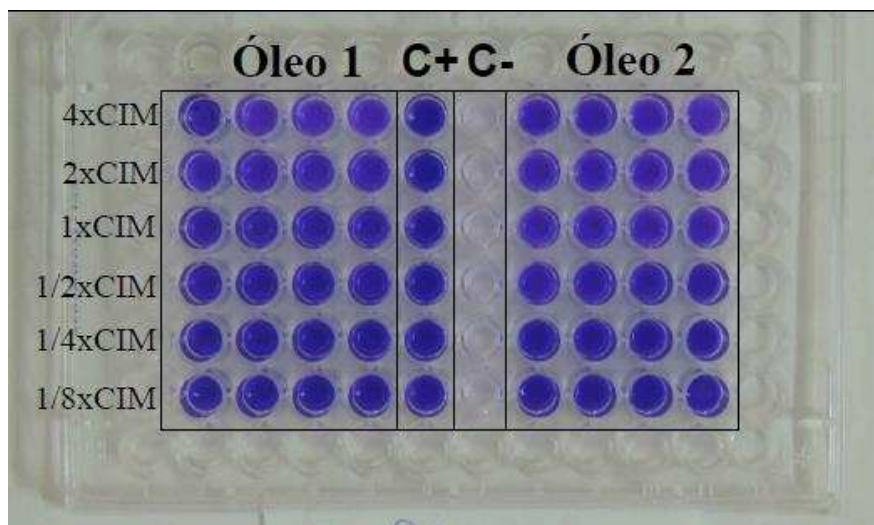
$D.O. \leq D.O.c$ : Não produz biofilme

$D.O.c < D.O. \leq 2 \times D.O.c$ : Fraca produtora de biofilme

$2 \times D.O.c < D.O. \leq 4 \times D.O.c$ : Moderada formadora de biofilme

$4 \times D.O.c < D.O.$ : Forte produtora de biofilme

A análise da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado foi realizada de acordo com Klein e colaboradores (2015), com modificações. Para isso, bactérias foram inoculadas em microplacas de 96 poços como descrito acima. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado gentilmente e 200 µL de solução contendo meio BHI + NAD com os óleos essenciais foram adicionados nas seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM, 1/4xCIM, 1/8xCIM. A microplaca foi então incubada por 6 horas a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> e, ao final desse período, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os poços lavados duas vezes com água destilada (Figura 7). A coloração com cristal violeta e a leitura de absorvância ocorreram como descritos acima. Os experimentos ocorreram em triplicata, sendo que o resultado final foi à média dessas repetições. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o controle pelo teste de Dunnett ( $P \leq 0.05$ ) e entre eles pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

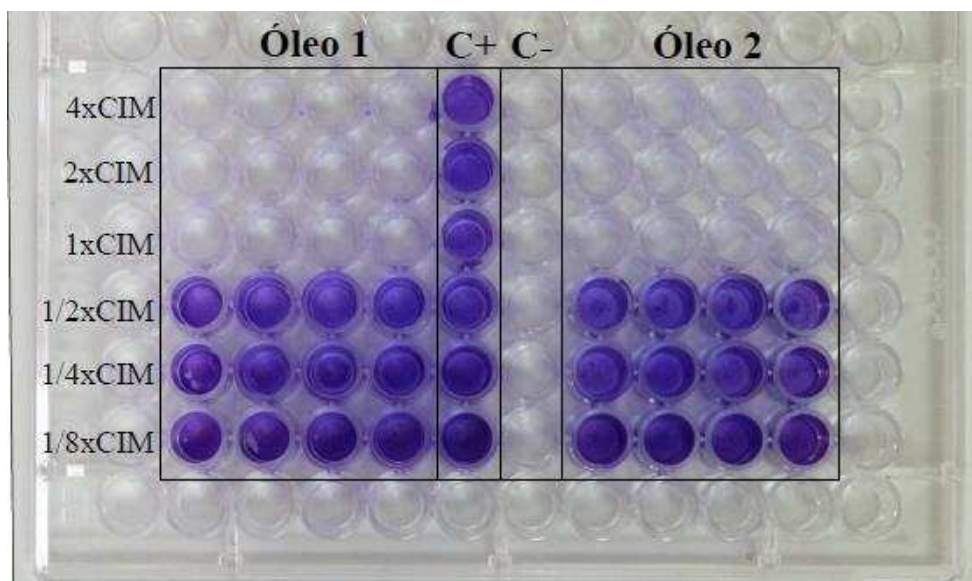


**Figura 7.** Esquema placa de biofilme pré-formado, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+ - Controle positivo. C- - Controle negativo.

### **3.8. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme em formação**

A análise da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação foi desenvolvida de acordo com O'Toole (2011), com modificações. Os óleos essenciais que apresentaram atividade antibacteriana nos ensaios de CIM foram selecionados para as análises de biofilme. A partir dos valores de CIM de cada óleo essencial para cada bactéria, foram utilizadas as seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM, 1/4xCIM e 1/8xCIM. Para isso, 100 µL de meio BHI + NAD foram adicionados em cada poço de uma microplaca 96 poços. Os óleos essenciais foram diluídos em meio BHI + NAD a fim de gerar a solução com a concentração desejada. 100 µL dessa solução foram acrescentados nos poços e as diluições seriadas realizadas, atingindo os valores propostos para o teste. Por fim, 100 µL da bactéria em uma concentração  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados em cada poço e a microplaca incubada durante 24 h a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio foi retirado cuidadosamente, e os poços foram lavados com água destilada duas vezes. Posteriormente, 200 µL de cristal violeta 0,1 % foram adicionados em cada poço, e a placa incubada a temperatura ambiente por 30 minutos (Figura 8). Após esse período, o cristal violeta foi retirado e a placa novamente lavada com água destilada para retirar o

excesso do corante. Para a quantificação do biofilme, 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético 33 % foram adicionados em cada poço. Após 10 minutos em contato com o cristal violeta do biofilme, 150  $\mu\text{L}$  da solução foram retirados e transferidos para uma nova microplaca de 96 poços. As leituras de absorbância ocorreram em  $\text{D.O.}_{570\text{nm}}$ . BHI + NAD com Tween 80 foi utilizado como controle negativo. Testes foram realizados em triplicata, e o resultado final foi a média das replicatas. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o controle pelo teste de Dunnett ( $P \leq 0.05$ ) e entre eles pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 8.** Esquema placa de biofilme em formação, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+: Controle positivo. C-: Controle negativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Óleos essenciais com atividade antimicrobiana contra *A. pleuropneumoniae*

Dentre os 18 óleos essenciais analisados pelo *screening* inicial, oito apresentaram atividade antibacteriana: Canela, coentro, hortelã pimenta, hortelã do campo, tomilho, manjerona, eucalipto e louro (Tabela 3). Estes óleos foram selecionados para as análises posteriores de cromatografia, atividade antibacteriana e antibiofilme.

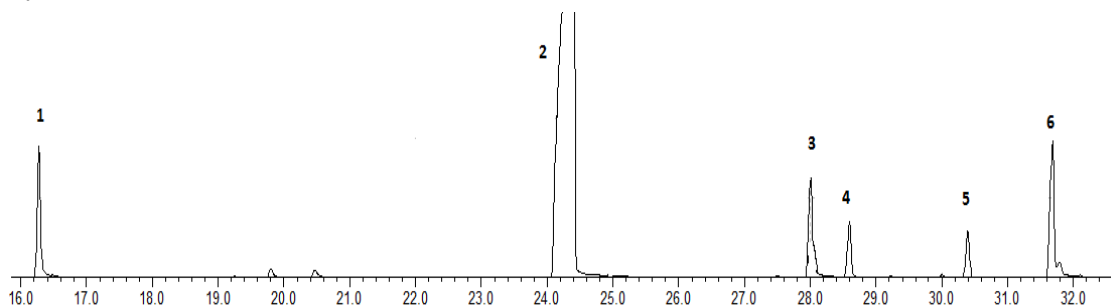
**Tabela 3.** Valores de inibição da análise de *screening* (mg/mL). Óleos essenciais que apresentaram valores de inibição iguais a 10 mg/mL ou a 1 e 10 mg/mL foram selecionados para as análises posteriores.

Óleo essencial	Bactéria				
	MV518	MV780	MV1022	MIDG2331	S1
Alecrim	>10	>10	>10	>10	>10
Café	>10	>10	>10	>10	>10
Canela	1 e 10	1 e 10	1 e 10	1 e 10	1 e 10
Coentro	1 e 10	1 e 10	1 e 10	1 e 10	1 e 10
Curry	>10	>10	>10	>10	>10
Eucalipto	10	10	10	10	10
Gengibre	>10	>10	>10	>10	>10
Hortelã do campo	10	10	10	10	10
Hortelã pimenta	10	10	10	10	10
Laranja-doce	>10	>10	>10	>10	>10
Lima-comum	>10	>10	>10	>10	>10
Limão	>10	>10	>10	>10	>10
Louro	10	10	10	10	10
Manjerona	10	10	10	10	10
Melaleuca	>10	>10	>10	>10	>10
Noz moscada	>10	>10	>10	>10	>10
Tangerina	>10	>10	>10	>10	>10
Tomilho	10	10	10	1 e 10	10

## **4.2. Análises cromatográficas dos óleos essenciais ativos**

Os óleos essenciais que apresentaram atividade frente as bactérias foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para determinar seus componente majoritários. A maioria dos óleos apresentou compostos descritos anteriormente com atividade antimicrobiana e estão representados nas figuras 9 a 16.

A.

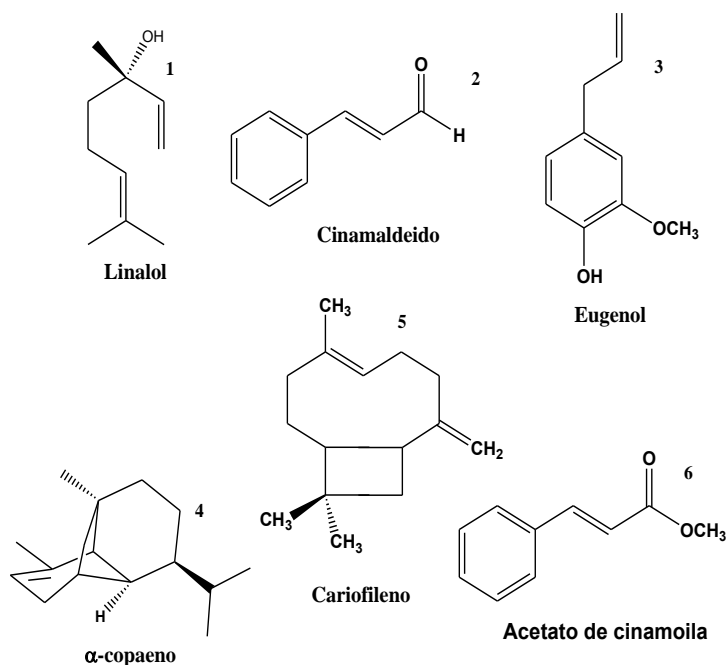


B.

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	16.274	Linalol	97%	5.85	1.095
2	24.403	Cinamaldeído	97%	69.65	1.272
3	28.008	Eugenol	97%	4.94	1.354
4	28.596	$\alpha$ -copaeno	93%	2.67	1.368
5	30.393	$\beta$ -cariofileno	96%	2.23	1.410
6	31.683	Acetato de cinamila	96%	6.60	1.442

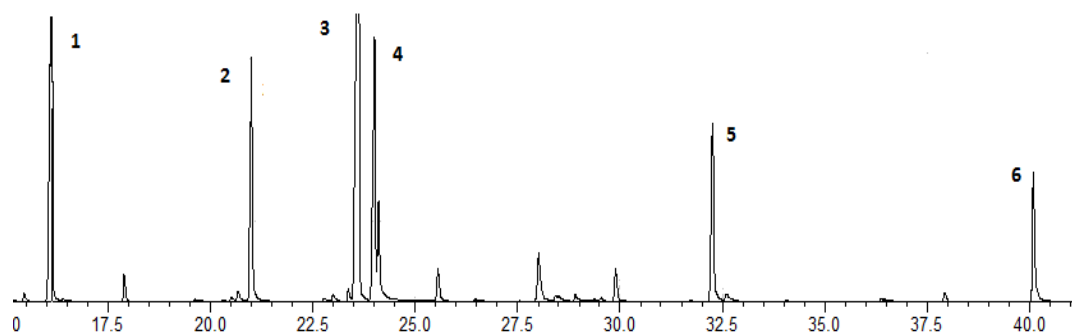
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

C.



**Figura 9.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de canela. **A** – Cromatograma do óleo de canela. **B** – Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

**A.**

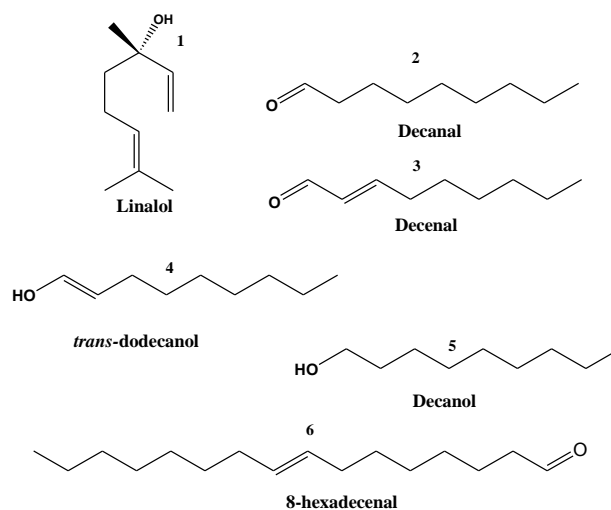


**B.**

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	16.31	Linalol	96	10.15	1.053
2	21.15	Decanal	97	7.59	1.204
3	23.75	Decenal	93	12.59	1.193
4	24.02	Trans-dodecanol	89	8.02	1.407
5	32.26	Decanol	95	5.39	1.272
6	40.10	8-hexadecenal	93	4.12	1.759

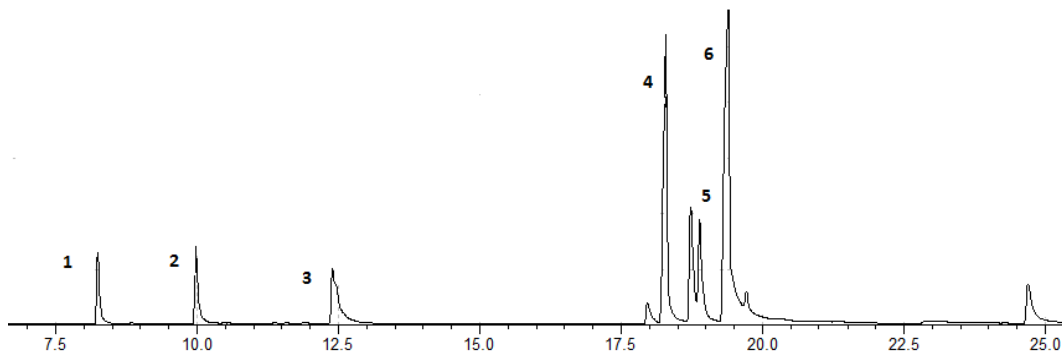
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

**C.**



**Figura 10.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de coentro. **A** – Cromatograma do óleo de coentro. **B** – Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

**A.**

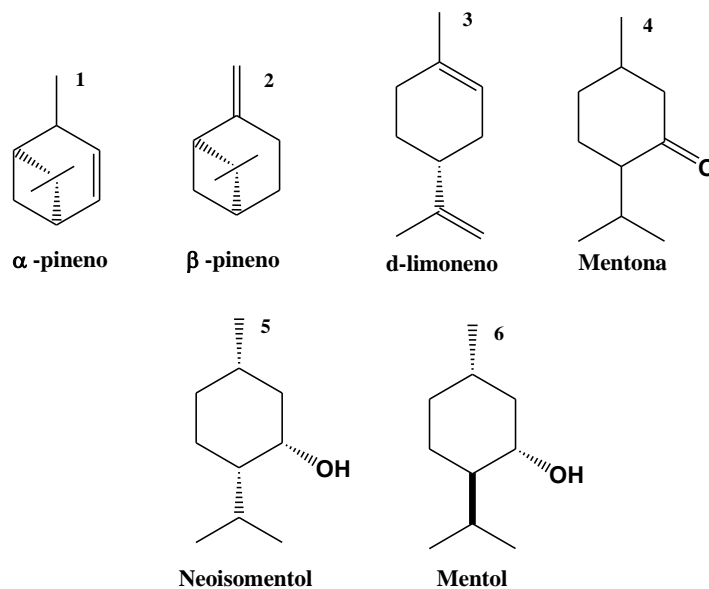


**B.**

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	8.25	$\alpha$ -pineno	96	6.42	939
2	9.99	$\beta$ -pineno	95	6.97	980
3	12.40	d-limoneno	94	4.90	1.031
4	18.29	Mentona	96	26.40	1.154
5	18.90	Neoisomentol	97	9.31	1.188
6	19.40	Mentol	98	30.26	1.173

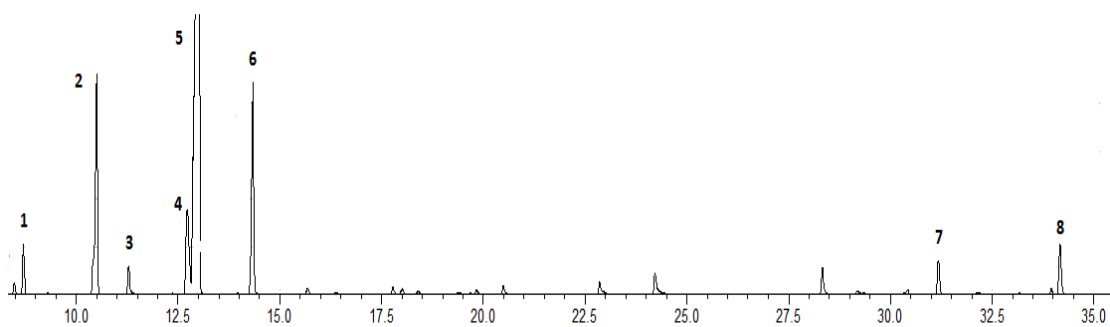
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

**C.**



**Figura 11.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de hortelã do campo. **A** – Cromatograma do óleo de hortelã do campo. **B** – Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

A.

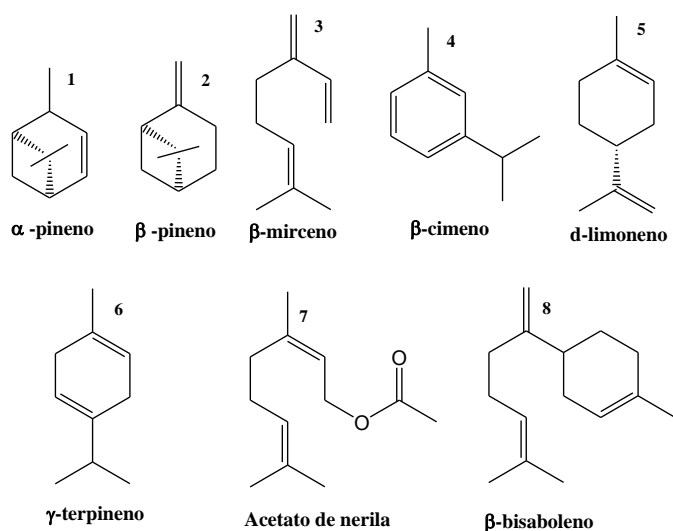


B.

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	8.71	α-pineno	97	2.01	939
2	10.51	β-pineno	96	11.39	980
3	11.29	β-mirceno	95	1.35	991
4	12.73	β-cimeno	97	4.28	1.022
5	13.02	d-limoneno	96	28.56	1.031
6	14.35	γ-terpineno	97	11.32	1.024
7	28.33	Acetato de nerila	97	1.17	1.365
8	34.17	β-bisaboleno	95	2.74	1.671

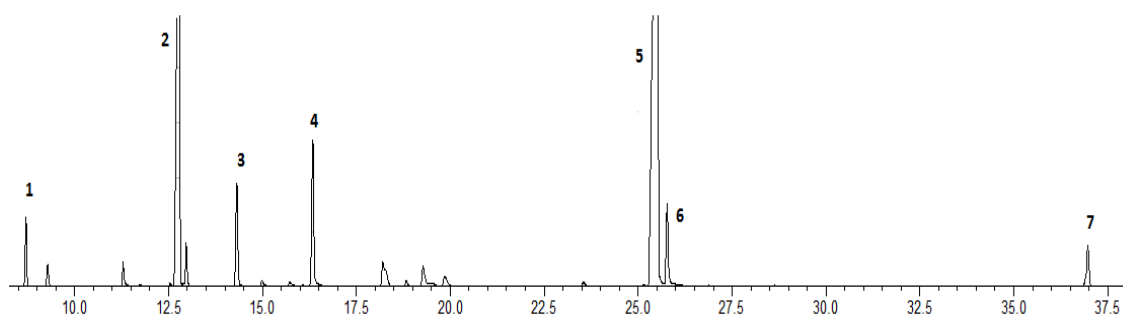
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

C.



**Figura 12.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de hortelã pimenta. **A** – Cromatograma do óleo de hortelã pimenta. **B** – Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

**A.**

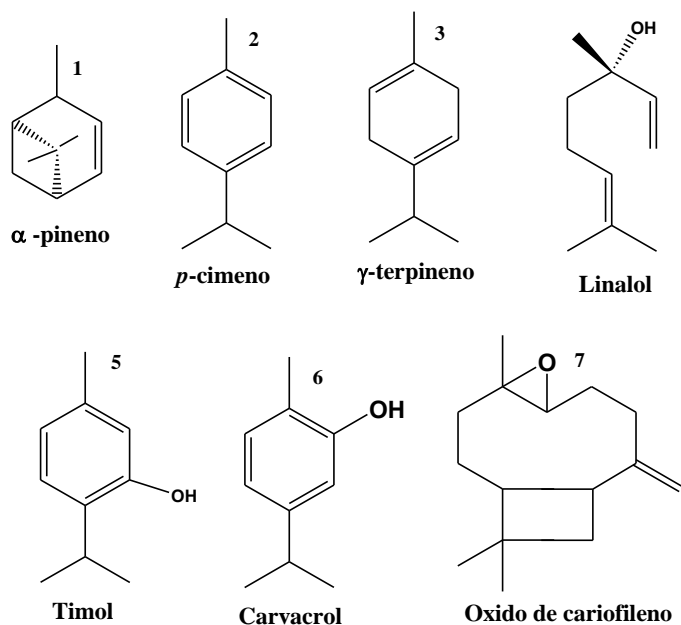


**B.**

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	8.706	$\alpha$ -pineno	97	2.10	939
2	12.781	<i>p</i> -cimeno	96	28.81	1.020
3	12.972	$\gamma$ -terpineno	96	1.33	1.024
4	14.315	Linalol	97	3.85	1.053
5	16.342	Timol	98	6.05	1.097
6	25.521	Carvacrol	97	48.43	1.296
7	25.773	Óxido de cariofileno	95	2.83	1.302

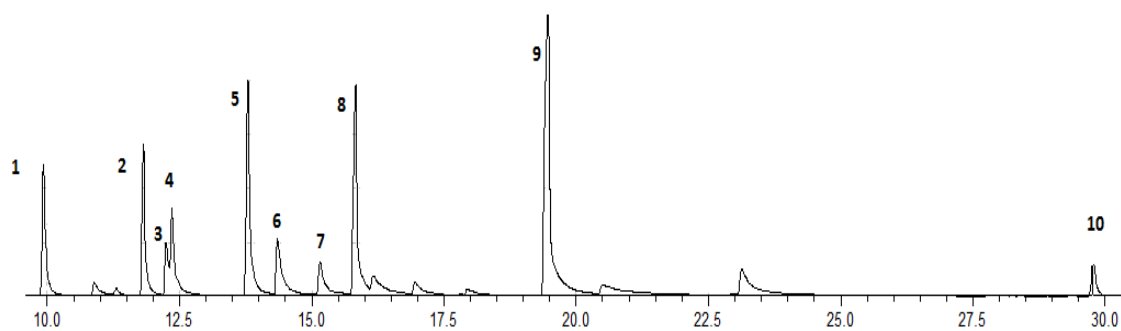
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

**C.**



**Figura 13.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de tomilho. **A** – Cromatograma do óleo de tomilho. **B** – Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

**A.**

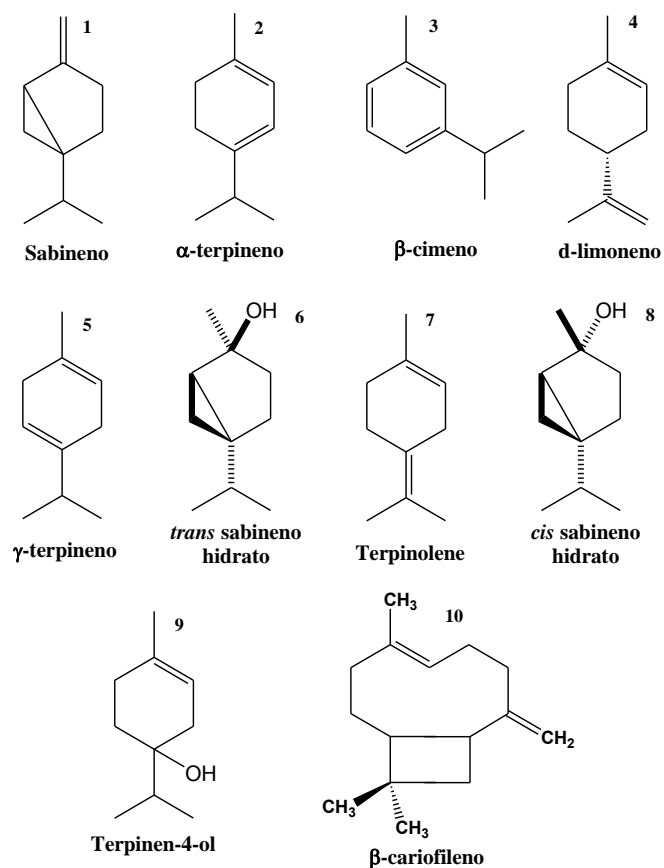


**B.**

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	8.78	Sabineno	96	11	976
2	10.9	$\alpha$ -terpineno	97	13	1.018
3	12.73	$\beta$ -cimeno	90	4,6	1.022
4	12.40	d-limoneno	90	8	1.031
5	14.35	$\gamma$ -terpineno	97	14	1.024
6	18.47	<i>trans</i> -sabineno hidratado	96	5,5	1.097
7	19.20	Terpinoleno	94	3	1.088
8	20.63	<i>cis</i> -sabineno hidratado	95	11	1.068
9	26.59	Terpinen-4-ol	95	31	1.177
10	30.393	$\beta$ -cariofileno	95	3	1.418

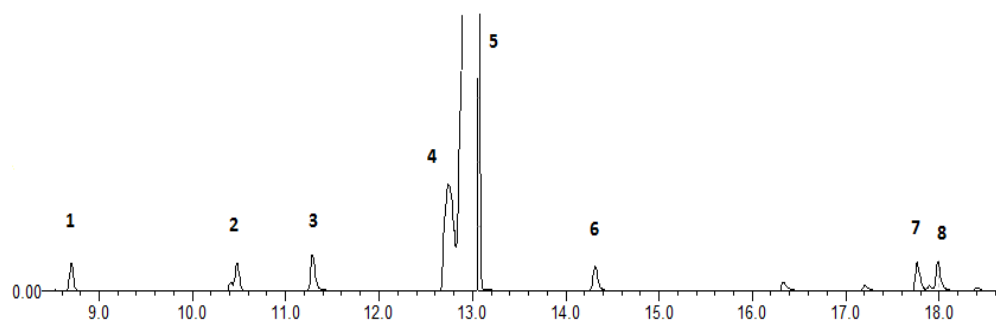
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

C.



**Figura 14.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de manjericão. **A** – Cromatograma do óleo de manjericão. **B** - Estrutura química dos principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

A.

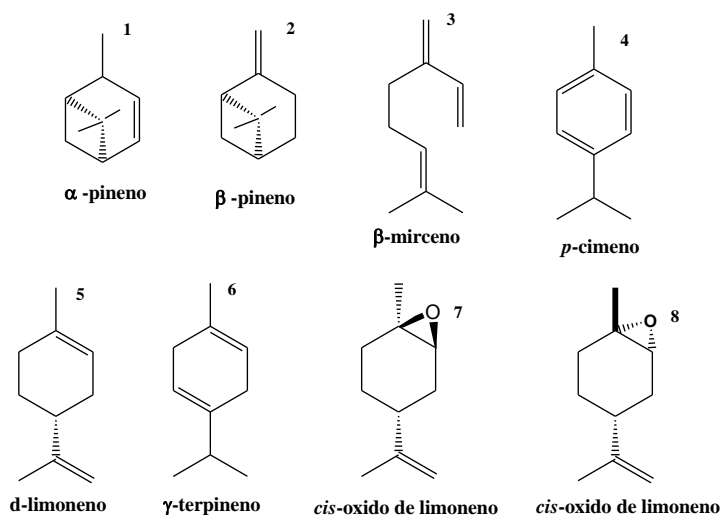


B.

Pico	Tr <sup>1</sup> (min)	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	8.77	$\alpha$ -pineno	96	1.104	939
2	10.47	$\beta$ -pineno	95	10.47	980
3	11.29	$\beta$ -mirceno	95	1.73	991
4	12.75	<i>p</i> -cimeno	89	3.94	1.020
5	13.07	d-limoneno	94	33.31	1.031
6	14.32	$\gamma$ -terpineno	96	1.20	1.024
7	17.78	<i>Cis</i> -óxido de limoneno	95	0.71	1.134
8	18.00	<i>Trans</i> -óxido de limoneno	95	1.21	1.139

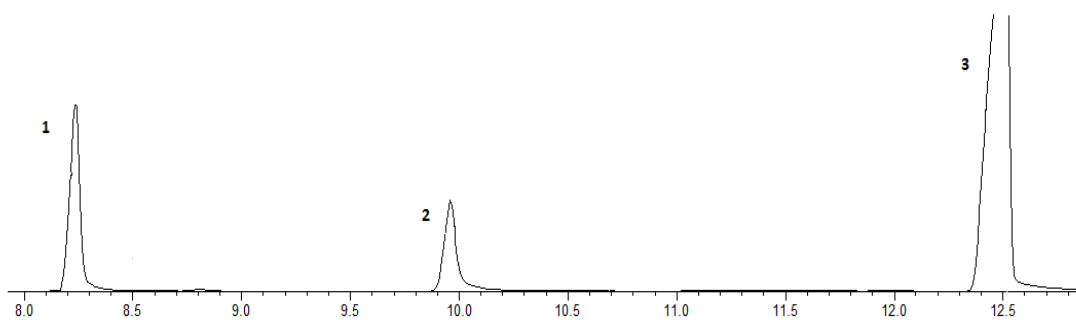
<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

C.



**Figura 15.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de eucalipto. **A** – Cromatograma do óleo de eucalipto. **B** - Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

**A.**

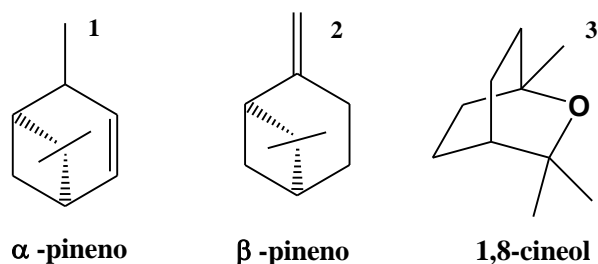


**B.**

Pico	Tr (min) <sup>1</sup>	Composto	Í S <sup>2</sup> (%)	%	IK <sup>3</sup>
1	8.86	α-pineno	97	20.33	939
2	9.96	β-pineno	95	15.03	980
3	12.52	1,8-cineol	96	64.64	1.033

<sup>1</sup> - Tempo de retenção; <sup>2</sup> - Índice de similaridade; <sup>3</sup> - Índice de Kovats

**C.**



**Figura 16.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de louro. **A** – Cromatograma do óleo de louro. **B** - Principais componentes. **C** – Estrutura química dos principais componentes.

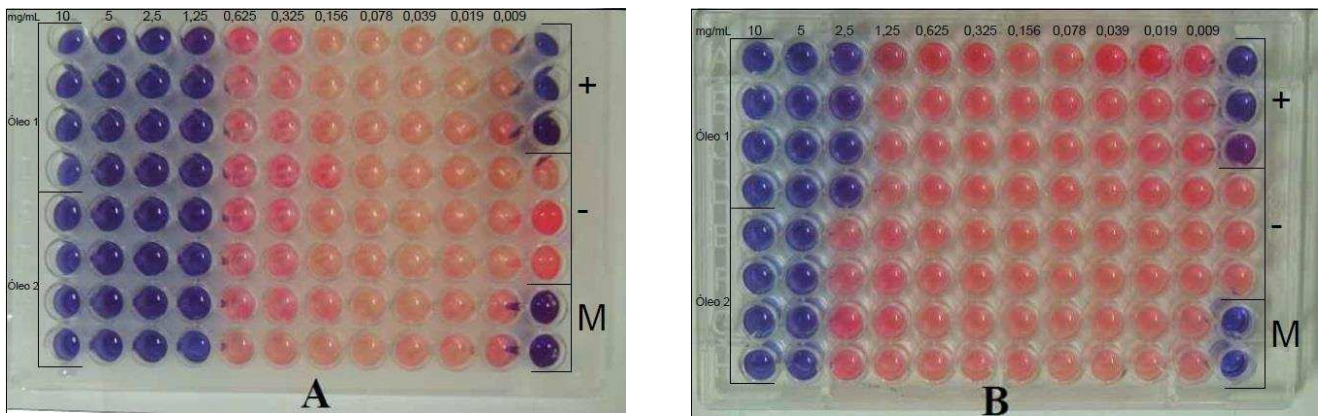
### **4.3. CIM e CBM dos óleos essenciais:**

Os resultados da CIM e da CBM dos oito óleos essenciais testados nas cinco bactérias estão presentes na Tabela 4. A CIM e a CBM foram idênticas para os óleos em todos os isolados e variaram de 5 mg/mL a 0,3125 mg/mL. As imagens de algumas placas contendo os resultados da CIM para as cinco bactérias estão apresentadas nas Figuras 17 a 21. As imagens das placas com os resultados da CBM para as cinco bactérias estão apresentadas nas Figuras 22 a 26.

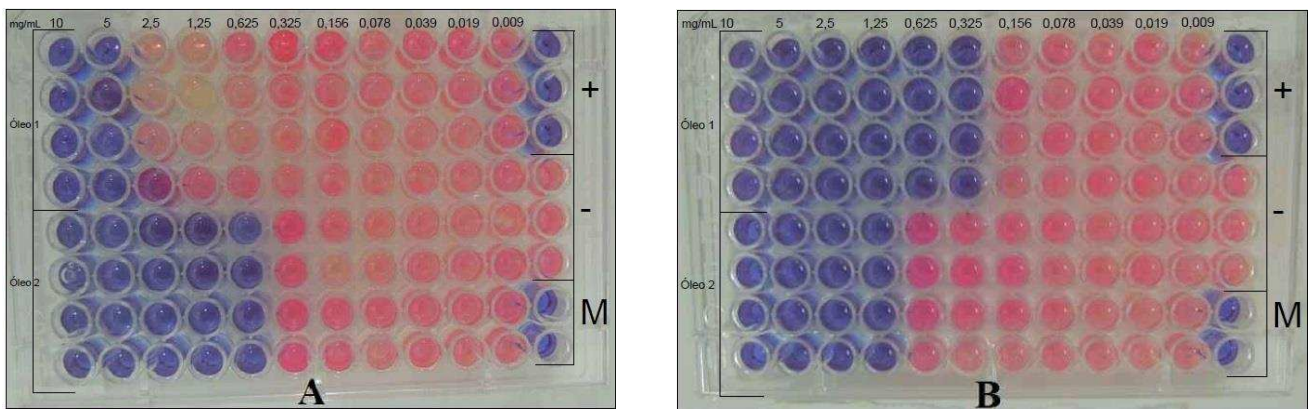
**Tabela 4.** Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) dos óleos essenciais nas bactérias testadas.

Bactéria	MV518		MV780		MV1022		MIDG2331		S1	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Canela	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
Coentro	0,3125	0,3125	0,3125	0,3125	0,625	0,625	0,3125	0,3125	0,3125	0,3125
Hortelã pimenta	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Hortelã do campo	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Tomilho	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	0,625	0,625	1,25	1,25
Manjerona	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	1,25	1,25	2,5	2,5
Eucalipto	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5
Louro	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

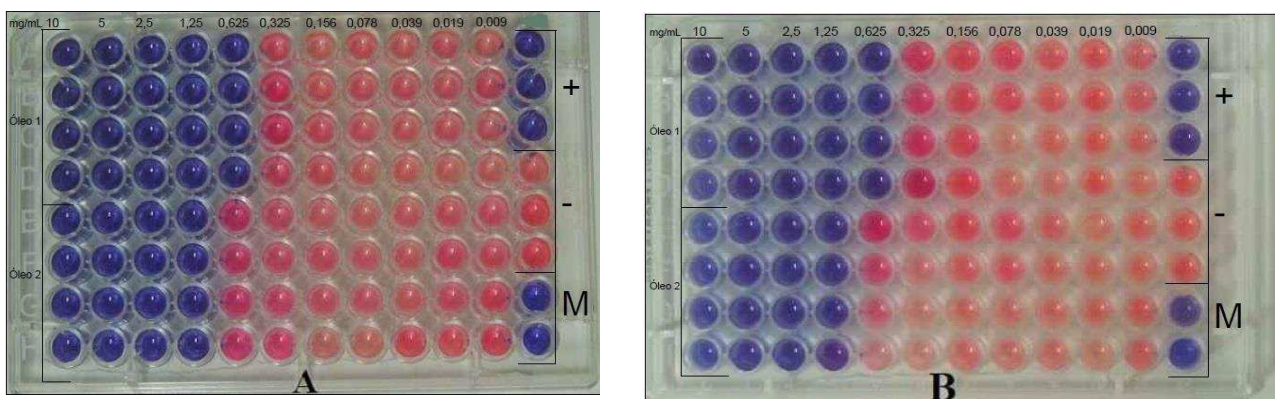
CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima.



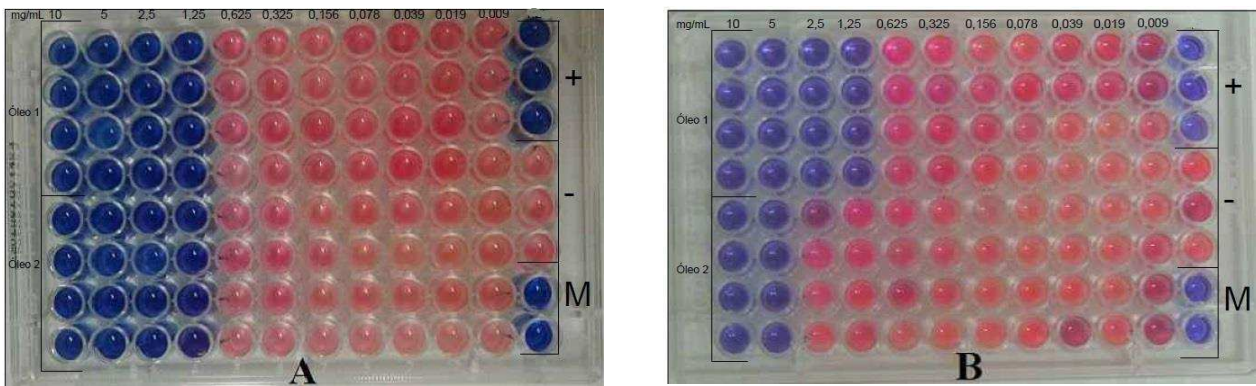
**Figura 17.** Ensaio de CIM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MV518, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 - Hortelã do campo; 2 - Hortelã pimenta. Óleos na placa B: 1 – Manjerona; 2 - Louro. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.



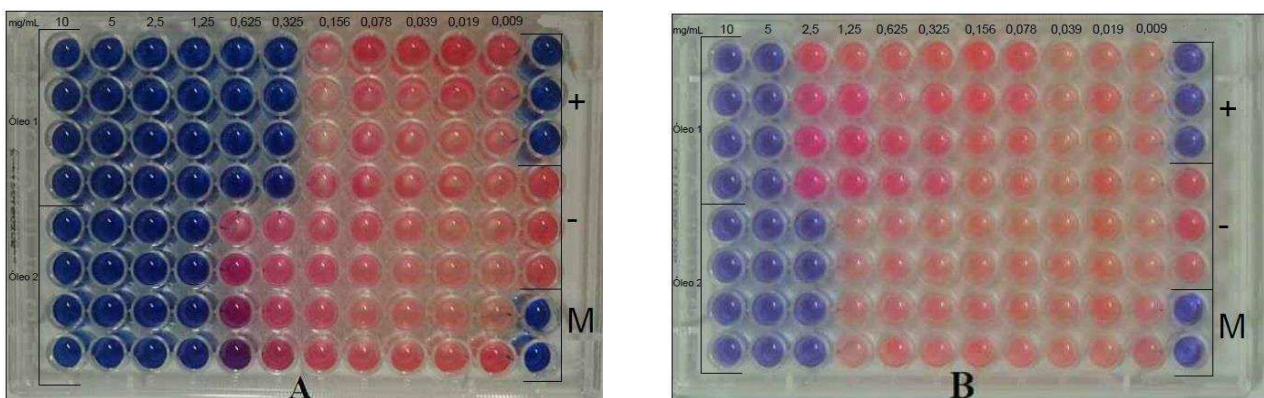
**Figura 18.** Ensaio de CIM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MV780, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 – Louro; 2 - Canela. Óleos na placa B: 1 – Coentro; 2 - Hortelã pimenta. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.



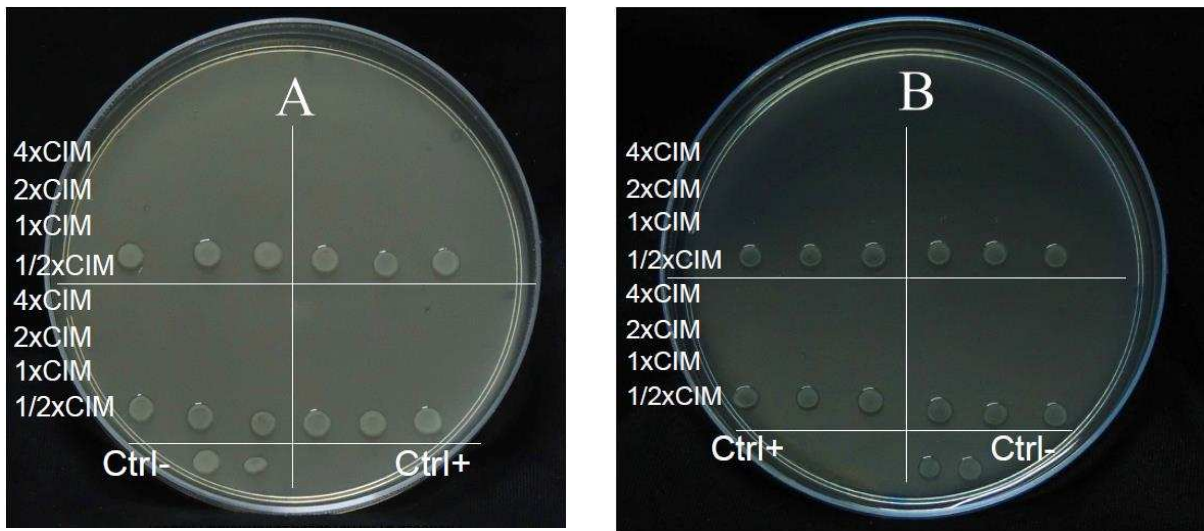
**Figura 19.** Ensaio de CIM para a bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MV1022, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 – Canela; 2 - Hortelã do campo. Óleos na placa B: 1 – Coentro; 2 - Hortelã pimenta. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.



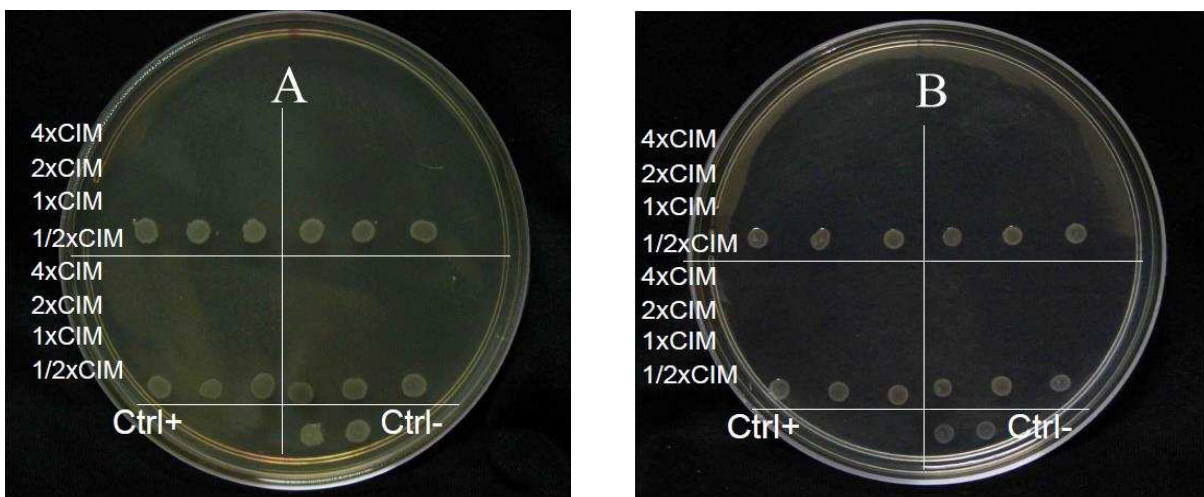
**Figura 20.** Ensaio de CIM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MIDG2331, sorotipo 8. Óleos na placa A: 1 - Hortelã do campo; 2 - Manjerona. Óleos na placa B: 1 – Hortelã pimenta; 2 - Louro. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.



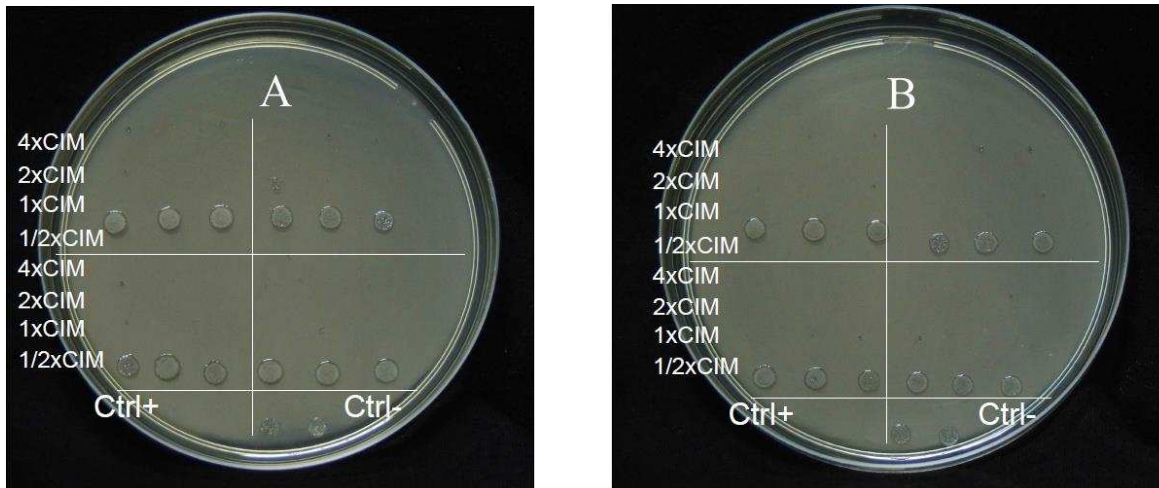
**Figura 21.** Ensaio de CIM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, S1 (ATCC), sorotipo 1. Óleos na placa A: 1 – Coentro; 2 - Tomilho. Óleos na placa B: 1 – Louro; 2 - Eucalipto. +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo BHI + NAD.



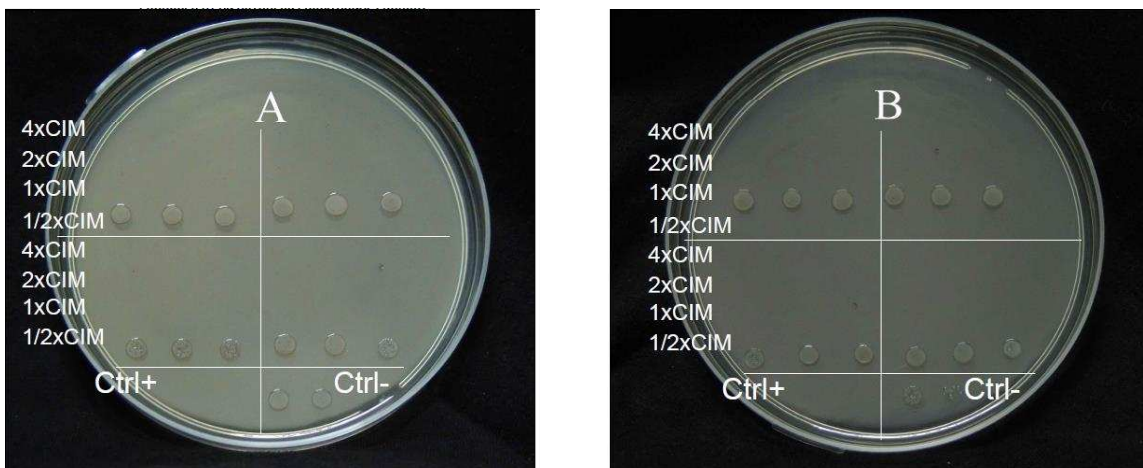
**Figura 22.** Ensaio de CBM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MV518, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.



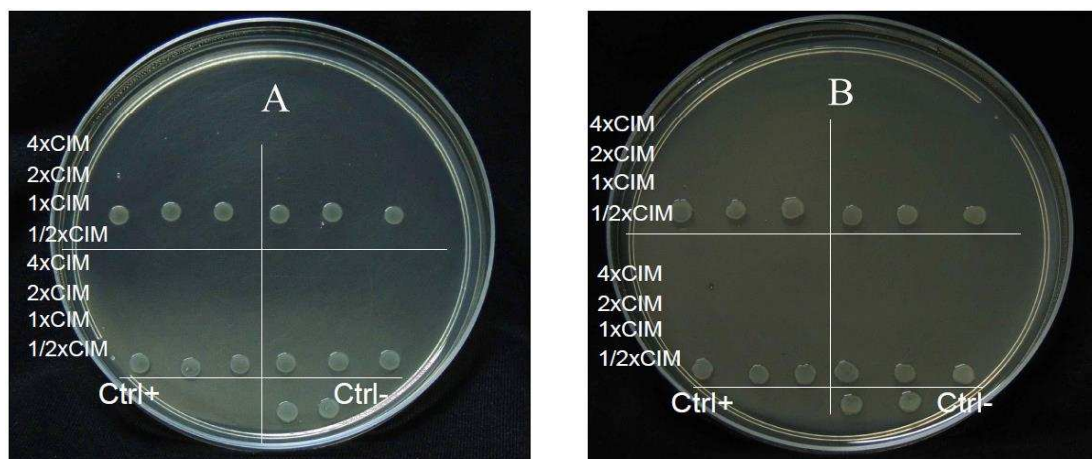
**Figura 23.** Ensaio de CBM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MV780, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.



**Figura 24.** Ensaio de CBM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MV1022, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.



**Figura 25.** Ensaio de CBM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, isolado MIDG2331, sorotipo 8, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.

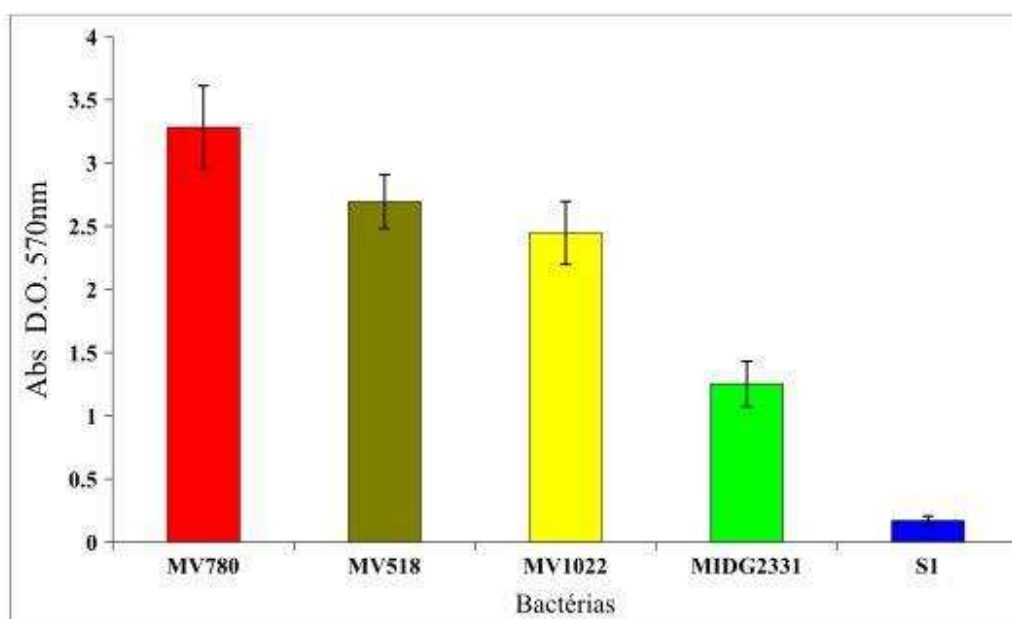


**Figura 26.** Ensaio de CBM para bactéria *A. pleuropneumoniae*, S1 (ATCC), sorotipo 1, utilizando as quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM). Óleos na placa A – Canela, coentro, hortelã pimenta e hortelã do campo. Óleos na placa B – Tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.

Os óleos analisados variaram a sua classificação entre moderadamente ativo e ativo, sendo sete considerados ativos para ao menos um isolado. O óleo de louro foi o único considerado moderadamente ativo para todos os isolados (5 mg/mL). O óleo de coentro obteve a CIM e a CBM mais baixa para a maioria das bactérias testadas (0,3125 mg/mL), seguido da canela (0,625 mg/mL) como os mais efetivos na inibição das bactérias.

#### 4.4. Biofilme pré-formado

Utilizando esses conceitos de classificação quanto à produção de biofilme, os isolados MV780, MV518, MV1022 e MIDG2331 foram selecionados por serem fortes formadores de biofilme. A bactéria S1, do sorotipo 1, não foi utilizada por ser considerada como formadora moderável de biofilme (Figura 27). Os oito óleos essenciais que apresentaram atividade antibacteriana no ensaio de *screening* foram utilizados para as futuras análises.



**Figura 27.** Produção de biofilme pelas bactérias do presente estudo.

Os resultados em porcentagem do rompimento do biofilme nos isolados, pela utilização dos óleos essenciais estão representados na Tabela 5. Os resultados gráficos das análises dos óleos essenciais nos biofilmes pré-formados dos isolados selecionados estão presentes nas Figuras 28 a 31.

Os óleos de coentro e canela apresentaram capacidade de rompimento do biofilme de todos os isolados nas concentrações 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, sendo a maior concentração capaz de romper em média 50 % a 60 %. O óleo de canela foi capaz de romper 80 % do biofilme pré-formado do isolado MV1022, sendo o maior valor observado nos ensaios. Este isolado apresentou maior susceptibilidade aos óleos

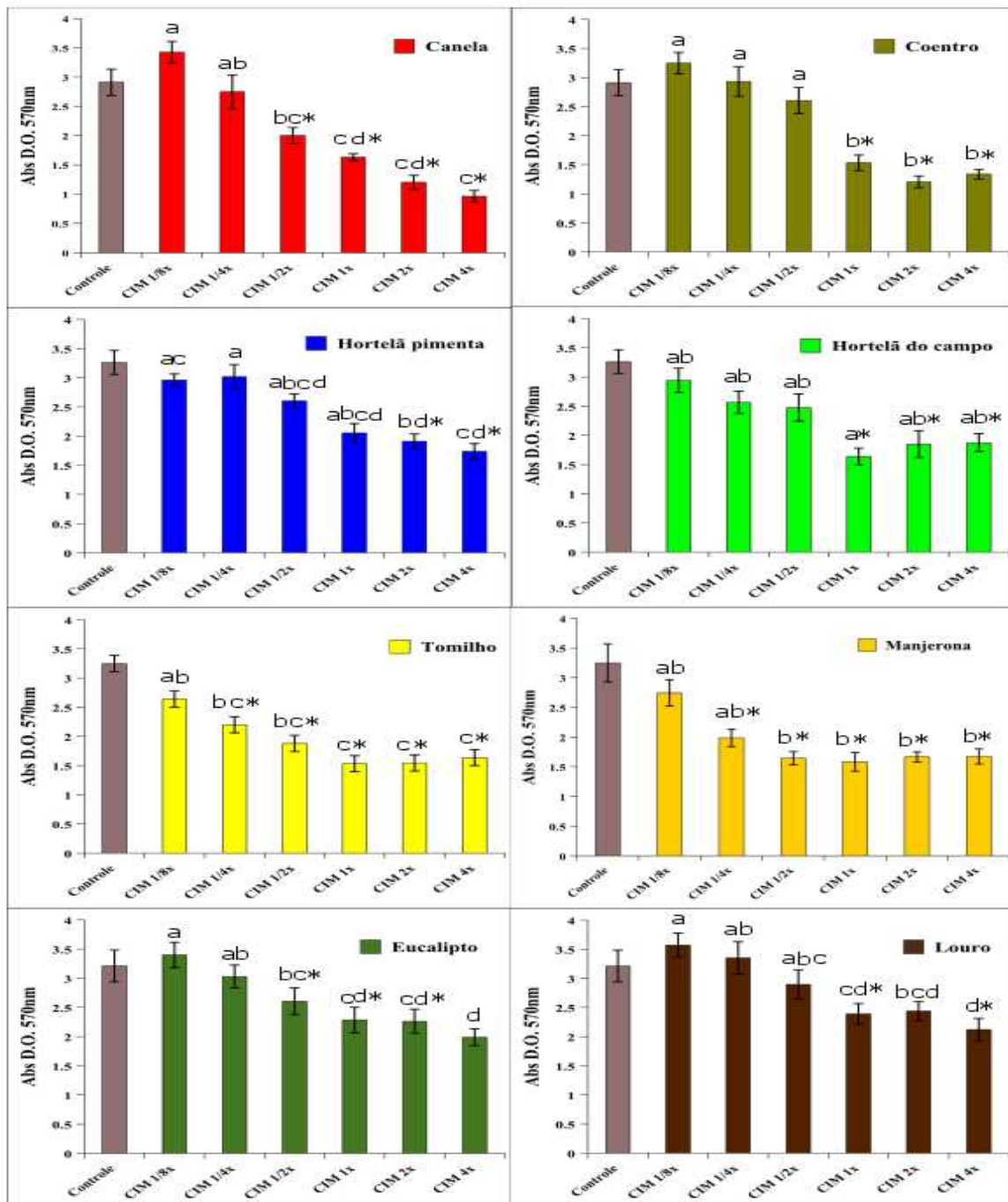
testados, sendo que todos foram capazes de romper o biofilme nas concentrações 1xCIM e supra-CIM. Neste mesmo isolado, o óleo de canela e eucalipto foram capazes de romper o biofilme na menor concentração (1/8xCIM) em 21 % e 30,6 %, respectivamente. A maior concentração do óleo de tomilho foi efetiva contra o biofilme dos isolados MV518 (49 % de rompimento) e MV1022 (70,5 %). Entretanto, para os isolados MV780 e MIDG2331, esse apresentou capacidade de aumentar o biofilme produzido por esses isolados. Para o MV780 o aumento foi aproximadamente 39,7 % na concentração 1/8xCIM e para o MIDG2331 esse aumento foi de 34,7 % na concentração 1xCIM.

**Tabela 5.** Porcentagem do rompimento do biofilme pré-formado dos quatro isolados de *A. pleuropneumoniae*, sorotipo 8, pelos óleos essenciais.

MV518							MV780						
	4x	2x	1x	1/2x	1/4x	1/8x		4x	2x	1x	1/2x	1/4x	1/8x
Canela	66,70 %	58,46 %	43,65 %	30,79 %	-	-	Canela	33,15 %	28,95 %	-	-	-	-
Coentro	53,77 %	58,39 %	47,01 %	-	-	-	Coentro	52,71 %	53,46 %	49,68 %	26,12 %	16,33 %	13,40 %
H. pimenta	46,69 %	41,38 %	-	-	-	-	H. pimenta	24,00 %	25,82 %	22,42 %	-	-	-
H. campo	42,52 %	43,27 %	49,72 %	-	-	-	H. campo	-	-	-	-	-	-
Tomilho	49,59 %	52,41 %	52,82 %	42,13 %	32,29 %	-	Tomilho	-	-	-	-	-	+39,74 %
Manjerona	48,46 %	48,69 %	51,27 %	49,37 %	38,91 %	-	Manjerona	41,02 %	49,32 %	41,06 %	22,39 %	-	-
Eucalipto	38,11 %	29,59 %	28,88 %	18,77 %	-	-	Eucalipto	25,60 %	23,38 %	22,26 %	-	-	-
Louro	33,93 %	-	25,55 %	-	-	-	Louro	21,87 %	28,68 %	36,64 %	30,88%	-	-
MV1022							MIDG2331						
	4x	2x	1x	1/2x	1/4x	1/8x		4x	2x	1x	1/2x	1/4x	1/8x
Canela	76,63 %	53,93 %	17,30 %	21,79 %	16,32 %	21,29 %	Canela	51,76%	33,70 %	30,12 %	23,86%	18,61%	37,17%
Coentro	53,50 %	51,32 %	54,30 %	-	-	-	Coentro	59,56%	57,00 %	29,47 %	-	14,64 %	-
H. pimenta	56,51 %	49,58 %	46,56 %	-	-	-	H. pimenta	36,97%	34,90 %	-	-	-	-
H. campo	58,39 %	55,09 %	44,56 %	-	-	-	H. campo	-	-	-	-	-	-
Tomilho	70,56 %	67,23 %	64,72 %	48,02 %	-	-	Tomilho	40,03%	-	+34,76 %	-	-	-
Manjerona	61,80 %	57,39 %	46,31 %	26,19 %	-	-	Manjerona	49,95%	32,71%	-	-	-	-
Eucalipto	75,12 %	69,45 %	59,23 %	59,15 %	44,36%	30,68 %	Eucalipto	22,10%	21,87 %	21,99 %	22,03 %	-	-
Louro	69,57 %	50,71 %	37,38%	51,09 %	46,83 %	-	Louro	-	38,91%	32,20 %	35,35 %	38,32 %	44,98 %

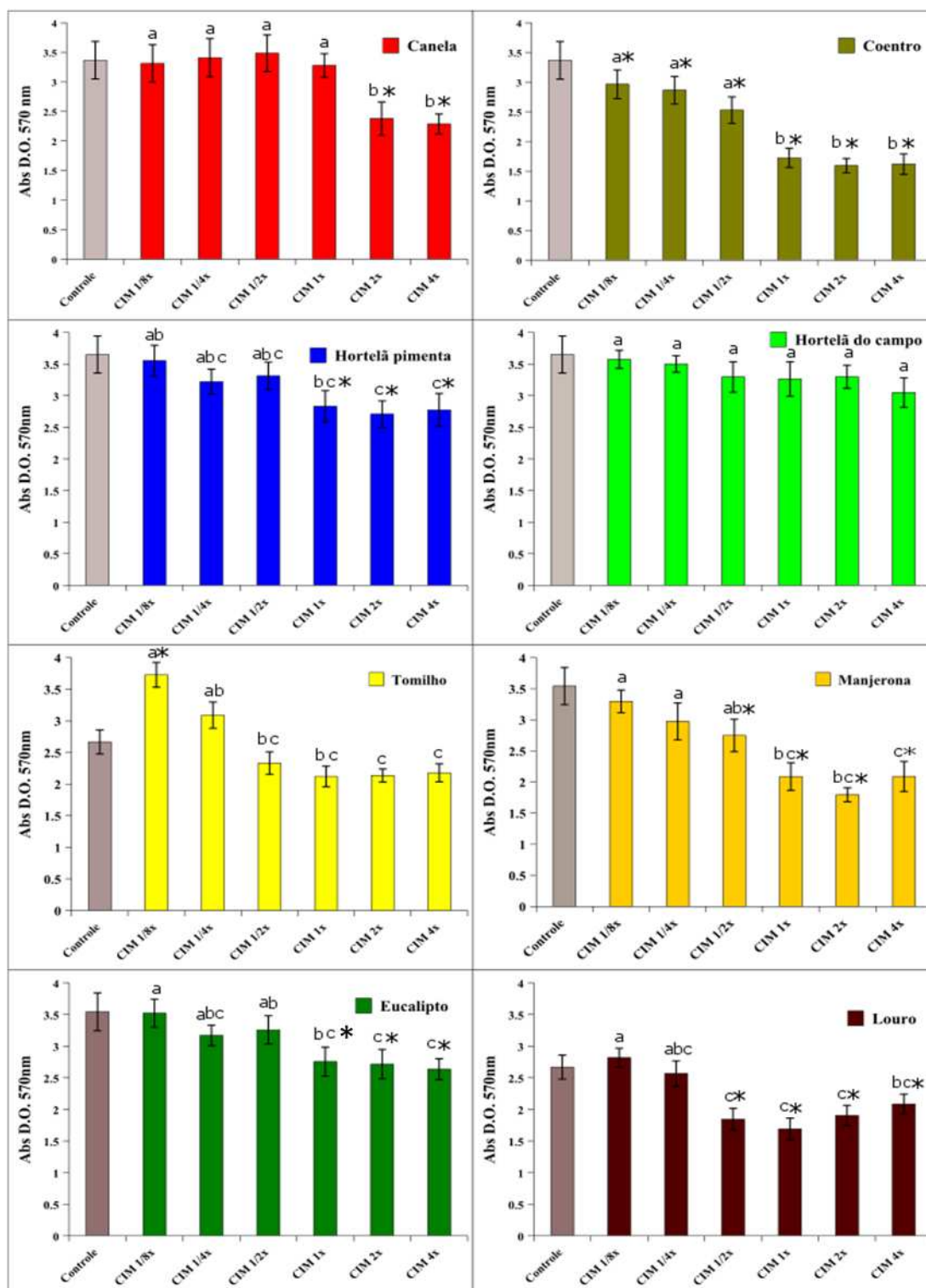
-: Não significativo em relação ao controle. +: Aumento do biofilme em relação ao controle.

# MV518



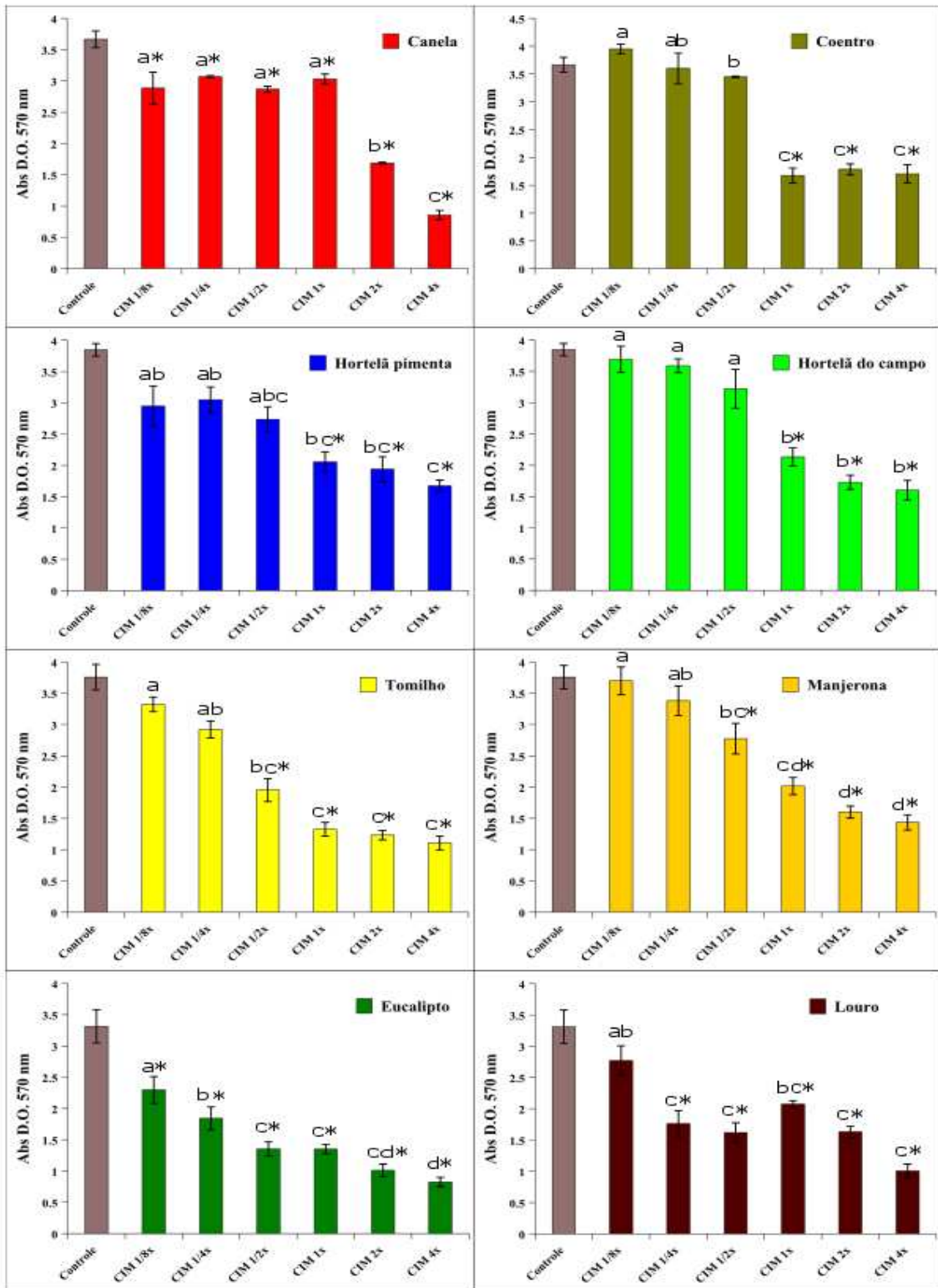
**Figura 28.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MV518. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

# MV780



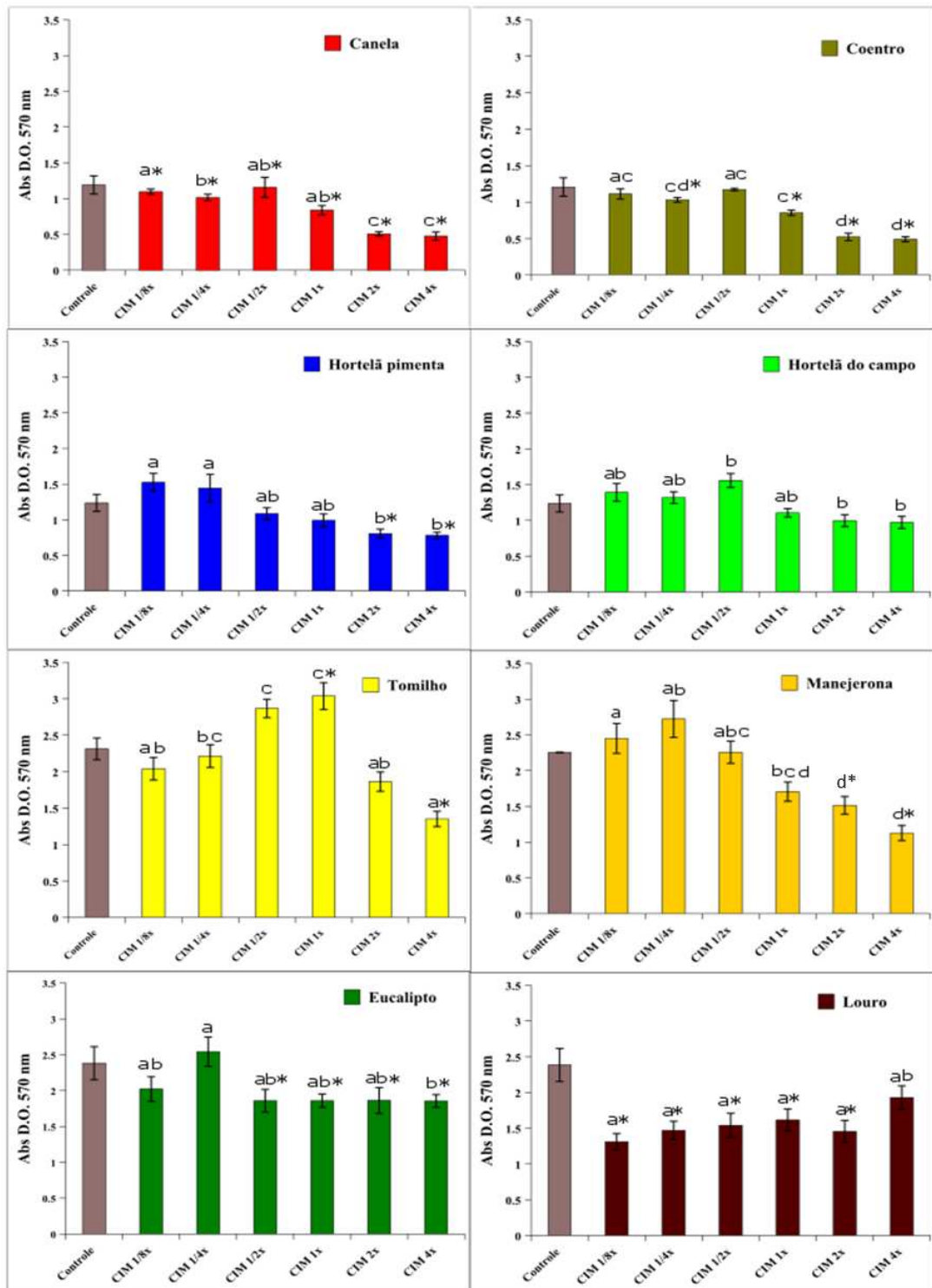
**Figura 29.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MV780. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

# MV1022



**Figura 30.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MV1022. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

# MIDG2331



**Figura 31.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MIDG2331. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

#### **4.5. Biofilme em formação**

Os resultados em porcentagem de inibição do biofilme em formação estão representados na Tabela 6. Os resultados gráficos das análises dos óleos essenciais nos biofilmes pré-formados dos isolados estão presentes nas Figuras 32 a 35.

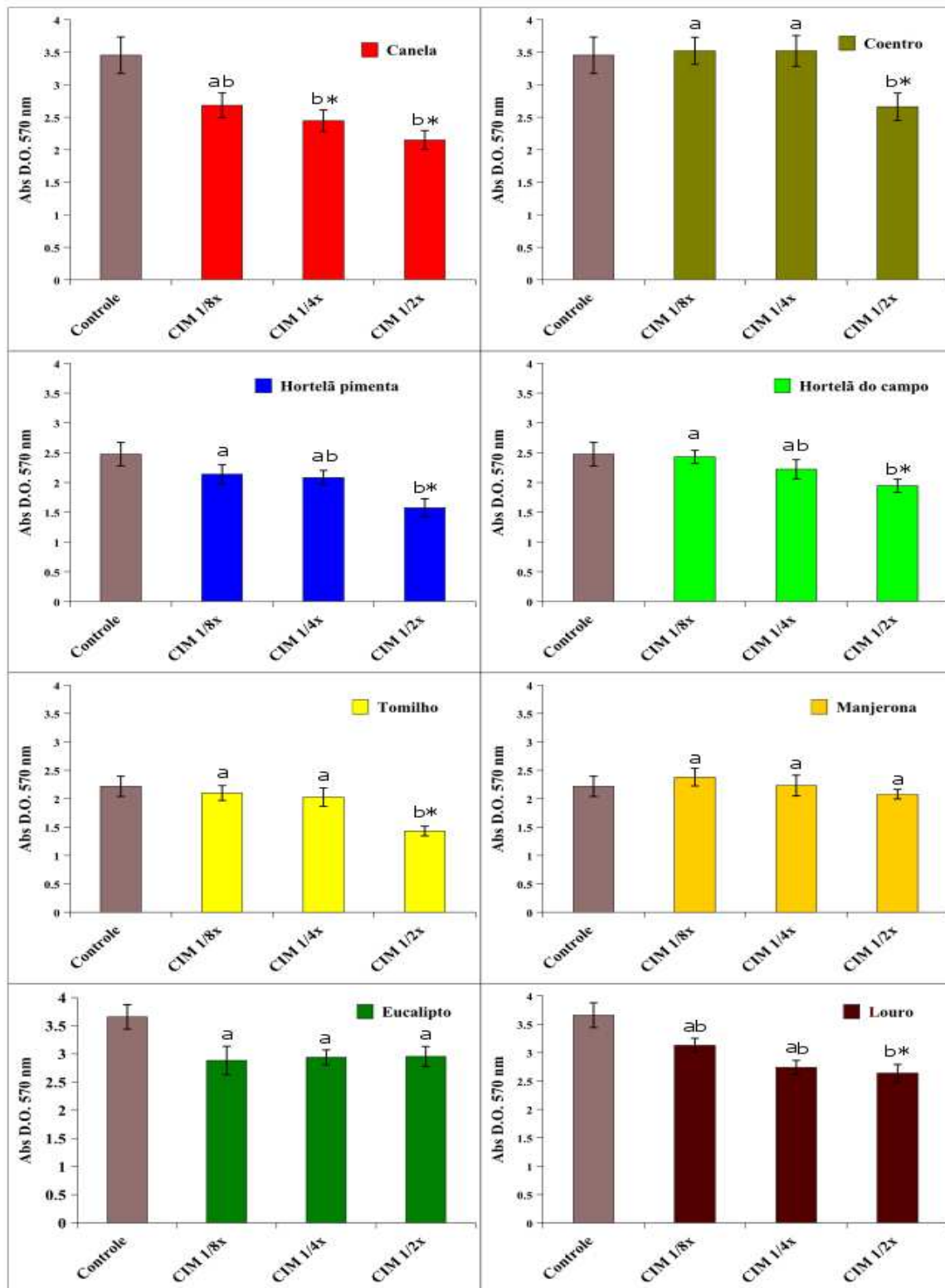
O óleo de canela foi capaz de diminuir a formação do biofilme nos três isolados brasileiros, com o valor de inibição variando entre 37,75 % e 69,36 %. Os óleos de manjerona e louro foram os mais efetivos na inibição da formação do biofilme para o isolado MV1022. Na menor concentração destes (1/8xCIM), a inibição foi de 40,26 % e 53,90 %, respectivamente. A maior porcentagem de inibição ocorreu na concentração de 1/2xCIM do óleo de coentro no isolado MIDG2331, sendo esse valor de 72,93 %. Entretanto, para esse mesmo óleo no mesmo isolado, a menor concentração (1/8xCIM) foi capaz de induzir a formação de biofilme em 45,15 %. Esse aumento também foi observado na formação do biofilme na menor concentração do óleo de coentro para o isolado MV780 (19,20 % de aumento). O óleo de hortelã pimenta foi capaz de romper o biofilme do isolado MIDG2331 apenas na menor concentração, sendo essa taxa de 41,95 %.

**Tabela 6.** Porcentagem da inibição do biofilme em formação dos quatro isolados de *A. pleuropneumoniae*, sorotipo 8, pelos óleos essenciais.

MV518				MV780			
Óleos	1/2x	1/4x	1/8x	Óleos	1/2x	1/4x	1/8x
Canela	37,75 %	29,19 %	-	Canela	51,91 %	24,79 %	-
Coentro	22,93 %	-	-	Coentro	38,12 %	-	+19,20 %
H. pimenta	36,36 %	-	-	H. pimenta	41,15 %	-	-
H. campo	21,45 %	-	-	H. campo	54,72 %	26,01 %	-
Tomilho	35,51 %	-	-	Tomilho	-	-	-
Manjerona	-	-	-	Manjerona	49,66 %	-	-
Eucalipto	-	-	-	Eucalipto	-	-	-
Louro	27,88 %	25,11 %	-	Louro	43,04 %	-	-
MV1022				MIDG2331			
Óleos	1/2x	1/4x	1/8x	Óleos	1/2x	1/4x	1/8x
Canela	69,36 %	-	-	Canela	-	-	-
Coentro	-	-	-	Coentro	72,93 %	54,92 %	+45,15 %
H. pimenta	-	-	-	H. pimenta	-	-	41,95 %
H. campo	-	-	-	H. campo	-	-	-
Tomilho	-	-	-	Tomilho	-	-	-
Manjerona	69,52 %	51,81 %	40,26 %	Manjerona	-	-	-
Eucalipto	-	-	-	Eucalipto	-	-	-
Louro	59,28 %	45,91 %	53,90 %	Louro	-	-	-

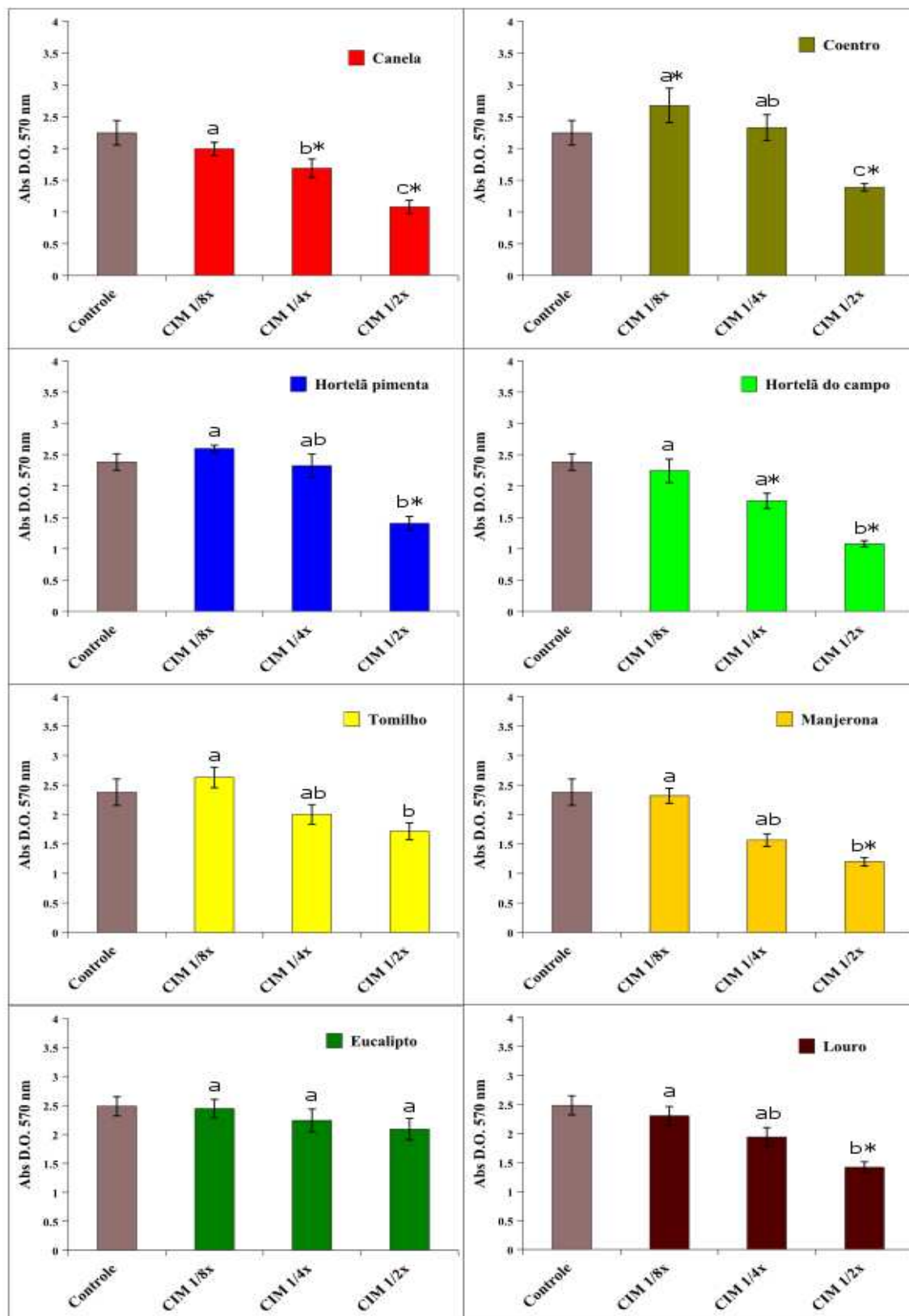
-: Não significativo em relação ao controle. +: Aumento do biofilme em relação ao controle.

# MV518



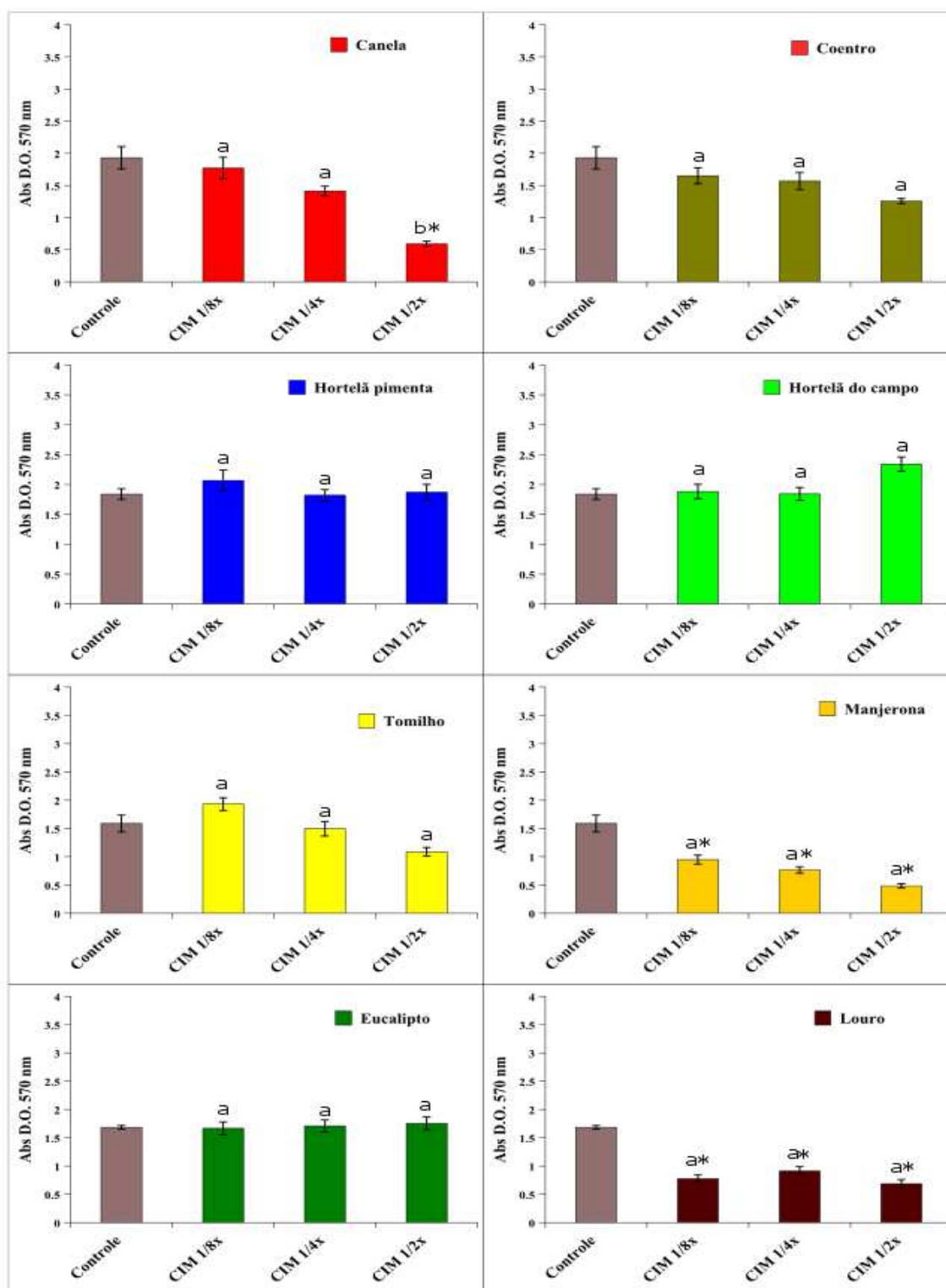
**Figura 32.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MV518. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

# MV780



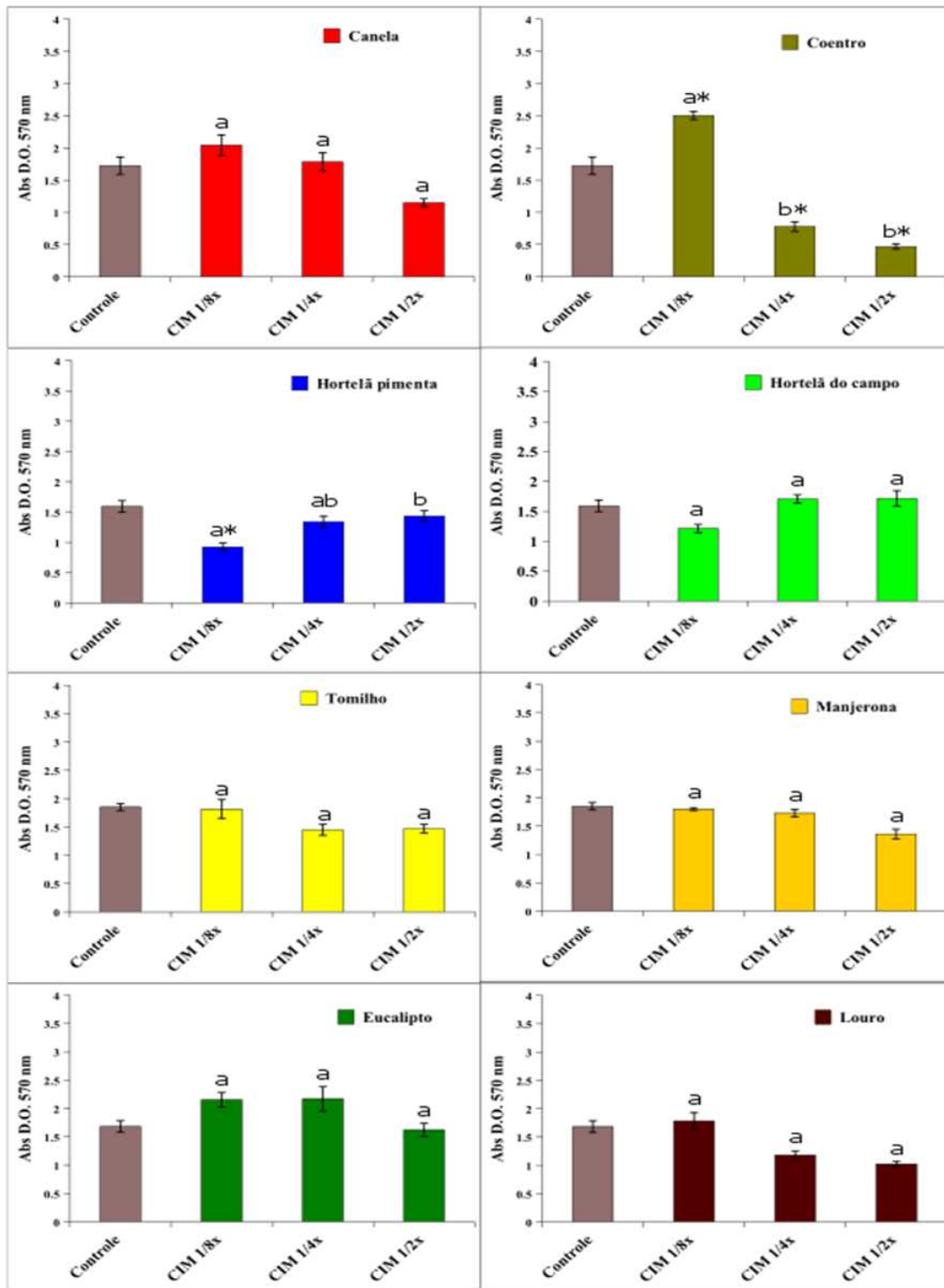
**Figura 33.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MV780. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

# MV1022



**Figura 34.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MV1022. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

# MIDG2331



**Figura 35.** Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação do isolado MIDG2331. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Mais de cem mil toneladas de antibióticos são produzidas anualmente no mundo, sendo que dois terços são destinados à pecuária (Bbosa & Mwebaza, 2013; Van Boeckel et al. 2015). Nesse contexto, a resistência bacteriana aos antibióticos causa uma preocupação em escala global, sendo necessária a busca por novos compostos antimicrobianos.

No presente trabalho, dos dezoito óleos analisados, oito apresentam atividade antimicrobiana contra isolados de *A. pleuropneumoniae*, sendo eles: canela, coentro, hortelã pimenta, hortelã do campo, tomilho, manjerona, eucalipto e louro. Estudos anteriores relataram a atividade antibacteriana desses óleos contra diversas espécies bacterianas como, por exemplo, a atividade antibacteriana do óleo de canela em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella anatum* (Shan et al., 2007; Unlu et al., 2010) e do óleo de coentro contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Xanthomonas campestris* (Lo Cantore et al., 2004; Matasyoh et al., 2009). Os demais óleos analisados neste trabalho, como hortelã do campo (Aggarwal et al., 2002), hortelã pimenta (İşcan et al., 2002), tomilho (Rota et al., 2008), manjerona (Vagi et al., 2005), eucalipto (Delaquis et al., 2002) e louro (Dadalioglu et al., 2004) também já apresentaram efeito bactericida avaliado em diferentes espécies bacterianas.

A similaridade da CIM e CBM foi observada para todos os óleos essenciais, evidenciando a característica bactericida destes. O ensaio de CBM é complementar ao ensaio de CIM, pois a inibição determinada pela CIM pode ocorrer tanto pela morte das células (característica bactericida) quanto pela inibição do crescimento (característica bacteriostática). Portanto, a CBM é realizada para determinar em qual concentração do composto as células foram mortas (Mah, 2014). Estudos anteriores relataram a característica bactericida de óleos essenciais em bactérias Gram-negativas (Friedman et al., 2002). Helander e colaboradores (1998) observaram que componentes fenólicos de alguns óleos essenciais atuam diretamente na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Essa característica também foi descrita por Rhayour e colaboradores (2003) que ao testar óleos como orégano e cravo, observaram o rompimento da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Os componentes fenólicos dos óleos essenciais possuem grande afinidade por compostos hidrofóbicos da bicamada lipídica das bactérias. A partir da interação destes componentes, pode ocorrer a desestabilização da

bicamada, conseqüentemente o estresse osmótico celular e o aumento da permeabilidade de membrana (Singh et al., 2002). Esses mesmos componentes fenólicos, em grandes quantidades, desnaturam as enzimas citoplasmáticas, afetando principalmente a divisão celular (Sacchetti et al., 2005).

A maioria desses componentes atua diretamente na membrana plasmática das células, devido à interação hidrofóbica com os lipídeos (Trombetta et al., 2005; Oyedemi et al., 2009). Essa interação poderia desestabilizar a bicamada lipídica, causando a maior fluidez de membrana, diminuição da permeabilidade seletiva e a ocorrência da dissipação do potencial de membrana com conseqüente redução na produção de ATP. Adicionalmente, componentes como o cinamaldeído e o linalol causam danos à parede celular, gerando estresse osmótico e lisando a célula (Gill & Holley, 2004; Alves et al., 2016). Esses compostos poderiam interagir com componentes da membrana plasmática e da parede celular de *A. pleuropneumoniae*, causando danos a essas estruturas. Os estresses causados por esses componentes, por diferentes mecanismos de ação, poderiam ser os responsáveis pela inibição da bactéria e da característica bactericida observada.

Esses componentes isolados podem apresentar características bioativas semelhantes às observadas no óleo essencial. Todavia, em determinados casos, são necessárias concentrações menores dos componentes em relação ao óleo, para observar a mesma atividade. Didry e colaboradores (1994) determinaram a CIM para o cinamaldeído (componente do óleo de canela) variando de 32 µg/mL a 64 µg/mL para algumas espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Ali e colaboradores (2005), analisando os componentes do óleo de canela, como o cinamaldeído e eugenol, determinaram a CIM destes como 2 µg/mL para a bactéria *Helicobacter pylori*. Esta mesma pesquisa revelou algumas linhagens de *H. pylori*, que foram testadas com os componentes do óleo, sendo resistentes ao antibiótico metronidazol (CIM > 8 µg/ml). Portanto, um componente do óleo essencial isolado foi mais efetivo em relação a um antibiótico comercial na inibição de uma bactéria Gram-negativa. Esses resultados evidenciam a redução da CIM quando determinados componentes dos óleos são purificados e testados isoladamente. A partir desses resultados com os óleos essenciais, os componentes destes poderão ser isolados, obtendo moléculas para futuros estudos e possíveis tratamentos.

Os principais componentes dos óleos no presente estudo foram relatados possuindo mecanismos de ação diferentes dos antibióticos comerciais, a exemplo do

florfenicol, que atua diretamente na síntese proteica (Schlünzen et al., 2001). Da Silva e colaboradores (2017) evidenciaram a resistência do isolado MV518 para o antibiótico florfenicol e cloranfenicol (CIM > 8 µg/mL). As análises com esse mesmo isolado evidenciaram a inibição dessa bactéria pelos óleos testados, sendo o de coentro como tendo inibição com a CIM de 0,3125 mg/mL. Este óleo apresentou uma CIM idêntica para quatro dos cinco isolados, sendo a exceção o MV1022. Pereira e colaboradores (2015), utilizando testes de virulência na lagarta *Galleria mellonella*, observaram que esse isolado é o mais virulento dentre os analisados. Com isso, o valor de CIM e CBM para o óleo de coentro nesse isolado foi duas vezes maior (0,625 mg/mL) quando comparadas com a dos outros isolados. O óleo de manjerona também apresentou um valor de CIM duas vezes maior (5 mg/mL) para esse isolado em comparação com os outros, observando a resistência maior dessa bactéria aos dois óleos analisados.

Ao avaliar a ação efetiva dos óleos em isolados do sorotipo 8 provenientes do Brasil e do Reino Unido e um do sorotipo 1, pode-se observar uma possível característica de atuação de amplo espectro dos óleos testados. A capacidade antibacteriana observada dos óleos eleva esses produtos a efetivos no combate contra bactérias de alta virulência, a exemplo de representantes do sorotipo 1 (Nicolet, 1992). Parte da alta virulência desse sorotipo é responsável pela liberação da toxina *ApxI* (Beck et al., 1994). Esta possui a característica de ser fortemente hemolítica e citotóxica para células fagocitárias, causando a alta mortalidade em animais infectados (Frey & Nicolet, 1988; Kamp et al., 1991). Portanto, os óleos testados possuem atividade antibacteriana em bactérias capazes de causar alta morbidade (sorotipo 8) e com elevado grau de virulência (sorotipo 1).

As análises da atividade dos óleos no biofilme em formação e o pré-formado ocorreram em bactérias fortes produtoras de biofilme. A bactéria S1 não é uma forte formadora de biofilme, portanto não foi avaliada nos testes. Por ser uma linhagem ATCC, a sua manutenção ocorreu durante certo tempo em laboratório. Kaplan e Mulks (2005) observaram que linhagens de *A. pleuropneumoniae* cultivadas mais de duas vezes em meio de cultura líquido diminuía significativamente a sua capacidade de formar biofilme. Esse poderia ser um dos motivos da linhagem S1 não ser uma forte formadora de biofilme quando comparadas com os outros isolados.

Os resultados evidenciam a capacidade de diversos óleos como o de canela e coentro em romperem o biofilme nas concentrações 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM. O óleo de coentro e seus componentes foram testados anteriormente com resultados

significativos no rompimento do biofilme de *Acinetobacter baumannii* (Alves et al., 2016). Bazargani e Rohloff (2016) observaram que o óleo essencial de coentro foi capaz de inibir a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* em 90 %. Os mesmos autores observaram a capacidade do óleo de hortelã pimenta em romper cerca de 67 % do biofilme de *S. aureus* e 81 % do biofilme de *Escherichia coli*.

Entretanto, para o óleo de tomilho, concentrações iguais a CIM e sub-CIM foram responsáveis pelo aumento no biofilme dos isolados MV780 e MIDG2331. Esse aumento na produção do biofilme foi relatado para diversos antibióticos em variadas espécies bacterianas (Kaplan, 2011). Hathroubi e colaboradores (2015) observaram que concentrações sub-CIM de penicilina G aumentavam a produção e a auto agregação do biofilme em linhagens de *A. pleuropneumoniae*. O aumento da produção do biofilme em doses sub-CIM dos antibióticos pode estar relacionado com o mecanismo de ação destes. Kohanski e colaboradores (2010) relataram que antibióticos com ação na parede celular afetam a maior produção de peptidoglicanos, gerando o aumento na matriz polissacarídica formadora do biofilme.

Em relação aos óleos essenciais, essa observação do aumento na produção de biofilme poderia estar relacionada com a desestabilização da parede celular das bactérias, devido aos componentes do óleo em concentrações sub-CIM, estimulando a produção de mais substância polimérica extracelular. Trabalhos anteriores, utilizando componentes isolados de óleos essenciais, observaram resultados semelhantes aos encontrados pelo presente estudo, na etapa da indução ou diminuição do biofilme. Sandasi e colaboradores (2008) observaram que os componentes isolados de óleos essenciais, utilizados separadamente induziam a formação do biofilme em linhagens de *Listeria monocytogenes*. Entretanto, para essa mesma bactéria, foi relatado que óleos essenciais como tomilho e hortelã pimenta foram capazes de inibir a formação do biofilme em cerca de 80 % (Sandasi et al., 2010).

Resultados semelhantes foram observados pelo presente projeto, em que o óleo de tomilho foi capaz de romper o biofilme pré-formado em algumas concentrações, entretando foi capaz de induzir a formação de biofilme nas concentrações de 1/8xCIM (para o isolado MV780), e 1xCIM (para o isolado MIDG2331). Esses resultados poderiam estar relacionados com a quantidade dos componentes do óleo presentes nos difentes tratamentos. Estes componentes em baixas concentrações estariam ativando respostas celulares contra o estresse causado por essas moléculas. Com isso, a produção de EPS poderia sofrer regulação, com o objetivo de aumentar o biofilme. Entretanto, em

grandes concentrações dos componentes, estes estariam destruindo as células e reduzindo à produção de EPS, conseqüentemente rompendo o biofilme. Adicionalmente, células presentes no biofilme, na presença de um agente antimicrobiano em pequena concentração, reduzem o metabolismo, a utilização de nutrientes e oxigênio. Sendo um dos motivos da maior resistência das células do biofilme aos agentes antibacterianos (Mah & O'Toole, 2001).

Os resultados dos experimentos tanto do biofilme pré-formado quanto o do biofilme em formação evidenciam a característica antibiofilme dos óleos essenciais analisados. Portanto, esses óleos tem potencial na utilização para o combate a infecções e para a utilização desses compostos como sanitizantes. As características antibacterianas e antibiofilme dos óleos essenciais são relatadas por um grande número de estudos, elevando a importância destes produtos naturais no combate à bactérias patogênicas.

## 6. CONCLUSÕES

No presente estudo, dezoito óleos essenciais foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana. Dentre estes, os óleos de canela, coentro, hortelã pimenta, hortelã do campo, tomilho, manjerona, eucalipto e louro apresentaram bioatividade frente às bactérias analisadas. Sendo os óleos de coentro e canela como os mais efetivos na inibição dos isolados de *A. pleuropneumoniae*. O resultado similar de CIM e CBM evidenciou a característica bactericida dos óleos essenciais analisados. Os resultados de cromatografia gasosa evidenciaram a presença de compostos antibacterianos já citados na literatura e que estão presentes nos óleos do presente estudo.

Os óleos de canela e coentro foram os mais efetivos no rompimento do biofilme pré-formado dos quatro isolados. Determinadas concentrações do óleo de tomilho foram capazes de induzir a formação do biofilme de dois isolados.

Para os experimentos de biofilme em formação, os óleos essenciais de canela e coentro novamente foram os mais efetivos na inibição da formação do biofilme. Entretanto, na menor concentração (1/8xCIM), o óleo de coentro induziu a formação de biofilme neste mesmo isolado.

Os oitos óleos essenciais avaliados se apresentam promissores para uso no combate à infecções causadas por *A. pleuropneumoniae*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1739 - 1745, 1998.

Aggarwal, K. K.; Khanuja, S. P. S.; Ahmad, A.; Santha Kumar, T. R.; Gupta, V. K.; Kumar, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17(1), p. 59-63, 2002.

Ahmed, S.; Hasan, M. M.; Ahmed, S.W.; Mahmood, Z. A.; Azhar, I.; Habtemariam, S. Anti-emetic effects of bioactive natural products. **Phytopharmacology**, v. 4, p. 390 - 43, 2013.

Ali, S. M.; Khan, A. A.; Ahmed, I.; Musaddiq, M.; Ahmed, K. S.; Polasa, H.; Ahmed, N. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, p. 20, 2005.

Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum species*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49(9), p. 4168-4170, 2001.

Alves, S.; Duarte, A.; Sousa, S.; Domingues, F. C. Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. **Biofouling**, v. 32(2), p. 155-165, 2016.

Archambault, M.; Harel, J.; Goure, J.; Tremblay, Y. D.; Jacques, M. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, p. 198-206, 2012.

Archibald, L. K. & Gaynes, R. P. Hospital acquired infections in the United States: the importance of inter hospital comparisons. **Infectious disease clinics of North America**, v. 11, p. 245 - 255, 1997.

Ashbolt, N. J.; Amezcua, A.; Backhaus, T.; Borriello, P.; Brandt, K. K.; Collignon, P. Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, p. 993 - 1001, 2013.

Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína (ABIPECS), 2016. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/> acesso em 15/06/2017.

Azad, A. K.; Coote, J. G.; Parton, R. Distinct plasmid profiles of *Pasteurella haemolytica* serotypes and the characterization and amplification in *Escherichia coli* of ampicillin-resistance plasmids encoding ROB1- $\beta$ -lactamase. **Microbiology**, v. 138, p. 1185-1196, 1992.

- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food Chem Toxicology**, v. 46, p. 446 - 75, 2008.
- Bakke, R.; Trulear, M. G.; Robinson, J. A.; Characklis, W. G. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Steady state. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1418 - 1424, 1984.
- Barcellos, D. E. S. N.; Borowski, S. M.; Gheller, M. S.; Mores, T. J. Relationship between environment, management and respiratory disease in pigs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 87 - 93, 2008.
- Bazargani, M. M. & Rohloff, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, p. 156-164, 2016.
- Bbosa, G. S. & Mwebaza, N. Global irrational antibiotics/antibacterial drugs use: a current and future health and environmental consequences. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex, Badajoz**, 2013.
- Beck, M.; Van Den Bosch, J. F.; Jongenelen, I. M.; Loeffen, P. L.; Nielsen, R.; Nicolet, J.; Frey, J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32(11), p. 2749-2754, 1994.
- Benelli, G.; Flamini, G.; Fiore, G.; Cioni, P.; Conti, B. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L.(Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112 (3), 2013.
- Bertuzzi, G.; Tirillini, B.; Angelini, P.; Venanzoni, R. Antioxidative action of *Citrus limonum* essential oil on skin, 2013.
- Bhavanani, S. M. & Ballow, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 528-534, 1992.
- Bi, S.F.; Zhu, G.Q.; Wu, J.; Li, Z.K.; Lv, Y.Z.; Fang, L. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil from *Nandina domestica* fruits. **Natural Product Research**, v. 30, p. 362 - 365, 2016.
- Biberstein, E. L. *Haemophilus* spp. y agentes semejantes a *Haemophilus*. Editores: E. L. Biberstein, e Y. C. Zee. Editorial Acribia, Zaragoza. **Tratado de Microbiologia Veterinaria**, p. 207-213, 1990.
- Blackall, P.J.; Klaasen, H.B.L.M.; Van den Bosch, H.; Kuhnert, P.; Frey, J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. **Veterinary microbiology**, v. 84, p. 47 - 52, 2002.
- Bolzani, V.S.; Valli, M.; Pivatto, M.; Viegas, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 84, p. 1837 - 1846, 2012.

Bossé, J. T.; Nash, J. H.; Simon Kroll, J.; Langford, P. R. Harnessing natural transformation in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a simple method for allelic replacements. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 277-281, 2004.

Bossé, J. T.; Sinha, S.; Li, M. S.; O'Dwyer, C. A.; Nash, J. H.; Rycroft, A. N.; Kroll, J. S.; Langford, P. R. Regulation of pga operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by sigmaE and H-NS. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 2414 - 23, 2010.

Bossé, J.T.; Janson, H.; Sheehan, B.J.; Beddek, A.J.; Rycroft A.N.; Kroll, S.; Langford, P.R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 225 - 235, 2002.

Bossé, J.T.; Li, Y.; Atherton, T.G.; Walker, S.; Williamson, S.M.; Rogers, J.; Chaudhuri, R.R.; Weinert, L.A.; Holden, M.T.G.; Maskell, D.J.; Tucker, A.W.; Wren, B.W.; Rycroft, A.N.; Langford, P.R. Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary microbiology**, v. 178, p. 279 - 282, 2015.

Bouwmeester, H. J.; Davies, J. A. R.; Toxopeus, H. Enantiomeric composition of carvone, limonene, and carveols in seeds of dill and annual and biennial caraway varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 3057 - 3064, 1995.

Bowles, E. J. **Chemistry of Aromatherapeutic Oils**. Allen & Unwin, ISBN 174114051X, 2003.

Bruneton, J. *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*. **Technique et Documentation Lavoisier**, 1987.

Burch, D. G. S. Antimicrobial Drug Use in Swine. In: Gigue` re, S., Prescott, J.F., Baggot, J. D.; Walker, R. D.; Dowling, P. M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, p. 553 - 568, 2013.

Burfield, T. & Reekie, S. L. Mosquitoes, malaria and essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 30 - 41, 2005.

Busatta, C.; Vidal, R. S.; Popiolski, A. S.; Mossi, A. J.; Dariva, C.; Rodrigues, M. R. A.; Cansian, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

Busatta, C.; Vidal, R. S.; Popiolski, A. S.; Mossi, A. J.; Dariva, C.; Rodrigues, M. R. A.; Cansian, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food microbiology**, v. 25(1), p. 207-211, 2008.

Caputo, L.; Nazzaro, F.; Souza, L. F.; Aliberti, L.; De Martino, L.; Fratianni, F.; De Feo, V. *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. **Molecules**, v. 22; p. 930, 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Antibiotic Resistance Threats in the United States**, Atlanta, 2013.

Chang, Y. F.; Renshaw, H. W.; Young, R. Pneumonic pasteurellosis: examination of typeable and untypeable *Pasteurella haemolytica* strains for leucotoxin production, plasmid content, and antimicrobial susceptibility. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 378-384, 1987.

Cherrat, L.; Espina, L.; Bakkali, M.; García-Gonzalo, D.; Pagán, R.; Laglaoui, A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1197-1204, 2014.

Chien, M. S.; Chan, Y. Y.; Chen, Z. W.; Wu, C. M.; Liao, J. W.; Chen, T. H.; Lee, W. C.; Yeh, K. S.; Hsuan, S. L. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived *ApxI* induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 327-333, 2009.

Chiers, K.; De Waele, T.; Pasmans, F.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**, v. 41, p. 1 - 16, 2010.

Christensen, G. & Mousing, Journal Respiratory System. In *Diseases of Swine*, 7th Edition, eds A.D. Leman, B.E. STRAW, W.L. MENGELING, S. D'ALLAIRE; D.J. TAYLOR, pp. 128–162. **Ames, Iowa: Iowa State University Press**, 1992.

Christensen, H.; Kuhnert, P.; Nørskov-Lauritsen, N.; Planet, P. J.; Bisgaard, M. The Family Pasteurellaceae. In: **The Prokaryotes** (p. 535-564). Springer Berlin Heidelberg, 2014.

Chutia, M.; Bhuyan, P. D.; Pathak, M. G.; Sarma, T. C.; Boruah, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT-Food Science and Technology**, v 42(3), p. 777-780, 2009.

Ciobanu, A.; Mallard, I.; Landy, D.; Brabie, G.; Nistor, D.; Fourmentin, S. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. **Food chemistry**, v. 138, p. 291-297, 2013.

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition (**M07-A10**), 2015.

Coelho, A. C.; Vieira-Brito, F. J.; Vieira-Brito, M. G.; Rodrigues, J. Pleuropneumonia suína causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* - diagnóstico e estratégias de controlo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p. 193 - 198, 2004.

- Cosentino, S.; Tuberoso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M. L.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29(2), p. 130-135, 1999.
- Cox, S. D.; Mann, C. M.; Markham, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91(3), p. 492-497, 2001.
- Craig, L.; Pique, M. E.; Tainer, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 363-378, 2004.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. **American Society of Plant Physiologists**, 2000.
- Crujisen, T.; van Leengoed, L. A.; Ham-Hoffies, M.; Verheijden, J.H. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 2341 - 2343, 1995.
- Da Silva, G. C.; Rossi, C. C.; Santana, M. F.; Langford, P. R.; Bossé, J. T.; Bazzolli, D. M. S. p518, a small *floR* plasmid from a South American isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 204, p. 129-132, 2017.
- Da Silveira, S. M.; Luciano, F. B.; Fronza, N.; Cunha, A.; Scheuermann, G. N.; Vieira, C. R. W. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p. 86-93, 2014.
- Dadalioglu, I. & Evrendilek, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(26), p. 8255-8260, 2004.
- Dadalioglu, I., & Evrendilek, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(26), p. 8255-8260, 2004.
- Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48(6), p. 2576-2581, 2000.
- Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 2, p. 114 - 122, 2003.
- Del Terra, L.; Lonzarich, V.; Asquini, E.; Navarini, L.; Graziosi, G.; Liverani, F. S.; Pallavicini, A. Functional characterization of three *Coffea arabica* L. monoterpene synthases: Insights into the enzymatic machinery of coffee aroma. **Phytochemistry**, v. 89, p. 6-14, 2013.

- Delaquis, P. J.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74(1), p. 101-109, 2002.
- Delaquis, P. J.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74(1), p. 101-109, 2002.
- Di Pasqua, R.; Mauriello, G.; Mamone, G.; Ercolini, D. Expression of DnaK, HtpG, GroEL and Tf chaperones and the corresponding encoding genes during growth of *Salmonella* Thompson in presence of thymol alone or in combination with salt and cold stress. **Food Research International**, v. 52, p. 153 - 159, 2013.
- Didry, N.; Dubreuil, L.; Pinkas, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharma Acta Helvetiae**, v. 69, p. 25-28, 1994.
- Djabou, N.; Lorenzi, V.; Guinoiseau, E.; Andreani, S.; Giuliani, M. C.; Desjobert, J. M.; Muselli, A. Phytochemical composition of *Corsican Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. **Food Control**, v. 30(1), p. 354-363, 2013.
- Domadia, P.; Swarup, S.; Bhunia, A.; Sivaraman, J.; Dasgupta, D. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 831 - 840, 2007.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167 - 193, 2002.
- Dorman, H.J.D., & Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308 - 316, 2000.
- Dubreuil, J. D.; Jacques, M.; Mittal, K. R.; Gottschalk, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 1, p. 73-93, 2000.
- Elshikh, M.; Ahmed, S.; Funston, S.; Dunlop, P.; McGaw, M.; Marchant, R.; Banat, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnol Letters.**, v. 38(6), p. 1015 - 1019, 2016
- Erkan, N.; Ayranci, G.; Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110(1), p. 76-82, 2008.
- European Medicines Agency (EMA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **The Bacterial Challenge: Time to React a Call to Narrow the Gap Between Multidrug-Resistant Bacteria in the EU and Development of New Antibacterial Agents**, Stockholm, 2009.

- Ferreira, P.; Cardoso, T.; Ferreira, F.; Fernandes-Ferreira, M.; Piper, P.; Sousa, M. J. *Mentha piperita* essential oil exerts pro-oxidant effects both at the cytosol and at the mitochondria leading to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Planta Medica**, v. 80, p. P1L126, 2014.
- Ferri, E.; Barceló, J.; Gómez, S.; Sánchez-Viscaíno, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Curso Digital de Enfermedades Infecciosas Porcinas**, 2002.
- Fisher, K. & Phillips, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19(3), p. 156-164, 2008.
- Fournié, G.; Kearsley-Fleet, L.; Otte, J.; Pfeiffer, D. U. Spatiotemporal trends in the discovery of new swine infectious agentes. **Veterinary Research**, v. 46, p. 114 - , 2015.
- Frey, J. & Nicolet, J. Purification and partial characterization of a hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* type strain 4074. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55(1), p. 41-45, 1988.
- Frey, J. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic Pasteurellaceae. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 51 - 58, 2011.
- Frey, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 257 - 261, 1995.
- Friedman, M.; Henika, P. R.; Mandrell, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65(10), p. 1545-1560, 2002.
- Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M. B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S. A.; Rasooli, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102(3), p. 898-904, 2007.
- Garau, M. C.; Simal, S.; Rossello, C.; Femenia, A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. **Food Chemistry**, v. 104(3), p. 1014-1024, 2007.
- Gbenou, J. D.; Ahounou, J. F.; Akakpo, H. B.; Laleye, A.; Yayi, E.; Gbaguidi, F.; Kotchoni, S. O. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, p. 1-8, 2013.
- Gill, A. O. & Holley, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70(10), p. 5750-5755, 2004.
- Gómez-Rincón, C.; Langa, E.; Murillo, P.; Valero, M. S.; Berzosa, C.; López, V. Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil against L3 larvae of *Anisakis simplex*. **BioMed Research International**, 2014.

Gottschalk M. Actinobacillosis. In: Diseases of Swine. 10th edn. Eds. J. J. Zimmerman, A. K. Locke, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson Ames, Iowa, USA: **Wiley-Blackwell**, p. 653 - 659, 2012.

Gottschalk, M. & Lacouture, S. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3, 6, 8 and 15 isolated from diseased pigs in North America. **Veterinary Record**, v. 174, p. 452 - 453, 2014.

Gram, T.; Ahrens, P.; Andreasen, M.; Nielsen, J. P. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes-evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 43 - 57, 2000.

Grand view research. Essential Oil Market Analysis By Product (GVR) (Orange, Corn Mint, Eucalyptus, Citronella, Peppermint, Lemon, Clove Leaf, Lime, Spearmint and Others), By Application (Medical, Food & Beverage, Spa & Relaxation, Cleaning & Home and Others) And Segment Forecasts To 2024. **Global Industry Research Report**, 2016.

Grichi, A.; Nasr, Z.; Khouja, M. L. Phytotoxic Effects of Essential Oil from *Eucalyptus lehmanii* against Weeds and its Possible Use as a Bioherbicide. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 5, p. 17-23, 2016.

Guo-Sheng, X.; San-Jie, C.; Li-li, D.; Xin-tian, W.; Xiao-Ping, M. A.; Hua-mei, C. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by multiplex PCR based on the genes *apxIVA* and *omlA*. **Agricultural Sciences in China**, v. 5, p. 146 - 154, 2006.

Hafedh, H.; Najla, T.; Emira, N.; Mejdi, S.; Hanen, F.; Riadh, K.; Amina, B. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2227 - 2238, 2009.

Hall-Stoodley, L.; Hu, F. Z.; Gieseke, A.; Nistico, L.; Nguyen, D.; Hayes, J. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. **Jama**, v. 296, p. 202 - 211, 2006.

Hanson, J. R. Natural products: the secondary metabolites. **Royal Society of Chemistry**, v. 17, 2003.

Hathroubi, S.; Fontaine-Gosselin, S. È.; Tremblay, Y. D. N.; Labrie, J.; Jacques, M. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 179, p. 277 - 286, 2015.

Helander, I. M.; Alakomi, H. L.; Latva, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G. M.; von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590 - 3595, 1998.

- Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A. K.; Doble, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine** 15: 639 - 652, 2008.
- Hoiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, p. 322 - 332, 2010.
- Hong, E. J.; Na, K. J.; Choi, I. G.; Choi, K. C.; Jeung, E. B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 863 - 866, 2004.
- Hussain, A. I.; Anwar, F.; Sherazi, S. T. H.; Przybylski, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108(3), p. 986-995, 2008.
- Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.
- Ichimiya, T.; Takeoka, K.; Hiramatsu, K.; Hirai, K.; Yamasaki, T.; Nasu, M. The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Chemotherapy**, v. 42(3), p. 186-191, 1996.
- İşcan, G.; Kirimer, N.; Kürkcüoğlu, M.; Başer, H. C.; DEMİrci, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(14), p. 3943-3946, 2002.
- Jensen, P. Ø.; Givskov, M.; Bjarnsholt, T.; Moser, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Pathogens and Disease**, v. 59, p. 292-305, 2010.
- Joshi, B.; Lekhak, S.; Sharma, A. Antibacterial property of different medicinal plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 5(1), p. 143-150, 2009.
- Kamp, E. M.; Popma, J. K.; Anakotta, J. U. L. I. U. S.; Smits, M. A. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v. 59(9), p. 3079-3085, 1991.
- Kaplan, J. B. & Mulks, M. H. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 89 - 94, 2005.
- Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34(9), p. 737-751, 2011.
- Klein, R. C.; Fabres-Klein, M. H.; de Oliveira, L. L.; Feio, R. N.; Malouin, F.; Ribon, A. D. O. B. A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **PloS one**, v. 10(3), e0120514, 2015.
- Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119 - 128, 1988.

Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8(6), p. 423, 2010.

Krishna A.; Tiwari R.; Kumar S. Aromatherapy-an alternative health care through essential oils. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22, p. 798 - 804, 2000.

Kuete, V.; Alibert-Franco, S.; Eyong, K. O.; Ngameni, B.; Folefoc, G. N.; Nguemeving, J. R.; Bolla, J. M. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 156 - 161, 2011.

Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85(4), p. 633-640, 2004.

Kwon, J. A.; Yu, C. B.; Park, H. D. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37(1), p. 61-65, 2003.

Labrie, J.; Pelletier-Jacques, G.; Deslandes, V.; Ramjeet, M.; Auger, E.; Nash, J. H.; Jacques, M. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Research**, v. 41, p. 3, 2010.

Laekeman, G. M.; VanHoof, L.; Haemers, A.; Berghe, D. A. V.; Herman, A. G.; Vlietinck, A. J. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 90 - 96, 1990.

Li, L.; Zhou, R.; Li, T.; Kang, M.; Wan, Y.; Xu, Z.; Chen, H. Enhanced biofilm formation and reduced virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* luxS mutant. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 192-200, 2008.

Li, Y.; Bossé, J. T.; Williamson, S. M.; Maskell, D. J.; Tucker, A. W.; Wren, B. W.; Langford, P. R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 8 predominates in England and Wales. **The Veterinary Record**, v. 179, p. 276, 2016.

Lo Cantore, P.; Iacobellis, N. S.; De Marco, A.; Capasso, F.; Senatore, F. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. vulgare (Miller) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(26), p. 7862-7866, 2004.

Loboda, A.; Cisowaski, J.; Zarebski, A.; Jazwa, A.; Rivera Nunez, D.; Kyprotakis, Z.; Heinrich, M.; Dulak, J. Effect of plant extracts on angiogenic activities of endothelial cells and keratinomycetes. **Journal of Physiology and Pharmacology Supplement**, v. 1, p. 125 - 137, 2005.

Loera-Muro, V.; Jacques, M.; Tremblay, Y.; Avelar-González, F.; Loera-Muro, A.; Ramírez-López, E.; Medina-Figueroa, A.; González-Reynaga, H.; Guerrero-Barrera, A. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Drinking Water from Pig Farms. **Microbiology**, v. 159, p. 536 - 544, 2013.

- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 34 - 39, 2001.
- Mah, T. F. Establishing the minimal bactericidal concentration of an antimicrobial agent for planktonic cells (MBC-P) and biofilm cells (MBC-B). **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. 83, e50854-e50854, 2014.
- Maskey R. P.; Grun-Wollny I.; Laatsch H. Isolation, structure elucidation and biological activity of 8-O-methylaverufin and 1, 8-Odimethylaverantin as new antifungal agents from *Penicillium chrysogenum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 56(5), p. 459-463, 2003.
- Matasyoh, J. C.; Maiyo, Z. C.; Ngure, R. M.; Chepkorir, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113(2), p. 526-529, 2009.
- Matasyoh, J. C.; Maiyo, Z. C.; Ngure, R. M.; Chepkorir, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113(2), p. 526-529, 2009.
- Matthews, P. R. J., & I. H. Pattison. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 71, p. 44 - 52, 1961.
- Mattos, J. K. A. Plantas medicinais: aspectos agronômicos. **Brasília: Edição do autor**. p. 51, 1996.
- Mayaud, L.; Carricajo, A.; Zhiri, A.; Aubert, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47(3), p. 167-173, 2008.
- Meyer-Warnod, B. Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. **Perfumer & Flavorist**, v. 9, p. 93-104, 1984.
- Mimica-Dukic, N.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Simin, N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2485 - 2489, 2004.
- Moreira, M. R.; Ponce, A. G.; Del Valle, C. E.; Roura, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38(5), p. 565-570, 2005.
- Mota, R. A.; da Silva, K. P. C.; de Freitas, M. F. L.; Porto, W. J. N.; da Silva, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42(6), p. 465-470, 2005.
- Moufida, S., & Marzouk. B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. **Phytochemistry**, 62 (8), pp. 1283-1289, 2003.

Nedorostova, L.; Kloucek, P.; Kokoska, L.; Stolcova, M.; Pulkrabek, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against food borne bacteria. **Food Control**, v. 20, p. 157–160, 2009.

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.

Nicolet, J. Diseases of swines (Leman, A.D. et al., eds), **Iowa State University Press**, p. 401-408, 1992.

Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382 - 388, 1994.

Nikolić, M.; Glamočlija, J.; Ferreira, I. C.; Calhelha, R. C.; Fernandes, Â.; Marković, T.; Soković, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

Olsen, I.; Dewhirst, F. E.; Paster, B. J. Family Pasteurellaceae. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 2, part B, ed. Garrity GM, pp. 851–1083. Springer, New York, NY, 2005.

O'Neill, C.; Jones, S. C.; Bossé, J. T.; Watson, C. M.; Williamson, S. M.; Rycroft, A. N.; Kroll, J. S.; Hartley, H. M.; Langford, P. R. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars in England and Wales. **The Veterinary Record**, v. 167, p. 661-662, 2010.

Ooi, L. S.; Li, Y.; Kam, S. L.; Wang, H.; Wong, E. Y.; Ooi, V. E. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 34(03), p. 511-522, 2006.

O'Toole, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 47, p. e2437 10.3791/2437, 2011.

Oussalah, M.; Caillet, S.; Lacroix, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69(5), p. 1046-1055, 2006.

Oyedemi, S. O.; Okoh, A. I.; Mabinya, L. V.; Pirochenva, G.; Afolayan, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and *g*-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8(7), 2009.

Palumbi, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, v. 293, p. 1786 - 1790, 2001.

Pandey, A. K.; Kumar, P.; Singh, P.; Tripathi, N. N.; Bajpai, V. K. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

Paytubi, S.; de La Cruz, M.; Tormo, J. R.; Martín, J.; Gonzalez, I.; Gonzalez-Menendez, V.; Balsalobre, C. A. High-Throughput Screening Platform of Microbial Natural Products for the Discovery of Molecules with Antibiofilm Properties against *Salmonella*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

Pereira, M. F.; Rossi, C. C.; de Queiroz, M. V.; Martins, G. F.; Isaac, C.; Bossé, J. T.; Langford, P. R. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161(2), p. 387-400, 2015.

Perry, M. B.; Altman, E.; Brisson, J. R.; Beynon, L. M.; Richards, J. C. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease**, v. 4, p. 299-308, 1990.

Pichersky, E.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

Pohl, S.; Bertschinger, H. U.; Frederiksen, W.; Mannheim, W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, p. 510-514, 1983.

Quijano-Célis, C.; Piedrahita, D.; Pino, J. A. Essential oil of *Coffea arabica* L. var. Castillo leaves from Colombia. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18(2), p. 486-488, 2015.

Raina, V. K.; Lal, R. K.; Tripathi, S.; Khan, M.; Syamasundar, K. V.; Srivastava, S. K. Essential oil composition of genetically diverse stocks of *Murraya koenigii* from India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17(2), p. 144-146, 2002.

Rayamajhi, N.; Shin, S. J.; Kang, S. G.; Lee, D. Y.; Ahn, J. M.; Yoo, S. Y. Development and use of a polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 359 - 362, 2005.

Razzaghi-Abyaneh, M.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Rezaee, M. B.; Jaimand, K.; Alinezhad, S.; Saberi, R.; Yoshinari, T. Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. **Food Control**, v. 20(11), p. 1018-1024, 2009.

Reddy, M. B.; Angers, P.; Gosselin, A.; Arul, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v. 47(8), p. 1515-1520, 1998.

Retta, D.; Dellacassa, E.; Villamil, J.; Suárez, S.A.; Bandoni, A.L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 27-38, 2012.

Rhayour, K.; Bouchikhi, T.; Tantaoui-Elaraki, A.; Sendide, K.; Remmal, A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15(4), p. 286-292, 2003.

Rogers, R. J.; Eaves, L. E.; Blackall, P. J.; Truman, K. F. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*, **Australian Veterinary Journal**, v. 67, p. 9 - 12, 1990.

Rohloff, J. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47(9), p. 3782-3786, 1999

Rosendal, S.; Boyd, D. A.; Gilbride, K. A. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 68 - 74, 1985.

Rossi, C. C.; Vicente, A. M.; Guimarães, W. V.; Araújo, E. F.; Queiroz, M. V.; Bazzolli, D. M. S. Face to face with *Actinobacillus pleuropneumoniae*: landscape of the distribution of clinical isolates in southeastern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 2916 - 2924, 2013.

Rota, C.; Carraminana, J. J.; Burillo, J.; Herrera, A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1252 - 1256, 2004.

Rota, M. C.; Herrera, A.; Martínez, R. M., Sotomayor, J. A.; Jordán, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19(7), p. 681- 687, 2008.

Saad, E. Z.; Hussien, R.; Saher, F.; Ahmed, Z. Acaricidal activities of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, p. 957-962, 2006.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91(4), p. 621-632, 2005.

Saïdana, D.; Mahjoub, M. A.; Boussaada, O.; Chriaa, J.; Che'raif, I.; Daami, M.; Mighri, Z.; Helal, A. N. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). **Microbiological Research**, v. 163(4), p. 445-455, 2008.

Samarasekera, R.; Kalhari, K. S.; Weerasinghe, I. S. Mosquitocidal activity of leaf and bark essential oils of Ceylon *Cinnamomum zeylanicum*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17(3), p. 301-303, 2005.

- Sandasi, M.; Leonard, C. M.; Viljoen, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19(11), 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(1), p. 30-35, 2010.
- Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42(4), p. 321-324, 2007.
- Sarkozi, R.; Makrai, L.; Fodor, L. Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 16. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, p. 444 - 450, 2015.
- Sartorelli, P.; Marquioreto, A. D.; Amaral-Baroli, A.; Lima, M. E.; Moreno, P. R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of Eucalyptus. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 231 - 233, 2007.
- Sauer, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v. 4(6), p. 219, 2003.
- Schlünzen, F.; Zarivach, R.; Harms, J.; Bashan, A.; Tocilj, A.; Albrecht, R.; Franceschi, F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v. 413(6858), p. 814-821, 2001.
- Sebunya T. N.; Saunders J. R.; Osborne A. D. Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p. 54 - 56, 1983.
- Shahverdi, A. R.; Monsef-Esfahani, H. R.; Tavasoli, F.; Zaheri, A.; Mirjani, R. Trans Cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* Bark Essential Oil Reduces the Clindamycin Resistance of *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of Food Science**, v. 72(1), 2007.
- Shan, B.; Cai, Y. Z.; Brooks, J. D.; Corke, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117(1), p. 112-119, 2007.
- Sharma, N., & Tripathi, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163(3), p. 337-344, 2008.
- Shaw, W. V. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 14(1), p. 1-46, 1983.
- Shi, X., & Zhu, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

- Sidibe, M.; Messier, S.; Lariviere, S.; Gottschalk, M.; Mittal, K. R. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 204 - 208, 1993.
- Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D. I.; Domingues, F. C. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida species* and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 19(1), p. 42-47, 2011.
- Silva, F.; Ferreira, S.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60(10), p. 1479-1486, 2011.
- Silva, J.; Abebe, W.; Sousa, S. M.; Duarte, V. G.; Machado, M. I. L.; Matos, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277 - 283, 2003.
- Simon, J. E.; Reiss, P.; Bubenheim, D.; Jojy, R. J. Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. **Journal of Essential Oil Research** 4: 71-75, 1992.
- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 1ª ed. **Compêndio De Produtos Veterinários**. Editora MedVet, São Paulo, Brasil, 2013.
- Singh, G.; Kapoor, I. P. S.; Singh, P.; de Heluani, C. S.; De Lampasona, M. P.; Catalan, C. A. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46(10), p. 3295-3302, 2008.
- Singh, G.; Kapoor, I. P.; Pandey, S. K.; Singh, U. K.; Singh, R. K. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 680 - 682, 2002.
- Singh, G.; Marimuthu, P.; Heluani, C. S. D.; Catalan, C. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (aril part). **Journal of Food Science**, v. 70(2), 2005.
- Singh, R., Ray, Das, P. A, Sharma, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1955 - 1958, 2010a.
- Singh, S. B., & Culberson, J. C. Chemical space and the difference between natural products and synthetics. In: **Natural Product Chemistry for Drug Discovery**. p. 28-43, 2009
- Souza, C. F.; Baldissera, M. D.; Santos, R. C.; Raffin, R. P.; Baldisserotto, B. Nanotechnology improves the therapeutic efficacy of *Melaleuca alternifolia* essential oil in experimentally infected *Rhamdia quelen* with *Pseudomonas aeruginosa*. **Aquaculture**, v. 473, p. 169-171, 2017.

- Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Bonaventura, G. D.; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115(8), p. 891-899, 2007.
- Stoodley, P.; Cargo, R.; Rupp, C. J.; Wilson, S.; Klapper, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 361-367, 2002.
- Straw, B. E.; Shin, S. J.; Yeager, A. E. Effect of pneumonia on growth rate and feed efficiency of minimal disease pigs exposed to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, p. 287 - 294, 1990.
- Strohl, W.S. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery**, v. 5, p. 39 - 41, 2000.
- Subarnas, A.; Apriyantono, A.; Mustarichie, R. Identification of compounds in the essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) that inhibit locomotor activity in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11(11), p. 4771-4781, 2010.
- Sun, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12(3), p. 259, 2007.
- Svoboda, K. P. & Greenaway, R. I. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, p. 196 - 202, 2003.
- Talmadge, J.; Chavez, J.; Jacobs, L.; Munger, C.; Chinnah, T.; Chow, J. T.; Yates, K. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1757-73, 2003.
- Tremblay, Y. D.; Levesque, C.; Segers, R. P.; Jacques, M. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 213, 2013.
- Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474 - 2478, 2005.
- Ultee, A.; Bennik, M. H. J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68(4), p. 1561-1568, 2002.
- Ultee, A.; Kets, E. P. W.; Smid, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65(10), p. 4606-4610, 1999.
- United States Department of Agriculture (USDA). **Livestock and Poultry: World Markets and Trade: Despite HPAI Outbreaks, Global Broiler Meat Production and Trade Forecast to Rise in 2017**, 2017.

- Unlu, M.; Ergene, E.; Unlu, G. V.; Zeytinoglu, H. S.; Vural, N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48(11), p. 3274-3280, 2010.
- Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 395 - 411, 1992.
- Vagi, E.; Simandi, B.; Suhajda, A.; Hethelyi, E. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**, v. 38(1), p. 51-57, 2005.
- Van Boeckel, T. P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Robinson, T. P.; Laxminarayan, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112(18), p. 5649-5654, 2015.
- Van de Braak, S. A. A. J., Leijten, G. C. J. J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. **CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries**, Rotterdam, p. 116, 1999.
- Vaz, C. S. L.; Silva, S. C. Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína. **Ciência Rural**, v. 34, p. 635 - 643, 2004.
- Vaz, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 147-150, 2009.
- Voirin, B.; Brun, N.; Bayet, C. Effects of day length on the monoterpene composition of leaves of *Mentha piperita*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 749-755, 1990.
- Walsh, S. E.; Maillard, J. Y.; Russell, A. D.; Catrenich, C. E.; Charbonneau, D. L.; Bartolo, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94(2), p. 240-247, 2003.
- Wang, L., Weller, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 300–312, 2006.
- Wang, W.; Li, N.; Luo, M.; Zu, Y.; Efferth, T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, v. 17(3), p. 2704-2713, 2012.
- Wang, W.; Wu, N.; Zu, Y. G.; Fu, Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108(3), p. 10, 2008.
- Wendakoon, C. N. & Sakaguchi, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v. 58(3), p. 280-283, 1995.

Wilson, C. L.; Solar, J. M.; El Ghaouth, A.; Wisniewski, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81(2), p. 204-210, 1997.

Wong, K. C. & Tie, D. Y. The essential oil of the leaves of *Murraya koenigii* Spreng. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5(4), p. 371-374, 1993.

World Health Organization (WHO): Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. **World Health Organization**, 2014.

Xu, K. D.; McFeters, G. A.; Stewart, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, v. 146, p. 547 - 549, 2000.

Xu, Z.; Chen, X.; Li, L.; Li, T.; Wang, S.; Chen, H.; Zhou, R. Comparative genomic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 5625-5636, 2010.

Xu, Z.; Zhou, Y.; Li, L. Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. **PloS ONE**, v. 3, e1450, 2008.

Yoo, A. N.; Cha, S. B.; Shin, M. K.; Won, H. K.; Kim, E. H.; Choi, H. W.; Yoo, H. S. Serotypes and antimicrobial resistance patterns of the recent Korean *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **The Veterinary Record**, v. 174, p. 223- 2014.

Zandi, K.; Teoh, B. T.; Sam, S. S.; Wong, P. F.; Mustafa, M. R.; Abubakar, S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 214, 2012.

Znini, M.; Bouklah, M.; Majidi, L.; Kharchouf, S.; Aouniti, A.; Bouyanzer, A.; Al-Deyab, S. S. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6(3), p. 691-704, 2011.