

**FÁBIO ASSAD FÉRES RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS, DE SUAS FORMULAÇÕES TÓPICAS E DE COMPOSTOS  
ORGÂNICOS SINTÉTICOS EM *Staphylococcus aureus* USA300**

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

Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli  
Mateus Ferreira Santana

**VIÇOSA- MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R696a  
2022

Rodrigues, Fábio Assad Féres, 1992-

Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais, de suas formulações tópicas e de compostos orgânicos sintéticos em *Staphylococcus aureus* USA300 / Fábio Assad Féres Rodrigues. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (116 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.114>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Antibióticos. 2. Drogas - Resistência em micro-organismos. 3. Bactérias - Efeitos dos antibióticos .  
I. Diaz, Marisa Alves Nogueira, 1960-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada.  
III. Título.

CDD 22. ed. 615.329

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

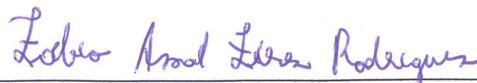
FÁBIO ASSAD FÉRES RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS, DE SUAS FORMULAÇÕES TÓPICAS E DE COMPOSTOS  
ORGÂNICOS SINTÉTICOS EM *Staphylococcus aureus* USA300**

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

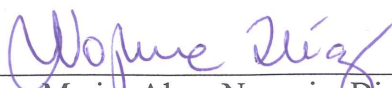
APROVADA: 31 de janeiro de 2022.

Assentimento:



---

Fábio Assad Féres Rodrigues  
Autor



---

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.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A 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 durante esses seis anos. 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, de novos experimentos e por ter ajudado a trilhar o caminho do meu sonho. Muito obrigado!

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

À professora Denise Bazzolli, pela coorientação, sugestões durante o projeto e autorização em utilizar a estrutura do LGMB.

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

Aos professores e funcionários da Bioquímica, por todo o ensinamento e acompanhamento durante o doutorado.

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

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

Ao professor Mateus Santana, pela participação na banca, pelo apoio, pela coorientação, colaboração e por ser um amigo durante toda a pós-graduação.

Ao professor Robson Teixeira, pela coorientação no projeto, pela gentileza em ceder os compostos, e por todo o apoio durante o doutorado.

Ao professor Leandro Licursi, pela coorientação no projeto, pela ajuda com as análises de citotoxicidade, e por todo o apoio durante o doutorado.

Ao doutor Luiz Lino pelos conselhos e sugestões no decorrer do doutorado.

Ao professor Gaspar Diaz, pela participação na banca e pelas sugestões na escrita da tese.

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, tendo sua dissertação aprovada no dia 27 de Julho de 2017.

Em Agosto de 2017 iniciou o doutorado em Bioquímica Aplicada, pela Universidade Federal de Viçosa, na área de Bioprospecção de produtos naturais, tendo sua tese aprovada no dia 31 de Janeiro de 2022.

## RESUMO

RODRIGUES, Fábio Assad Féres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022. **Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais, de suas formulações tópicas e de compostos orgânicos sintéticos em *Staphylococcus aureus* USA300.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Mateus Ferreira Santana.

A utilização de antibióticos de maneira indiscriminada está diretamente relacionada com a seleção de bactérias resistentes. Como alternativa no combate a infecções bacterianas, tem-se prospectado novas moléculas provenientes de produtos naturais, como aquelas presentes nos óleos essenciais. Estes são compostos do metabolismo secundário de plantas, com algumas funções antibacterianas confirmadas. Adicionalmente, desempenham funções na atração de polinizadores, alelopatia e proteção contra mudanças drásticas na temperatura. O presente estudo analisou o efeito antibacteriano de óleos essenciais em Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* USA300 (MRSA-USA300). Esta bactéria é responsável por diversos casos de infecções na pele, no pulmão e podendo causar sepse. Estudos anteriores relataram a multirresistência desta bactéria a diversas classes de antibióticos, elevando a importância na prospecção de novas moléculas para o combate deste microrganismo. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de dezenove óleos essenciais e de suas formulações tópicas em MRSA-USA300. Inicialmente, dezenove óleos essenciais foram analisados quanto a possível atividade antibacteriana e antibiofilme em MRSA-USA300. Quatro óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana na triagem inicial, sendo eles: canela, coentro, cravo e tangerina. Os resultados de cromatografia gasosa desses óleos revelou os principais componentes, sendo predominantes os terpenos e fenilpropanoides. As análises de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) foram realizadas com os quatro óleos essenciais ativos. Os valores de CIM e CBM foram idênticos para todos os óleos essenciais, com valores entre 10 mg/mL a 1,25 mg/mL. O óleo essencial de coentro (1,25 mg/mL) e o de canela (2,5 mg/mL) apresentaram os menores valores de CIM e CBM sendo considerados os mais efetivos. Adicionalmente, foram realizadas análises de citotoxicidade em eritrócitos humanos. O óleo essencial de tangerina foi o único que causou hemólise em todas as concentrações analisadas. Os demais óleos essenciais não causaram hemólise na concentração de 1xCIM e nas sub-CIM. Nas análises do biofilme pré-formado, todos os óleos analisados foram capazes de romper o biofilme nas concentrações CIM e supra-

CIM, sendo o óleo de coentro o único capaz de romper em uma concentração sub-CIM (1/2x). Para o biofilme em formação, o óleo essencial de canela apresentou uma maior inibição na concentração 1/2xCIM. Os óleos de canela e coentro foram selecionados para serem incorporados em formulações tópicas na consistência de gel. A CIM e a CBM das formulações contendo os óleos foram idênticas comparadas quando se utilizou os óleos isolados. Ademais, os experimentos de hemólise, biofilme pré-formado e biofilme em formação apresentaram resultados semelhantes quando as formulações tópicas foram analisadas, evidenciando a capacidade das formulações no rompimento e inibição do biofilme e a não toxicidade em eritrócitos humanos. As formulações contendo óleos essenciais de canela e coentro apresentaram características bactericidas a partir da análise da curva de crescimento, sendo a que continha o óleo essencial de coentro apresentando uma maior taxa de morte. Nas análises *in vivo* com *Galleria mellonella*, as formulações foram consideradas seguras por não acarretar a morte dos indivíduos na concentração CIM. Esses resultados evidenciam a possibilidade do uso dos óleos essenciais analisados e suas formulações tópicas como agentes no tratamento a infecções causadas por bactérias resistentes, a exemplo do MRSA-USA300.

Palavras-chave: Antibióticos. Óleos essenciais. Formulações tópicas. Multirresistência.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Fábio Assad Féres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2022. **Evaluation of the antibacterial and antibiofilm activity of essential oils, their topical formulations and the synthetic organic compounds on *Staphylococcus aureus* USA300.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Mateus Ferreira Santana.

The indiscriminate use of antibiotics is directly related to the selection of resistant bacteria. As an alternative to fight bacterial infections, new molecules from natural products, such as those present in essential oils, have been prospected. These are compounds of the secondary metabolism of plants, with some confirmed antibacterial functions. Additionally, they play a role in attracting pollinators, allelopathy and protecting against drastic changes in temperature. The present study analyzed the antibacterial effect of essential oils on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 (MRSA-USA300). This bacterium is responsible for several cases of skin and lung infections and can cause sepsis. Previous studies have reported the multi-resistance of this bacterium to several classes of antibiotics, raising the importance of prospecting for new molecules to combat this microorganism. In this context, the objective of this work was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of nineteen essential oils and their topical formulations in MRSA-USA300. Initially, nineteen essential oils were analyzed for possible antibacterial and antibiofilm activity on MRSA-USA300. Four essential oils showed antibacterial activity in the initial screening, namely: cinnamon, coriander, clove and tangerine. The gas chromatography results of these oils revealed the main components, with terpenes and phenylpropanoids being predominant. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) analyzes were performed with the four active essential oils. The MIC and MBC values were identical for all essential oils, ranging from 10 mg/mL to 1.25 mg/mL. Coriander essential oil (1.25 mg/mL) and cinnamon (2.5 mg/mL) had the lowest MIC and MBC values, being considered the most effective. Additionally, cytotoxicity analyzes were performed on human erythrocytes. Tangerine essential oil was the only one that caused hemolysis at all analyzed concentrations. The other essential oils did not cause hemolysis in the concentration of 1xMIC and in the sub-MIC. In the analysis of the preformed biofilm, all analyzed oils were able to break the biofilm at MIC and supra-MIC concentrations, with coriander oil being the only one capable of breaking at a sub-MIC concentration (1/2x). For the forming biofilm, cinnamon essential oil showed a greater

inhibition at the 1/2xMIC concentration. Cinnamon and coriander oils were selected to be incorporated into topical formulations in gel consistency. The MIC and MBC of the formulations containing the oils were identical compared when using the isolated oils. Furthermore, the hemolysis, preformed biofilm and biofilm in formation experiments showed similar results when the topical formulations were analyzed, evidencing the formulations ability to disrupt and inhibit the biofilm and the non-toxicity in human erythrocytes. The formulations containing essential oils of cinnamon and coriander showed bactericidal characteristics from the analysis of the growth curve, and the one that contained the essential oil of coriander had a higher death rate. In in vivo analyzes with *Galleria mellonella*, the formulations were considered safe because they did not cause the death of individuals at the MIC concentration. These results show the possibility of using the essential oils analyzed and their topical formulations as agents in the treatment of infections caused by resistant bacteria, such as MRSA-USA300.

Keywords: Antibiotics. Essential oils. Topical formulations. Multidrug resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1 - Análise da viabilidade celular utilizando óleos essenciais em microplaca. Controle positivo (ampicilina). – : Controle negativo. M: Controle de meio contendo meio MH.....35
- Figura 2 - 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.....36
- Figura 3 - Placa de biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300, utilizando cristal violeta.....37
- Figura 4 - Placa de biofilme pré-formado, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+ - Controle positivo. C-: Controle negativo.....38
- Figura 5 - Placa de biofilme em formação, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+: Controle positivo. C-: Controle negativo.....39
- Figura 6 – Estruturas químicas dos antibióticos ampicilina e tetraciclina.....40
- Figura 7 – Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de canela. **A** – Principais componentes. **B** – Estrutura química dos principais componentes.....48
- Figura 8 - Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de coentro. **A** – Principais componentes. **B** – Estrutura química dos principais componentes.....49
- Figura 9 - Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de cravo. **A** – Principais componentes. **B** – Estrutura química dos principais componentes.....50
- Figura 10 - Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de tangerina. **A** – Principais componentes. **B** – Estrutura química dos principais componentes.....51

- Figura 11 - Resultados da análise de hemólise (%). **A** – Óleo essencial de canela. **B** – Óleo essencial de coentro. **C** – Óleo essencial de cravo. **D** – Óleo essencial de tangerina. Triton – Controle positivo (100 % hemólise). PBS + TW – Controle negativo, contendo solução de PBS com Tween 80. \* - Significativo em relação ao controle negativo (considerado como 0 % de hemólise; Dunnett  $p < 0,05$ ). Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey a 5 %.....53
- Figura 12 - Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).....54
- Figura 13 - Avaliação da atividade dos óleos essenciais na inibição do biofilme em formação do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).....55
- Figura 14 - Ensaio de CIM contendo ampicilina (A) e tetraciclina (T). Ambos apresentaram a CIM de 64  $\mu\text{g/mL}$ . +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio.....57
- Figura 15 - Ensaio de sinergismo contendo o óleo de canela (diluição na vertical) e o antibiótico ampicilina (diluição na horizontal). A marca circular apresenta as diluições em que houve o sinergismo. 1 – Primeira replicata técnica. 2 – Segunda replicata técnica. +: Controle positivo. -: Controle negativo.....58
- Figura 16 - Ensaio de CIM das formulações tópicas para o isolado MRSA-USA300. Óleo na placa A: Canela. Óleo na placa B: Coentro. Primeira coluna contendo a concentração de 10  $\text{mg/mL}$ . +: Controle positivo (Ampicilina) -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo meio MH.....60
- Figura 17 - Resultado da CBM utilizando quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM) das formulações tópicas. Cada quadrante da placa de Petri recebeu um tratamento com uma formulação diferente. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.....60
- Figura 18 - Resultados da análise de hemólise (%). **A** – Formulação tópica contendo o óleo de canela. **B** – Formulação tópica contendo o óleo de coentro. Triton – Controle positivo (100 % hemólise). PBS (Neg.) – Controle negativo, contendo solução de PBS com a formulação sem óleos essenciais. \* - Significativo em relação ao controle negativo – considerado como 0 % de hemólise (Dunnett  $p < 0,05$ ). Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey a 5 %.....61

- Figura 19 - Avaliação da atividade das formulações tópicas no biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnnett,  $p < 0,05$ ).....62
- Figura 20 - Avaliação da atividade das formulações tópicas na inibição do biofilme em formação do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnnett,  $p < 0,05$ ).....63
- Figura 21 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 24 horas. O início e o final da fase *log* foram calculados e adicionados ao gráfico.....64
- Figura 22 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 17 horas na presença das formulações tópicas contendo os óleos essenciais nas concentrações CIM.....65
- Figura 23 - Sobrevivência (em quantidade de larvas) de *G. mellonella*, após 96 horas na presença das formulações tópicas contendo os óleos essenciais nas concentrações CIM. S/ óleo (Neg.) – Concentração CIM da formulação tópica na qual não contém os óleos essenciais. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnnett,  $p < 0,05$ ).....66
- Figura 24 - Larvas de *G. mellonella* na comparação de vida e morte. **A** – Larva viva e saudável. **B** – Larva morta e melanizada.....66

## CAPÍTULO II

- Figura 1 - Compostos MI23 e MI24 apresentando atividade antibacteriana na concentração 1 mg/mL. +: Controle positivo (Meio MH com ampicilina em sua CIM). -: Controle negativo (Meio MH com DMSO na concentração de 1 % e 2 %)......103
- Figura 2 - Estrutura química dos compostos codificados como MI23 e MI24.....103
- Figura 3 - CIM dos compostos MI23 (a) e MI24 (a) apresentando atividade antibacteriana na concentração 0,25 mg/mL (Primeira concentração sendo 0,5 mg/mL). +: Controle positivo (Meio MH com ampicilina). -: Controle negativo (Meio MH, DMSO e inóculo bacteriano). M: Controle de meio (Meio MH).....104
- Figura 4 - Avaliação da atividade dos compostos sintéticos no biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnnett,  $p < 0,05$ ).....107

- Figura 5 - Avaliação da atividade dos compostos sintéticos na inibição do biofilme em formação do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).....107
- Figura 6 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 24 horas. O início e o final da fase *log* foram calculados e adicionados ao gráfico.....109
- Figura 7 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 17 horas na presença dos compostos MI23 e MI24 nas concentrações CIM.....110

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 - Espécies vegetais das quais os óleos essenciais utilizados no estudo foram extraídos.....	33
Tabela 2 - Componentes e a dose (%) para a preparação das formulações tópicas contendo os óleos essenciais.....	42
Tabela 3 - Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) dos quatro óleos essenciais em MRSA-USA300.....	52
Tabela 4 - Porcentagem do rompimento do biofilme pré-formado de MRSA-USA300, pelos óleos essenciais.....	54
Tabela 5 - Porcentagem da inibição do biofilme em formação de MRSA-USA300, pelos óleos essenciais.....	56
Tabela 6 - Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da ampicilina e tetraciclina em MRSA-USA300.....	57
Tabela 7 - Valores de $\Sigma\text{CIF}$ dos compostos analisados em MRSA-USA300, com a sua conclusão referente a atividade sinérgica.....	59
Tabela 8 - Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) das formulações tópicas MRSA USA300.....	60
Tabela 9 - Porcentagem do rompimento do biofilme pré-formado de MRSA-USA300, pelas formulações tópicas.....	62
Tabela 10 - Percentual da inibição do biofilme em formação de MRSA-USA300, pelas formulações tópicas.....	63

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Relação das classes de compostos avaliados, número de compostos avaliados por classe e estruturas químicas gerais.....	97
Tabela 2 - Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) dos compostos sintéticos em MRSA-USA300.....	104
Tabela 3 - Percentual do rompimento do biofilme pré-formado de MRSA-USA300, pelos compostos MI23 e MI24.....	106

Tabela 4 - Percentual da inibição do biofilme em formação de MRSA-USA300, pelos compostos MI23 e MI24.....	108
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS - Absorbância

AMP – Ampicilina

ANOVA - Análise de variância

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CIF - Concentração inibitória fracional

CIM - Concentração Inibitória Mínima

D.O. - Densidade Ótica

DMSO - Dimetilsulfóxido

EPS - *Extracellular polymeric substances*

GRAS - Geralmente reconhecidos como seguros, em inglês

LPS – Lipopolissacarídeos

MH - Meio Mueller-Hinton

MRSA - Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus*

MRSA-USA300 – Meticilina-resistente *S. aureus* USA300

PBP - *Penicillin-binding proteins*

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PVL - *Panton-Valentine leucocidin*

q.s.p - Quantidade suficiente para

SCCmec – *Staphylococcal chromosomal cassette mec*

TET - Tetraciclina

TSST - *Toxic shock syndrome toxin*

Tween 80 - Polissorbato 80

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
2.1. Produtos naturais.....	23
2.2. Óleos essenciais.....	24
2.3. Sinergismo.....	25
2.4. Resistência bacteriana.....	26
2.5. Biofilme bacteriano.....	27
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
2.7. Meticilina-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA, em inglês).....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1. Óleos essenciais, microrganismo utilizado e condições de cultivo.....	33
4.2. <i>Screening</i> dos óleos essenciais.....	34
4.3. Cromatografia gasosa dos óleos essenciais.....	34
4.4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais com atividade antibacteriana.....	34
4.5. Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais com atividade antibacteriana.....	35
4.6. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme pré-formado.....	36
4.7. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme em formação.....	38
4.8. Citotoxicidade dos óleos essenciais em eritrócitos humanos.....	39
4.9. CIM de antibióticos comerciais.....	40
4.10. Análise do sinergismo entre os óleos essenciais e óleos essenciais com antibióticos comerciais.....	41
4.11. Preparação das formulações tópicas na forma de gel dérmico.....	42
4.12. CIM das formulações tópicas.....	43
4.13. CBM das formulações tópicas.....	43
4.14. Avaliação da atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme pré-formado.....	44
4.15. Avaliação da atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme em formação.....	44
4.16. Citotoxicidade das formulações tópicas em eritrócitos humanos.....	45
4.17. Toxicidade <i>in vivo</i> utilizando <i>Galleria mellonella</i> como modelo animal.....	45
4.18. Cinética de crescimento bacteriano na presença das formulações tópicas.....	46

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
5.1. Óleos essenciais com atividade antibacteriana contra MRSA-USA300 .....	47
5.2. Cromatografia gasosa dos óleos essenciais ativos.....	47
5.3. CIM e CBM dos óleos essenciais ativos em MRSA-USA300 .....	52
5.4. Citotoxicidade em eritrócitos.....	52
5.5. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme pré-formado .....	53
5.6. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme em formação.....	55
5.7. CIM de antibióticos comerciais .....	57
5.8. Sinergismo .....	57
5.9. Preparação das formulações tópicas .....	59
5.10. CIM e CBM das formulações tópicas em MRSA-USA300 .....	59
5.11. Citotoxicidade das formulações tópicas em eritrócitos humanos .....	61
5.12. Atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme pré-formado .....	61
5.13. Atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme em formação .....	62
5.14. Cinética de crescimento bacteriano na presença das formulações tópicas.....	63
5.15. Toxicidade <i>in vivo</i> utilizando <i>Galleria mellonella</i> como modelo animal .....	65
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>88</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>89</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>91</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
2.1. Objetivo geral .....	95
2.2. Objetivos específicos .....	95
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>96</b>
3.1. Obtenção dos compostos .....	96
3.2. Obtenção do isolado .....	99
3.3. <i>Screening</i> dos compostos .....	99
3.4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana .....	99
3.5. Concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana .....	100
3.6. Avaliação da atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme pré-formado...100	

3.7. Avaliação da atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme em formação ..	101
3.8. Cinética de crescimento bacteriano na presença dos compostos sintéticos.....	101
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
4.1. <i>Screening</i> dos compostos .....	103
4.2. CIM e CBM dos compostos sintéticos com atividade antibacteriana .....	104
4.3. Atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme pré-formado .....	105
4.4. Atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme em formação .....	107
4.5. Cinética de crescimento bacteriano na presença dos compostos sintéticos.....	109
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>113</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>116</b>

## CAPÍTULO I

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS FORMULAÇÕES TÓPICAS EM METICILINA-RESISTENTE *Staphylococcus aureus* USA300**

## 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de moléculas pertencentes aos produtos naturais. Estes são sintetizados pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas e responsáveis por funções como atração de polinizadores, defesa contra patógenos e proteção contra raios ultravioleta. Sua composição é extremamente variada, possuindo de um a três compostos majoritários, sendo a classe dos terpenos e fenilpropanoides as mais comuns. Diversos estudos têm comprovado a eficácia da utilização dos óleos essenciais e seus componentes contra bactérias. Devido ao grande problema atual da resistência bacteriana aos antibióticos comerciais se torna extremamente necessária a prospecção e o desenvolvimento de novas moléculas com potencial antimicrobiano e antibiofilme. Neste contexto, os óleos essenciais surgem como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de moléculas isoladas ou em sinergismo com os antibióticos no combate a infecções bacterianas, inclusive contra isolados que apresentam resistência.

Diversos destes isolados resistentes são da espécie *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria é um coco Gram-positivo, capaz de habitar diferentes ambientes. Entretanto, tem causado grande preocupação no âmbito clínico por causar diversas doenças, tais como foliculites, abscessos cutâneos, pneumonia, endocardite e sepse. Vários isolados apresentam resistência a antibióticos, a exemplo dos Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA, em inglês). Apesar de inicialmente estes isolados apresentarem apenas resistência contra o antibiótico metilina, hoje muitos já são considerados multiresistentes. Um desses isolados, primeiramente relatado nos EUA, é o denominado USA300 (MRSA-USA300). Sendo reconhecido por sua capacidade de causar infecções oportunistas, principalmente hospitalares, difíceis de serem tratadas. Este isolado apresenta multirresistência a antibióticos, sendo encontrados genes de resistência para drogas de variadas classes, a exemplo da tetraciclina, mupirocina, vancomicina e gentamicina.

Neste contexto, com a proposta de desenvolver novos compostos com atividade antibacteriana, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais e suas formulações tópicas em MRSA-USA300.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produtos naturais

Os produtos naturais são substâncias orgânicas que possuem variadas bioatividades relacionadas com o aumento das vantagens competitivas do seu hospedeiro, como defesa, comunicação e reprodução (Hanson, 2003).

Registros da utilização destes produtos datam de diversas civilizações antigas. Os antigos egípcios e babilônicos já utilizavam plantas medicinais para tratar febre, dores e infecções. Tratamentos envolvendo produtos naturais advindos da China antiga são utilizados até hoje e tem sido uma fonte para o descobrimento de novas moléculas (Kiefer, 1997).

O final do século XIX ficou marcado como uma nova era no descobrimento e desenvolvimento de novas drogas pela companhia Bayer. Em 1874, o ácido salicílico foi desenvolvido e amplamente comercializado na forma de cápsulas que tratavam principalmente dores em geral (Demain & Zhang, 2005).

Aproximadamente metade de todas as drogas aprovadas para comercialização, e cerca de um terço das vendas de fármacos foi originada de produtos naturais, estas sendo moléculas puras, modificadas ou empregadas em sinergismo com outros compostos (Strohl, 2000; Bolzani et al., 2012; Newman & Cragg, 2012). O número total de produtos naturais é incerto, sendo a sua grande maioria produzida por microrganismos e plantas (Newman & Cragg, 2020). Estudos sugerem que há cerca de 250 mil moléculas já isoladas e em estudo contínuo em laboratórios pelo mundo, dando início ao descobrimento de novas drogas, utilizando técnicas modernas (Newman & Cragg, 2020).

Levantamentos bibliográficos recentes reforçam o Brasil como sendo o país detentor da maior biodiversidade do planeta. Com uma estimativa de 1,8 milhão de espécies presentes no território, apenas 350 mil foram catalogadas e uma quantidade ainda menor foi estudada (Joly et al., 2011). Neste contexto, o ecossistema amazônico é considerado como o mais biodiverso do mundo, com milhares de espécies que podem conter produtos naturais promissores ainda não descobertos (Carneiro et al., 2014).

Dentre os produtos naturais, podemos citar as drogas com atividade antifúngica (El-Hossary et al., 2017), anticancerígena (Rayan et al., 2017), cicatrizante (Ibrahim et al., 2018), antiviral (Batista et al., 2019), antiemético (Sulaeman et al., 2018), ansiolítico (Sales et al., 2020) e inseticidas (Haddi et al., 2020).

## 2.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de moléculas, com características majoritariamente hidrofóbicas, que podem desempenhar funções como atração de polinizadores, proteção contra patógenos e mudanças drásticas na temperatura (Krishna et al., 2000; Retta et al., 2012). Estes óleos são extraídos por hidrodestilação e destilação por arraste de vapor, sendo utilizadas diversas partes das plantas, a exemplo de flores, folhas, caules, raízes e frutas (Wang & Weller, 2006). Dentre as espécies de plantas conhecidas, 10 % contêm óleos essenciais, estas sendo classificadas como plantas aromáticas (Svoboda & Greenaway, 2003). Com um total de 3 mil óleos essenciais conhecidos, aproximadamente 150 são comercializados a nível global (Barbieri & Borsotto, 2018).

Com um grande mercado em rápida expansão, em 2020, os óleos essenciais movimentaram cerca de 10 bilhões de dólares, chegando a uma produção recorde de 370 mil toneladas na qual 70 % deste montante foi consumido pelos Estados Unidos e Europa (Sharmeen, 2021).

Os óleos essenciais possuem a característica “GRAS” (Geralmente reconhecidos como seguros, em inglês). Após anos de pesquisa e por fazerem parte da dieta de humanos, órgãos reguladores de diferentes países concederam esse título de segurança aos óleos essenciais (Manion & Widder, 2017). São utilizados principalmente na aromaterapia, em que empresas desenvolvem *blends* de óleos para gerar diferentes aromas. Incorporados em formulações farmacêuticas para que, além do aroma característico, possam desempenhar as bioatividades relacionadas (Calo et al, 2015). Além disso, são utilizados para preservar alimentos, principalmente em sistemas pós-colheita. Estudos observaram que pela diminuição do pH e o aumento da concentração de sal, alguns óleos essenciais aumentam a sua capacidade de proteger alimentos contra a decomposição por microrganismos (Friedly et al, 2009).

A extração dos óleos essenciais tem se mostrado complexa devido à alta variabilidade dos seus componentes dependendo de fatores externos nos quais os organismos estão expostos. Fatores como estações do ano, horário de coleta das partes do vegetal, umidade, predadores, dentre outros, afetam de modo quantitativo e qualitativo os componentes dos óleos (Dhifi et al., 2016). Essas variações de composição podem ser analisadas e caracterizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS, em inglês), utilizando bancos de dados de moléculas previamente caracterizadas (Bakkali et al, 2008).

Os óleos essenciais são misturas de componentes, e dentre as diversas classes de moléculas, a classe dos terpenos e fenilpropanoides estão majoritariamente presentes (Silva et

al., 2003; Bakkali et al., 2008). Os terpenos são uma classe de moléculas derivadas da via do mevalonato. São classificados de acordo com o número de unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) presentes na estrutura. Os monoterpenos, com duas unidades, e os sesquiterpenos, com três unidades são majoritários nos óleos essenciais (Bilia et al., 2014). Terpenos menores (que contém uma, duas ou três unidades de isopreno) são altamente voláteis, conferindo essa característica para os principais óleos essenciais (Hamm et al., 2005). Adicionalmente, os fenilpropanoides são moléculas derivadas do aminoácido fenilalanina, posteriormente convertido ao ácido cinâmico e, através deste, produzindo outros componentes da classe dos fenilpropanoides (Hahlbrock et al., 1989).

Neste contexto, as moléculas que apresentam funções orgânicas fenólicas e as com alta hidrofobicidade possuem característica de serem antibacterianas (Lu et al., 2018). Diversas vias de ação dos óleos essenciais contra as bactérias já foram descritas, a exemplo do rompimento da parede de peptidoglicano (LeBel et al., 2019), interagir e deformar proteínas da divisão celular (Domadia et al., 2007), alterar a morfologia (Hafedh et al., 2009) e a fisiologia da bactéria (Di Pasqua et al., 2013).

A bioatividade dos óleos essenciais, na maioria das vezes, está relacionada com o sinergismo desempenhado pela variedade de moléculas presentes nestes.

### **2.3. Sinergismo**

Quando duas ou mais moléculas ou misturas são utilizadas simultaneamente e estas apresentam um resultado mais eficaz quando comparada com utilização individual das mesmas, é dado o nome de sinergismo (Tallarida, 2011). Essas moléculas em união podem aumentar a resposta celular para determinada via ou mecanismo de ação, enquanto a quantidade necessária dessas moléculas em conjunto pode ser menor do que se fossem utilizadas isoladamente (Tallarida & Raffa, 2010). Um dos principais medicamentos que contém drogas com característica sinérgica é o coquetel contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Hurwitz et al., 2008). O efeito sinérgico entre moléculas pode ocorrer de duas formas distintas. A primeira delas, e mais descrita na literatura, é através da interação das moléculas na mesma via ou em diferentes vias de ação, aumentando o efeito em comparação com apenas uma das moléculas sem estar em união (Yang et al., 2014). A segunda maneira é a produção de uma ou mais moléculas novas devido à interação das moléculas utilizadas para compor a mistura sinérgica (Lau et al., 2012).

Atualmente há três principais metodologias para se analisar o sinergismo entre moléculas: *Checkerboard*, isoblograma e a curva de morte celular, sendo o primeiro mais utilizado devido à sua praticidade, baixo custo e eficácia (Mackay et al., 2000).

A atividade sinérgica entre óleos essenciais e entre óleos e antibióticos é amplamente relatada em diversas espécies bacterianas (Duarte et al., 2012; Guerra et al., 2012). Essa atividade muitas vezes ocorre devido a diferenças na interação dos componentes dos óleos essenciais e dos antibióticos na célula bacteriana (Palaniappan & Holley, 2010). Constituintes dos óleos essenciais como o carvacrol e o timol interagem com lipídeos da membrana externa de bactérias, causando a sua desintegração. Esse processo auxilia na entrada de compostos que agem no citoplasma, interagindo com proteínas ou afetando vias essenciais para a sobrevivência celular (Pei et al., 2009).

Portanto, o estudo da união entre duas ou mais moléculas com efeito sinérgico é uma das principais estratégias para o desenvolvimento de novas formulações com efeito antibacteriano, em especial contra as bactérias que apresentam resistência a antibióticos.

#### **2.4. Resistência bacteriana**

Desde a descoberta da penicilina, em 1928, diversos antibióticos foram desenvolvidos para o tratamento contra espécies bacterianas (Fleming, 1929; WHO, 2012). Estima-se que apenas 20 % dos antibióticos são utilizados em hospitais e com acompanhamento médico. O restante é adquirido sem a prescrição médica, ou a de outro profissional de saúde (Machowska & Stålsby-Lundborg, 2019). Apesar da alta efetividade no tratamento, a utilização descontrolada dos antibióticos é um dos fatores na seleção de populações de bactérias resistentes (Palumbi, 2001). Relatos de 1940 descrevem a primeira bactéria resistente à penicilina, antibiótico amplamente utilizado para o tratamento das infecções na primeira metade do século XX (Abraham & Chain, 1940). Posteriormente, diversas espécies bacterianas contendo marcas de resistência ou multirresistência aos antibióticos foram descobertas (Livermore, 2002; Reinthaler et al., 2003; Moran et al., 2006; Hageman et al., 2008; McDougal et al., 2010). Essa multirresistência gera um alerta com o objetivo de desenvolver novos agentes antimicrobianos (WHO, 2018). Recentemente, organizações internacionais estão adotando o conceito de “Saúde Única” (*One Health*, em inglês) para tomar decisões e lançar diretrizes em questões relacionadas à saúde humana (Gibbs, 2014). Este conceito integra a saúde de populações humanas com a de animais, meio ambiente e agricultura (Hinchliffe, 2015). Um dos principais conceitos e objetivos da *One Health* é evitar o aparecimento, disseminação e

resistência de agentes etiológicos capazes de causar zoonoses, a exemplo das bactérias resistentes (Lammie & Hughes, 2016).

Entretanto, apesar dos apelos das instituições internacionais, das 18 grandes companhias farmacêuticas do mundo, 15 abandonaram o desenvolvimento de novos antibióticos (Bartlett et al., 2013). Alguns motivos se devem a alta regulação do mercado, à preferência por tratamento de doenças crônicas e ao curto tempo de efetividade do antibiótico, tendo em vista a rápida seleção de bactérias resistentes (Piddock, 2012; Wright, 2014). Todos esses fatores reduzem os antimicrobianos aprovados por agências reguladoras, sendo que em 2014 apenas quatro novas drogas foram aprovadas e a quantidade vem se estabilizando ou caindo anualmente (CDC, 2013; Mullard, 2015).

Diversos isolados bacterianos possuem diferentes formas de inativar o efeito do agente antibacteriano. A exemplo da produção da enzima  $\beta$ -lactamase que rompe permanentemente o núcleo  $\beta$ -lactâmico de antibióticos desta classe, causando a sua inativação (Probst-Kepper & Geginat, 2018). Pela diminuição na velocidade de entrada do agente antimicrobiano devido a barreiras, como exemplo, a maior espessura da parede celular ou da cápsula (Sarkar et al, 2017). Alteração do sítio ativo dos alvos dos antibacterianos, como principal exemplo a alteração das proteínas-ligadoras de penicilina (PBP, em inglês) (Lim & Strynadka, 2002). Expulsão do agente antibacteriano do espaço citoplasmático através de mecanismos como as “bombas de efluxo” (Ghotaslou et al., 2018). Além destes mecanismos, a resistência bacteriana pode estar relacionada com a formação de agregados celulares, denominados de biofilmes.

## **2.5. Biofilme bacteriano**

Algumas células bacterianas possuem a característica de ter vida livre, não aglomerando com outras células. Entretanto, a grande maioria das bactérias é capaz de formar agregados. Estes agregados celulares são denominados biofilme, e podem se aderir nas mais diferentes superfícies bióticas e abióticas (Archibald & Gaynes, 1997; Trentin et al, 2013). A união destas células é possível devido à matriz de substâncias extracelulares poliméricas (EPS, em inglês). A EPS é composta principalmente por água (95 %) e polissacarídeos aglutinantes das células, sendo o exterior do biofilme a área mais espessa (Hall-Stoodley et al., 2006). Além de água e polissacarídeos, a EPS contém proteínas, DNA, sais minerais e outras moléculas provenientes do meio externo e que realizam papel fundamental na comunicação das células no interior do biofilme (Donlan & Costerton, 2002).

Para bactérias que possuem a capacidade de formar biofilme, estas passam por cinco estágios distintos para a aglutinação celular e a produção da EPS. Primeiramente, células em estado de vida livre aderem-se a uma superfície biótica ou abiótica por meio de proteínas adesinas. Posteriormente, com a multiplicação celular, estas começam a produzir os elementos da EPS, tais como proteínas e polissacarídeos. Os estágios posteriores estão relacionados com o crescimento e a maturação do biofilme, levando em consideração a superfície na qual ele está aderido e quais as características do meio externo. Por fim, no último estágio, células de vida livre são liberadas da matriz EPS, possuindo a capacidade de formar biofilme em outra superfície (Sauer et al., 2002). Biofilmes bacterianos desempenham um papel fundamental no ciclo de vida de diversas espécies na qual este está presente. Como exemplo, a interação de raízes de plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio é uma simbiose fundamental na qual o biofilme bacteriano é de extrema importância (Burns & Hardy, 2012). Além disso, plantas que estão presentes em ambientes com uma alta concentração de nutrientes, necessitam da simbiose com bactérias presentes em biofilmes nas suas raízes para absorver e disponibilizar estes nutrientes (Danholm & Fuqua, 2007). Apesar de diversas vantagens competitivas na interação de hospedeiros com o biofilme bacteriano, este pode estar relacionado com diversas patologias.

Como exemplo, células envolvidas por biofilme tem causado intensos problemas na saúde pública, visto que este é essencial na persistência das infecções (Li et al., 2008). Estima-se que 80 % das infecções bacterianas são causadas por bactérias na forma de biofilme em tecidos do hospedeiro, sendo esses encontrados majoritariamente em órgãos mais vascularizados, como o pulmão e o fígado (Shi & Zhu, 2009). Devido à espessa matriz extracelular que envolve o biofilme, as drogas antibacterianas possuem uma dificuldade na faixa de 100 a 1,000 vezes a mais para atingir as células internas, quando relacionadas com células de vida livre (Mah & O'Toole, 2001; Stoodley et al., 2002). Diversas indústrias, como a alimentícia e a farmacêutica, tem focado no desenvolvimento de moléculas ou agentes desinfetantes para evitar a formação do biofilme. Esta seria uma estratégia mais viável no ponto de vista econômico e sanitário quando comparado em romper um biofilme já estabelecido (Simões et al., 2011). Uma espécie bacteriana que apresenta uma intensa formação de biofilme é o *Staphylococcus aureus* (Stepanović et al., 2007). Esta bactéria está presente nos mais variados ambientes. Entretanto, tem-se tornado um grande problema para a saúde pública devido à sua alta taxa de infecção e resistência a antibióticos (CDC, 2019).

## 2.6. *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, com o formato de cocos e arranjo de estafilococos. A maior parte dos isolados possuem uma coloração amarelada brilhante, remetendo a coloração dourada, advindo com isso o nome “*aureus*” (Rasigade & Vandenesch, 2014). Estão presentes nos mais variados ambientes, seja em cascas de árvores, espelhos d’água, dejetos de animais, dentre outros locais. Entretanto, 80 % de todos os isolados de *S. aureus* encontrados estão presentes no corpo de animais homeotérmicos, em especial o ser humano (Lowy, 1998). Neste contexto, o primeiro isolado foi identificado nos anos 1880, em um abscesso purulento de um paciente hospitalizado (Newsom, 2008).

Diversos isolados causados graves problemas de saúde pública, principalmente pela sua presença em ambientes hospitalares e por causar infecções oportunistas (Keynan & Rubinstein, 2013). As principais doenças relatadas são as infecções de pele e ferimentos, osteomielite, artrites, pneumonia e sepse (Frank et al., 2010; Nadimpalli et al., 2018). Ademais, estas infecções possuem um grau mais complexo no tratamento devido ao intenso biofilme em que diversos isolados possuem a capacidade de produzir (Conlon, 2014).

Diversos fatores de virulência foram relatados para as diferentes doenças e órgãos que essa bactéria pode infectar. Como exemplo da endocardite, proteínas como as de adesão ao fibrinogênio, fator de aglomeração e os ácidos teicoicos presentes na parede celular, são de extrema importância para a infecção (DeLeo et al., 2009). O choque anafilático e a sepse estão diretamente relacionados com os “superantígenos”. Estes são conhecidos por TSST (*Toxic shock syndrome toxin*) e são moléculas liberadas por *S. aureus* virulentos, causando a lise de células ao redor para que nutrientes sejam liberados e estejam disponíveis para o crescimento bacteriano (Salgado-Pabón et al., 2013).

A pneumonia causada por *S. aureus* é uma das doenças mais preocupantes, do ponto de vista médico, por ter uma alta dificuldade no tratamento e por atingir um órgão extremamente vascularizado, aumentando as chances de ocorrer uma sepse (Musser, 1990). Um dos principais fatores de virulência da pneumonia bacteriana é a liberação da leucocidina Pantón-Valentine (PVL, em inglês). Esta toxina é codificada por dois genes, e sua liberação está associada à formação de poros na membrana plasmática de leucócitos causando a lise celular (Le & Otto, 2015). A pneumonia causada por *S. aureus* gera ainda uma preocupação clínica no contexto em que a maioria dos isolados patogênicos possuem um grau de resistência a antibióticos.

## 2.7. Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA, em inglês)

Dentre as várias espécies que apresentam resistência a antibióticos, destaca-se o MRSA, sendo responsável por aproximadamente 120 mil infecções por ano, sendo 20 mil casos fatais, apenas nos EUA (Kourtis et al., 2019). O antibiótico meticilina pertence ao grupo das penicilinas ( $\beta$ -lactâmicos), sendo inicialmente introduzido em 1959 para o tratamento de bactérias resistentes à penicilina. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de antibióticos contendo em seu núcleo estrutural o anel  $\beta$ -lactâmico. Essa classe de moléculas que, além das penicilinas, envolve as cefalosporinas, carbapenemos e as monobactamas, é responsável por movimentar 65 % do mercado global dos antibióticos (Thakuria & Lahon, 2013). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem a última etapa na síntese de peptídeoglicano ao se ligar às PBPs. Essa ligação interrompe o processo final de transpeptidização, inviabilizando a formação da parede celular, causando a lise da célula bacteriana (Eckburg et al, 2019). A meticilina foi amplamente utilizada no início da década de 1960 para o tratamento das mais variadas infecções bacterianas. Entretanto, em 1961, populações de MRSA foram descobertas no Reino Unido (Jevons, 1961). Posteriormente, diversos países relataram o isolamento de populações de MRSA, principalmente em ambiente hospitalar (Hussain et al., 2000).

A resistência à meticilina é devida à alteração estrutural das PBPs conferindo menor interação com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, dando continuidade ao processo de síntese da parede celular e viabilizando a sobrevivência da célula (Lim & Strynadka, 2002). A alteração das PBPs está relacionada com o gene *mec*, presente na região SCCmec (*Staphylococcal chromosomal cassette mec*) no cromossomo bacteriano dos isolados resistentes (CDC, 2003). Este gene codifica a proteína modificada PBP-2a, na qual possui uma baixa afinidade com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Rasigade & Vandenesch, 2014). Portanto, essa proteína auxilia na produção de peptídeoglicano na parede celular, mesmo na presença de diferentes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Os isolados de MRSA causam infecções principalmente na pele (lesões necróticas), nos pulmões (pneumonia hemorrágica) e, ao atingir a corrente sanguínea, são capazes de causar sepse (Vandenesch et al., 2003). Um desses isolados é o MRSA-USA300, primeiramente relatado no ano 2000, como o agente etiológico em infecções de jogadores de futebol na Pensilvânia, EUA (CDC, 2003a). Após este primeiro relato, diversos estados dos EUA investigaram surtos de infecção causada por esse isolado (CDC, 2003a; CDC 2003b). No mesmo ano, 59 pessoas em uma prisão no Mississippi, EUA, apresentaram lesões na pele causadas pelo MRSA-USA300 (CDC, 2003b).

O MRSA-USA300 faz parte de um grupo filogenético contendo onze isolados “USA” (USA100-USA1100), sendo inicialmente descritos apenas nos EUA (McDougal et al., 2003). Posteriormente, pesquisadores de diversos países relataram a presença do isolado MRSA-USA300 em pacientes hospitalizados por infecção, sendo a maioria regressando de férias dos EUA (Arias et al., 2008; Gottlieb et al., 2008; Witte et al., 2008). Essa alta taxa de infecção pode ser explicada, em parte, pelas diferentes maneiras em que essa bactéria é transmitida entre indivíduos. Como exemplo, através de relações sexuais (Diep et al., 2008), contato com a pele (King et al., 2006), superfícies contaminadas (Desai et al., 2011) e, a mais comum, através de secreção nasal (Bootsma et al., 2010). Apesar de, inicialmente, isolados de MRSA-USA300 apresentarem apenas resistência à meticilina, nos últimos cinco anos, diversos relatos apresentaram populações resistentes a diferentes antibióticos. Como exemplo, resistência à tetraciclina (Tenover et al., 2006), mupirocina (Diep et al., 2008), fluoroquinolonas (Moran et al., 2006), vancomicina (Hageman et al., 2008) e gentamicina (McDougal et al., 2010). Nesse contexto, há a necessidade da prospecção e desenvolvimento de novas moléculas orgânicas com potencial antibacteriano.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de dezenove óleos essenciais e de suas formulações tópicas em MRSA-USA300.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o *screening* para a atividade antibacteriana de dezenove óleos essenciais, na concentração de 10 mg/mL, em MRSA-USA300;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a atividade antibiofilme dos óleos essenciais ativos;
- Analisar por cromatografia gasosa os óleos essenciais ativos;
- Determinar o percentual de hemólise em eritrócitos humanos dos óleos essenciais ativos;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM), a atividade antibiofilme, o percentual de hemólise em eritrócitos humanos e a cinética de crescimento bacteriano na presença de formulações tópicas contendo óleos essenciais ativos;
- Determinar a toxicidade das formulações tópicas no modelo *Galleria mellonella*;
- Desenvolver formulações tópicas contendo os óleos essenciais que apresentarem melhor atividade de acordo com análises anteriores.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Óleos essenciais, microrganismo utilizado e condições de cultivo

Dezenove óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e diluídos em Tween 80 (Polissorbato 80) na concentração estoque de 100 mg/mL. As informações acerca dos óleos essenciais utilizados estão descritos na Tabela 1. O isolado de MRSA-USA300 foi adquirido da coleção do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Este foi cultivado em meio Mueller-Hinton (MH) sob agitação de 180 rpm e 37 °C, até a D.O.<sub>570nm</sub> de 0,5, equivalente a uma população de  $1 \times 10^8$  UFC/mL

Tabela 1 - Espécies vegetais das quais os óleos essenciais utilizados no estudo foram extraídos.

Nome científico	Nome comum
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim <sup>1</sup>
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela <sup>1</sup>
<i>Coriandrum sativum</i>	Coentro <sup>1</sup>
<i>Myristica fragrans</i>	Noz-moscada <sup>1</sup>
<i>Citrus sinensis</i>	Laranja-doce <sup>1</sup>
<i>Origanum majorana</i>	Manjerona <sup>1</sup>
<i>Mentha spicata</i>	Hortelã-do-campo <sup>1</sup>
<i>Laurus nobilis</i>	Louro <sup>1</sup>
<i>Citrus limonum</i>	Limão <sup>1</sup>
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto <sup>3</sup>
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre <sup>2</sup>
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho <sup>2</sup>
<i>Citrus aurantifolia</i>	Lima-comum <sup>3</sup>
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca <sup>3</sup>
<i>Citrus reticulata</i>	Tangerina <sup>3</sup>
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo <sup>3</sup>
<i>Murraya koenigii</i>	Curry <sup>1</sup>
<i>Coffea arabica</i>	Café <sup>1</sup>
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã-pimenta <sup>2</sup>

1- Adquirido da Laszlo Aromaterapia e Aromatologia, Brasil (<http://www.emporiolaszlo.com.br/>);

2 - Adquirido da Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, Brasil (<http://www.ferquima.com.br/novo/index.htm>);

3 - Adquirido do Laboratório de Síntese de Agroquímicos da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 33

## 4.2. *Screening* dos óleos essenciais

Inicialmente, para avaliar a atividade antibacteriana contra o MRSA-USA300, soluções dos óleos essenciais, diluídos em Tween 80, foram novamente diluídas para concentrações de 10 mg/mL, utilizando meio MH. Em seguida, 100 µL das soluções de 10 mg/mL dos dezoito óleos essenciais foram adicionados em poços de uma microplaca contendo 96-poços. Posteriormente, 100 µL de inóculo bacteriano diluído à população de  $1 \times 10^6$  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 % m/v) foram adicionados em cada poço sendo a placa novamente incubada durante 2 horas a 37 °C, e posteriormente observada à coloração (Elshikh et al., 2016). Os óleos essenciais que apresentaram atividade na concentração analisada foram selecionados para o prosseguimento do estudo. O antibiótico ampicilina, em sua concentração inibitória mínima (64 µg/mL) foi utilizado como controle positivo e, como controle negativo, foi utilizada uma solução de meio MH contendo Tween 80 (5 % m/v). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

## 4.3. Cromatografia gasosa dos óleos essenciais

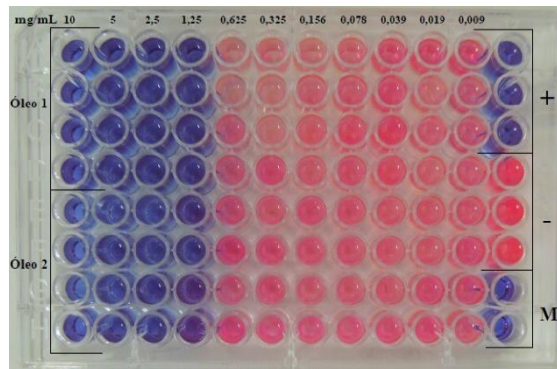
Os óleos essenciais que apresentaram atividade antibacteriana foram analisados em aparelho CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A em metodologia proposta por Nascimento e colaboradores (2017). Os componentes dos óleos essenciais foram identificados pelos bancos de dados das livrarias do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e Wiley 7.

## 4.4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais com atividade antibacteriana

A análise da CIM foi realizada de acordo com Elshikh e colaboradores (2016), com modificações e está de acordo com os manuais do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (BrCAST, 2018). Em uma microplaca de 96-poços, 100 µL de meio MH foram adicionados em cada poço. Posteriormente, foram diluídas as soluções contendo os óleos essenciais com meio MH. 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 dos óleos essenciais foram analisadas (10 mg/mL – 0,009 mg/mL). Após as diluições, 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 % m/v) foram adicionados em cada

poço, e a placa novamente incubada durante 2 horas a 37 °C, e finalmente observada à 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 (Sarker et al., 2007). Para controle positivo foi utilizado a CIM do antibiótico ampicilina (64 µg/mL), e para o controle negativo foi utilizado meio MH com Tween 80 (5 % m/v). A Figura 1 apresenta uma microplaca na qual foi realizado um experimento de CIM. Os testes foram realizados em triplicata biológica.

Figura 1 - Análise da viabilidade celular utilizando óleos essenciais em microplaca. Controle positivo (ampicilina). – : Controle negativo. M: Controle de meio contendo meio MH.



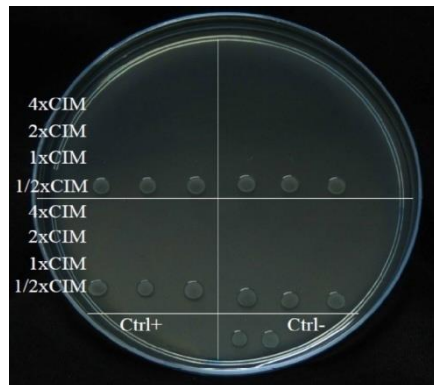
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 35

#### 4.5. Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais com atividade antibacteriana

A CBM dos óleos essenciais foi determinada de acordo com Mah (2014), com modificações. Em uma microplaca contendo 96-poços, foram adicionados 100 µL de meio MH, juntamente com 100 µL de uma solução a 10 mg/mL de cada um dos óleos essenciais e, posteriormente, realizadas 11 diluições seriadas (10 mg/mL – 0,009 mg/mL). Em seguida, 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, um volume de 1,5 µL foram inoculados em placa de Petri contendo meio MH-ágar. 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. A CBM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano nos inóculos transferidos para a placa de Petri. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Para controle positivo foi utilizado o antibiótico ampicilina em sua CIM, e para o controle negativo foi utilizado meio MH com Tween 80 (5 %

m/v). A Figura 2 apresenta uma placa de Petri na qual foi realizado um experimento de CBM. Os testes foram realizados em triplicata biológica.

Figura 2 - 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.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 36

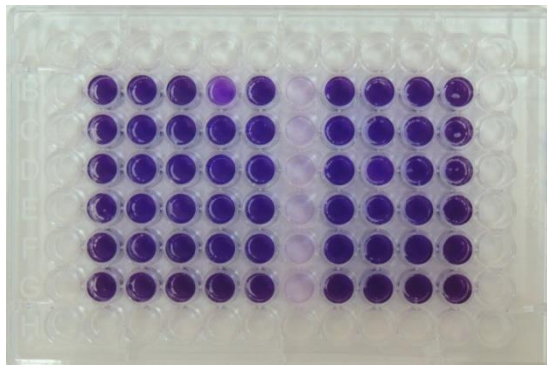
#### 4.6. Avaliação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme pré-formado

Inicialmente, o isolado MRSA-USA300 foi classificado de acordo com a sua capacidade de formar biofilme de acordo com Stepanović e colaboradores (2007). Um exemplo de placa contendo o biofilme formado está presente na Figura 3. Para isso, 100  $\mu\text{L}$  de meio MH foram adicionados em cada poço de uma microplaca 96-poços. Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da bactéria na população de  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram inoculados nos poços e incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. O meio foi então retirado e 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta 0,1 % m/v foram adicionados. A placa foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos, o cristal violeta retirado cuidadosamente, e os poços lavados duas vezes com água destilada. Posteriormente, 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético 33 % v/v foram adicionados em cada poço durante 10 minutos. Ao final, 150  $\mu\text{L}$  dessa solução presentes em cada poço foram transferidos para uma nova microplaca e as leituras de absorvância realizadas com D.O.<sub>570nm</sub>. Meio MH com Tween 80 (5 % m/v) foi utilizado como controle negativo.

A análise da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado foi realizada de acordo com Klein e colaboradores (2015), com modificações. Para isso, o isolado foi inoculado em microplacas de 96-poços como descrito anteriormente. Posteriormente, o sobrenadante foi

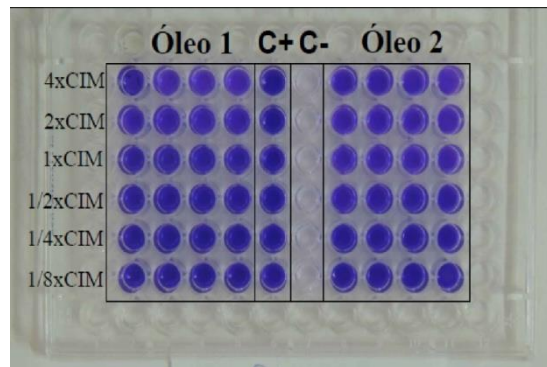
retirado lentamente e 200  $\mu$ L de solução contendo meio MH com os óleos essenciais foram adicionados nas seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM, 1/4xCIM, 1/8xCIM. A microplaca foi então incubada por 6 horas a 37 °C e, ao final desse período, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os poços lavados duas vezes com água destilada. A coloração com cristal violeta e a leitura de absorbância ocorreram como descritos previamente. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica, sendo o resultado final a média dessas repetições. Os dados foram submetidos à 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 ( $P \leq 0.05$ ). A Figura 4 apresenta uma microplaca de 96-poços na qual foi realizado um experimento de biofilme pré-formado.

Figura 3 - Placa de biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300, utilizando cristal violeta.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 37

Figura 4 - Placa de biofilme pré-formado, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+ - Controle positivo. C- - Controle negativo.



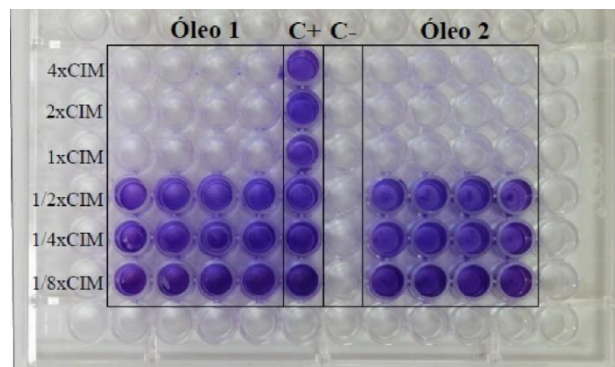
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 38

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

A análise da atividade dos óleos essenciais no biofilme em formação foi realizada 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 avaliação de atividade antibiofilme. A partir dos valores de CIM, foram utilizadas as seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM, 1/4xCIM e 1/8xCIM. Para isso, 100  $\mu$ L de meio MH foram adicionados em cada poço de uma microplaca 96-poços. Os óleos essenciais foram diluídos em meio MH a fim de gerar a solução com a concentração desejada. 100  $\mu$ L dessa solução foram acrescentados nos poços e as diluições seriadas realizadas, atingindo os valores propostos para o teste. Por fim, 100  $\mu$ L da bactéria na população de  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados em cada poço e a microplaca incubada durante 24 horas a 37 °C. Após esse período, o meio foi retirado cuidadosamente, e os poços foram lavados duas vezes com água destilada. Posteriormente, 200  $\mu$ L de cristal violeta 0,1 % m/v foram adicionados em cada poço, e a placa incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, o cristal violeta foi retirado e a placa novamente lavada com água destilada com o objetivo de retirar o excesso do corante. Para a quantificação do biofilme, 250  $\mu$ L de ácido acético 33 % v/v foram adicionados em cada poço. Após 10 minutos em contato com o cristal violeta do biofilme, 150  $\mu$ L da solução foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços. As leituras de absorbância ocorreram em D.O.<sub>570nm</sub>. MH com Tween 80 (5 % m/v) foi utilizado como controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata biológica, e o resultado final foi a média das repetições. Os dados foram submetidos a 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 ( $P \leq 0.05$ ). A Figura 5 apresenta uma microplaca de 96-poços na qual foi realizado um experimento da avaliação da atividade antibiofilme em formação.

Figura 5 - Placa de biofilme em formação, utilizando as concentrações relacionadas à CIM como tratamentos. C+: Controle positivo. C-: Controle negativo.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 39

#### 4.8. Citotoxicidade dos óleos essenciais em eritrócitos humanos

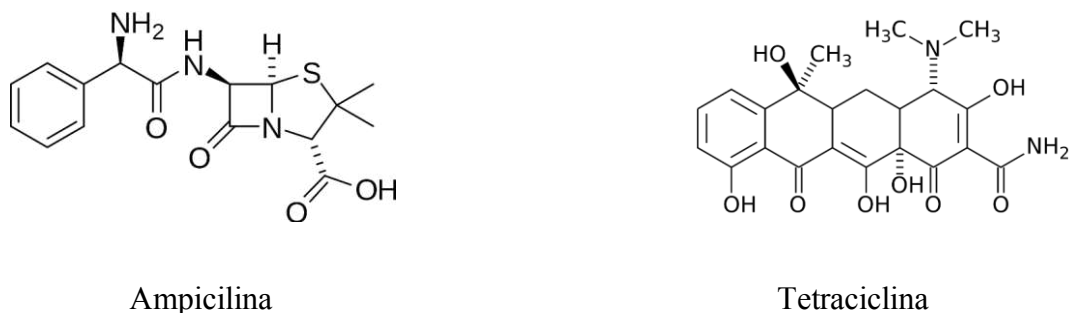
As análises de citotoxicidade em eritrócitos humanos foram realizadas de acordo com Nacif-Marçal e colaboradores (2015), com modificações, sendo utilizados eritrócitos de um doador voluntário saudável, com tipo sanguíneo A+. Para isso, 4 mL de sangue humano foram retirados à vácuo em um tubo contendo anticoagulante. O tubo foi centrifugado a 2.500 rpm durante 10 minutos, o plasma retirado e as hemácias lavadas com 4 mL de tampão fosfato-salino (PBS). Este procedimento foi repetido quatro vezes com o objetivo de retirar células brancas, plaquetas e proteínas do sistema complemento. Inicialmente, 100  $\mu$ L de PBS foram adicionados em uma microplaca de 96-poços. Posteriormente, foram plaqueados 100  $\mu$ L de solução dos óleos essenciais em PBS e realizada as diluições seriadas com as seguintes concentrações: 16xCIM – 1/8xCIM. Na sequência, foram adicionados em cada poço, 100  $\mu$ L de uma suspensão de eritrócitos a 2 % em PBS. As microplacas foram incubadas durante 45 minutos a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse período, 100  $\mu$ L da suspensão foram transferidas para outra placa e a absorbância dos poços foi analisada em espectrofotômetro em D.O.<sub>540nm</sub>. Um controle contendo apenas as concentrações dos óleos, sem as hemácias, foi preparado para realizar a subtração das absorbâncias, devido à turbidez dos óleos. Como controle negativo, foi

utilizada uma suspensão de eritrócitos com solução de PBS. Como controle positivo, foi utilizada uma solução 1 % v/v de Triton X-100. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o controle negativo pelo teste de Dunnett ( $P \leq 0.05$ ) e entre eles pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

#### 4.9. CIM de antibióticos comerciais

O protocolo utilizado foi o descrito por Elshikh e colaboradores (2016), com modificações e está de acordo com os manuais do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (BrCAST, 2018). Para a análise da CIM, foram utilizados os seguintes antibióticos: tetraciclina e ampicilina (Figura 6). Inicialmente, foram preparadas soluções estoque contendo os antibióticos e dimetilsulfóxido (DMSO). Em uma microplaca de 96-poços, 100  $\mu$ L de meio MH foram adicionados em cada poço. Cada poço inicial do teste recebeu 100  $\mu$ L da solução contendo os antibióticos, sendo a primeira concentração de 256  $\mu$ g/mL. Após a homogeneização, foram realizadas as diluições seriadas. Onze concentrações dos antibióticos foram analisadas (256  $\mu$ g/mL – 0,25  $\mu$ g/mL). Após as diluições seriadas serem realizadas, 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L de resazurina (0,01 % m/v) foram adicionados em cada poço, e a placa novamente incubada durante 2 horas a 37 °C, e posteriormente observada a coloração. O valor da CIM foi considerado como a menor diluição do antibiótico em que não houve a mudança na coloração azul nos poços. Para o controle negativo foi utilizado meio MH com dimetilsulfóxido (DMSO) (2 % v/v). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

Figura 6 – Estruturas químicas dos antibióticos ampicilina e tetraciclina.



#### 4.10. Análise do sinergismo entre os óleos essenciais e óleos essenciais com antibióticos comerciais

A avaliação do sinergismo entre os óleos essenciais e estes com os antibióticos comerciais foi realizada por meio do método de *Checkerboard*, descrito por White e colaboradores (1996), com modificações. Inicialmente, um volume de 100 µL de meio MH foi adicionado em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em cinco poços horizontalmente na microplaca, 100 µL de solução de uma concentração 16xCIM dos óleos essenciais foram adicionados e realizada a diluição seriada em cinco poços subsequentes na horizontal. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de uma solução 8xCIM dos óleos essenciais ou dos antibióticos (ampicilina ou tetraciclina) em cinco poços iniciais verticalmente. Terminada a distribuição, foram realizadas cinco diluições seriadas em poços subsequentes na vertical, tendo nos poços, diferentes concentrações (variando de 2xCIM até 1/8xCIM) de óleos essenciais e antibióticos. Por fim, 100 µL da suspensão bacteriana de MRSA-USA300 a  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionadas em cada poço, e a placa incubada durante 24 horas a 37 °C. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de resazurina (0,01 % m/v) em cada poço e a placa novamente incubada durante 2 horas a 37 °C. Para avaliar a atividade sinérgica, foi utilizado o conceito de concentração inibitória fracional (CIF), proposta por Elipoulos (1991), em que:

$$\text{CIF (óleo essencial)} = \frac{\text{CIM (óleo essencial) em combinação}}{\text{CIM (óleo essencial) individualmente}}$$

$$\text{CIF (óleo essencial ou antibiótico)} = \frac{\text{CIM (óleo essencial ou antibiótico) em combinação}}{\text{CIM (óleo essencial ou antibiótico) individualmente}}$$

$$\Sigma \text{CIF} = \text{CIF (óleo essencial)} + \text{CIF (óleo essencial ou antibiótico)}$$

Em que a interação é classificada como:

- $\Sigma \text{CIF} \leq 0,5$ : sinergismo;
- $0,5 < \Sigma \text{CIF} \leq 1$ : aditiva;
- $1 < \Sigma \text{CIF} \leq 4$ : indiferente;
- $\Sigma \text{CIF} > 4$ : antagonismo.

Como controle positivo foi utilizado o antibiótico ampicilina (64 µg/mL) e como controle negativo, meio MH com Tween 80 (5 % m/v) ou DMSO (2 % v/v). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

#### 4.11. Preparação das formulações tópicas na forma de gel dérmico

Os óleos que apresentaram atividade antibacteriana foram selecionados para serem incorporados em um gel dérmico. Foram preparadas formulações contendo aproximadamente 5 gramas com os óleos em concentração a 20 % m/m. Os componentes da formulação estão descritos em porcentagem na Tabela 2.

Tabela 2 - Componentes e a dose (%) para a preparação das formulações tópicas contendo os óleos essenciais.

<b>Componentes</b>	<b>Dose (%)</b>
Carbopol	2
EDTA Dissódico	0,1
Propilenoglicol	6
Nipagin	0,15
Nipazol	0,1
Imidazolidinil de Ureia 50 %	0,5
Óleos essenciais	20
Água purificada	1 q.s.p

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 42

Inicialmente, foram adicionadas, em um recipiente de vidro, as quantidades exatas de EDTA dissódico, nipagin, nipazol, propilenoglicol, solução de imidazolidinil de ureia 50 % e água purificada. Sob agitação constante, foi adicionado aos poucos o carbopol. A agitação foi encerrada e a mistura deixada em repouso durante 24 horas. Após esse período, a agitação foi reiniciada e foram adicionadas gotas de hidróxido de sódio 50 % até a gelificação da mistura. Por fim, os óleos essenciais foram pesados e adicionados no gel em concentrações finais de 20 % m/m.

#### 4.12. CIM das formulações tópicas

A análise foi realizada de acordo com Elshikh e colaboradores (2016), com modificações e está de acordo com os manuais do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (BrCAST, 2018). Em uma microplaca de 96-poços, 100 µL de meio MH foram adicionados em cada poço. Posteriormente, as formulações tópicas foram pesadas e diluídas em meio MH obtendo-se soluções de 40 mg/mL dos óleos essenciais. 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 totalizando onze concentrações dos óleos essenciais analisadas (10 mg/mL – 0,009 mg/mL). Após a diluição, 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 % m/v) foram adicionadas em cada poço, a placa novamente incubada durante 2 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. Para controle positivo foi utilizado o antibiótico ampicilina em sua CIM, e para o controle negativo foi utilizado meio MH com a formulação tópica (50 mg/mL) que não continha os óleos essenciais. Os testes foram realizados em triplicata biológica.

#### 4.13. CBM das formulações tópicas

A CBM das formulações tópicas foi determinada de acordo com Mah (2014), com modificações. Em uma microplaca 96-poços, foram adicionados 100 µL de meio MH, juntamente com 100 µL de uma solução das formulações tópicas na qual os óleos essenciais estivessem em concentração de 40 mg/mL e, posteriormente, realizadas 11 diluições seriadas: 10 mg/mL a 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, volumes de 1,5 µL foram inoculados em placa de Petri contendo meio MH-ágar. 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. A CBM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano nos inóculos transferidos para a placa de Petri. Para controle positivo foi utilizado o antibiótico ampicilina em sua CIM, e para o controle negativo foi utilizado meio MH com a formulação tópica (50 mg/mL) que não continha os óleos essenciais. Os testes foram realizados em triplicata biológica.

#### **4.14. Avaliação da atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme pré-formado**

A avaliação da atividade das formulações tópicas no biofilme pré-formado foi realizada com metodologia proposta por Klein e colaboradores (2015), com modificações. Para isso, o isolado foi inoculado em microplacas de 96-poços como descrito no tópico 4.6. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado lentamente e 200 µL de solução contendo meio MH juntamente com as formulações tópicas, com os óleos essenciais diluídos, 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, ao final desse período, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os poços lavados duas vezes com água destilada. A coloração com cristal violeta e a leitura de absorbância ocorreram como descritos no tópico 4.6. Os experimentos ocorreram em triplicata biológica, sendo o resultado final a média dessas repetições. Os dados foram submetidos a 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 ( $P \leq 0.05$ ).

#### **4.15. Avaliação da atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme em formação**

A análise da atividade das formulações tópicas no biofilme em formação foi realizada de acordo com O'Toole (2011), com modificações. Inicialmente, 100 µL de meio MH foram adicionados em cada poço de uma microplaca 96 poços. As formulações tópicas foram diluídas em meio MH a fim de gerar a solução com a concentração desejada dos óleos essenciais. A partir dos valores de CIM, foram utilizadas as seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM, 1/4xCIM e 1/8xCIM. Posteriormente, 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 população de  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados em cada poço e a microplaca incubada durante 24 horas a 37 °C. 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 % m/v foram adicionados em cada poço, e a placa incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, o cristal violeta foi retirado e a placa novamente lavada com água destilada com o objetivo de retirar o excesso do corante. Para a quantificação do biofilme, 250 µL de ácido acético 33 % v/v foram adicionados em cada poço. Após 10 minutos em contato com o cristal violeta do biofilme, 150 µL da solução foram retirados e transferidos para uma nova microplaca de 96 poços. As leituras de

absorbância ocorreram em D.O.<sub>570nm</sub>. Meio MH com a formulação tópica (50 mg/mL) sem os óleos essenciais foi utilizado como controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata biológica, e o resultado final foi a média das repetições. Os dados foram submetidos à 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 ( $P \leq 0.05$ ).

#### **4.16. Citotoxicidade das formulações tópicas em eritrócitos humanos**

As análises de citotoxicidade em eritrócitos humanos foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Nacif-Marçal e colaboradores (2015), com modificações, sendo utilizados eritrócitos de um doador voluntário saudável, com tipo sanguíneo A+. Para isso, 4 mL de sangue humano foram retirados à vácuo em um tubo contendo anticoagulante. O tubo foi centrifugado a 2.500 rpm durante 10 minutos, o plasma retirado e as hemácias lavadas com 4 mL de tampão fosfato-salino (PBS). Este procedimento foi repetido por quatro vezes. Inicialmente, 100  $\mu$ L de PBS foram adicionados em uma microplaca de 96-poços. Posteriormente, foram plaqueados 100  $\mu$ L de solução das formulações tópicas, em PBS e realizada as diluições seriadas com as seguintes concentrações finais dos óleos essenciais: 16xCIM – 1/8xCIM. Na sequência, foram adicionados em cada poço, 100  $\mu$ L de uma suspensão de eritrócitos a 2 % em PBS. As microplacas foram incubadas durante 45 minutos a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse período, 100  $\mu$ L da suspensão foram transferidas para outra microplaca e a absorbância dos poços foi analisada em espectrofotômetro a D.O.<sub>540nm</sub>. Foi preparado um controle contendo apenas a formulação tópica sem o óleo essencial e sem as hemácias, para realizar a subtração das absorbâncias, devido à turbidez da formulação. Como controle negativo, foi utilizada uma suspensão de eritrócitos com solução de PBS. Como controle positivo, foi utilizada uma solução 1 % v/v de Triton X-100. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o controle negativo pelo teste de Dunnett ( $P \leq 0.05$ ) e entre eles pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

#### **4.17. Toxicidade *in vivo* utilizando *Galleria mellonella* como modelo animal**

As análises de toxicidade utilizando a larva *Galleria mellonella* foram conduzidas segundo procedimento descrito por Pereira e colaboradores (2015), com modificações. A larva *G. mellonella* tem sido amplamente utilizada para experimentos de toxicidade por ter mecanismos do sistema imune que se assemelham aos de mamíferos, e pela fácil distinção da

relação vida/morte do indivíduo (Trevijano-Contador & Zaragoza, 2019; Piatek et al., 2020). Inicialmente, foram escolhidas aleatoriamente, dez larvas saudáveis para cada formulação tópica, que não foram utilizadas em experimentos anteriores pesando aproximadamente 275 mg. Estas foram isoladas em placas de Petri de vidro.

As formulações tópicas foram solubilizadas em PBS para CIM de cada óleo essencial. Posteriormente, 25 µL das soluções foram injetados em cada larva, de modo que cada larva recebesse esse valor relacionado com seu peso corporal.

As larvas ficaram mantidas a 37 °C no escuro e monitoradas em relação ao seu comportamento e sobrevivência a cada 24 horas durante quatro dias. Para o controle negativo foram utilizadas dez larvas inoculadas com a formulação tópica (50 mg/mL) na qual não continha os óleos essenciais, diluídas em PBS. Os dados foram submetidos à 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 ( $P \leq 0.05$ ).

#### **4.18. Cinética de crescimento bacteriano na presença das formulações tópicas**

As seguintes análises do crescimento do isolado MRSA-USA300 foram realizadas de acordo com protocolo proposto por Yano e colaboradores (1998), com modificações. Inicialmente, para construir a curva de crescimento do isolado MRSA-USA300, a bactéria foi inoculada em um erlenmeyer de vidro contendo meio MH. Deixada em agitação a 180 rpm e a 37 °C até que atingisse a D.O.<sub>570nm</sub> de 0.5, contendo, aproximadamente, uma população de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente, foram feitas diluições para se atingir as D.Os.<sub>570nm</sub> de 0.01, 0.1 e 0.2. Em uma microplaca de 96-poços, 200 µL de bactéria nas diferentes concentrações foram adicionadas aos poços. A placa foi incubada em um espectrofotômetro, a 37 °C, durante 24 horas. Durante este tempo, a placa passava por períodos de 15 minutos, sendo 10 minutos em estagnação e 5 minutos de agitação constante, com posterior leitura de D.O.<sub>600nm</sub>. Por fim, os dados de absorbância foram coletados para que a curva de crescimento, contendo as principais fases fosse descrita, em especial a metade da fase *log*, em que foram adicionadas as formulações tópicas. Para observar o comportamento do crescimento bacteriano na presença das formulações tópicas, estas foram diluídas com meio MH na concentração de 2xCIM dos óleos essenciais. Em seguida, 100 µL dessas soluções foram adicionadas aos poços juntamente com 100 µL da bactéria na concentração do dobro da absorbância encontrada como sendo a metade da fase exponencial. Neste caso, tanto a concentração das formulações quanto a concentração da bactéria reduziram pela metade, ao ponto em que o experimento poderia ser analisado. A

placa foi incubada em um espectrofotômetro, a 37 °C, durante 17 horas. Durante este tempo, a placa passava por períodos de 15 minutos, sendo 10 minutos em estagnação e 5 minutos de agitação constante, com posterior leitura de D.O.<sub>600nm</sub>. Um controle contendo apenas a formulação tópica com meio MH foi feito para que o valor da absorbância da turbidez fosse retirado do cálculo final. Os valores de D.O.<sub>600nm</sub> foram plotados em um gráfico e a curva analisada em relação ao tempo.

## **5. RESULTADOS**

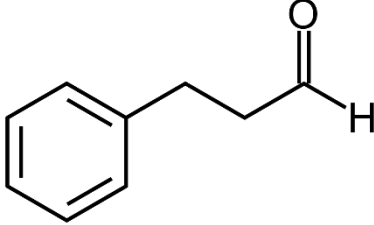
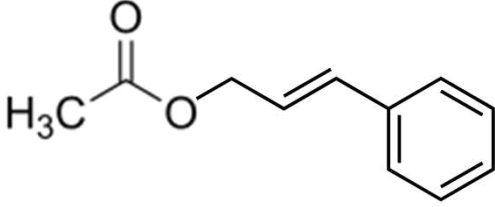
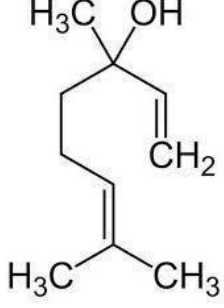
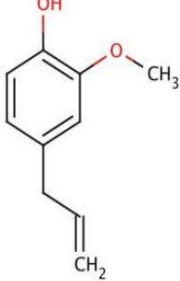
### **5.1. Óleos essenciais com atividade antibacteriana contra MRSA-USA300**

Dentre os dezenove óleos essenciais analisados, quatro demonstraram atividade antibacteriana contra MRSA-USA300 na concentração de 10 mg/mL, sendo eles: canela, coentro, cravo e tangerina. Os quatro óleos foram selecionados para futuras análises.

### **5.2. Cromatografia gasosa dos óleos essenciais ativos**

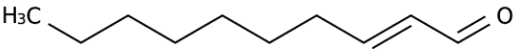
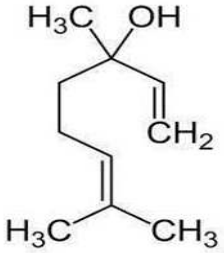

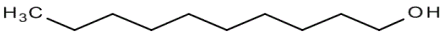
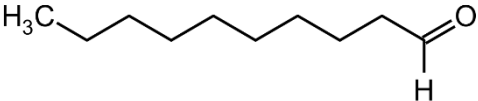
A análise de cromatografia gasosa dos quatro óleos ativos revelou que a constituição dos óleos é variável de um a três componentes majoritários e uma maior quantidade de compostos em concentração traço (Figura 7 a 10).

Figura 7 – Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de canela.

Nome e estrutura química	Concentração (%)
 <p data-bbox="507 719 687 752">Cinamaldeído</p>	69,6
 <p data-bbox="459 1043 719 1077">Acetato de cinamila</p>	6,6
 <p data-bbox="544 1440 639 1473">Linalol</p>	5,8
 <p data-bbox="531 1771 647 1805">Eugenol</p>	4,9

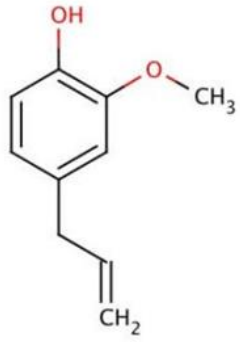
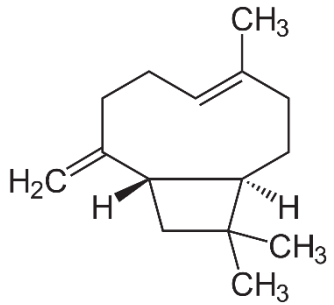
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 48

Figura 8 - Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de coentro.

Nome e estrutura química	Concentração (%)
 <p style="text-align: center;">Decenal</p>	25,7
 <p style="text-align: center;">Linalol</p>	20,8
 <p style="text-align: center;"><i>trans</i>-dodecanol</p>	16,5
 <p style="text-align: center;">Decanol</p>	10,9
 <p style="text-align: center;">Decanal</p>	15,4

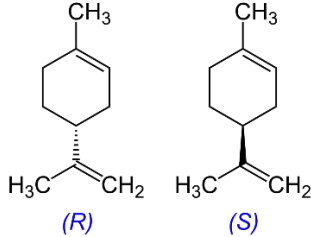
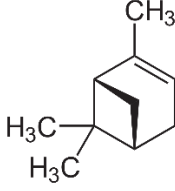
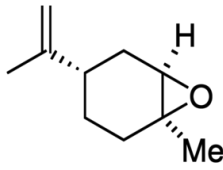
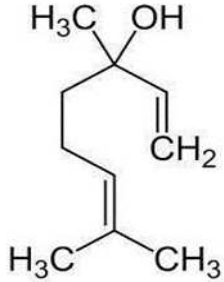
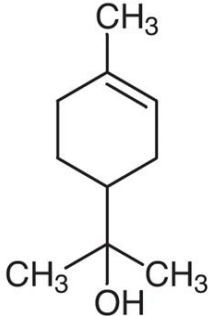
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 49

Figura 9 - Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de cravo.

Nome e estrutura química	Concentração (%)
 <p data-bbox="526 862 646 907">Eugenol</p>	69,6
 <p data-bbox="502 1254 678 1288"><math>\beta</math>-Cariofileno</p>	6,6

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 50

Figura 10 - Componentes majoritários encontrados no óleo essencial de tangerina.

Nome e estrutura química	Concentração (%)
 <p style="text-align: center;">Limoneno</p>	60,4
 <p style="text-align: center;"><math>\alpha</math>-pineno</p>	$\alpha$ -Pineno = 3,6 $\beta$ -Pineno = 3,2
 <p style="text-align: center;"><i>cis</i>-óxido de limoneno</p>	<i>cis</i> -óxido de limoneno = 6,8 <i>trans</i> -óxido de limoneno = 6,5
 <p style="text-align: center;">Linalol</p>	2,8
 <p style="text-align: center;">Terpineol</p>	6,0

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 51

### 5.3 CIM e CBM dos óleos essenciais ativos em MRSA-USA300

Os resultados da CIM e da CBM dos quatro óleos essenciais ativos em MRSA-USA300 estão presentes na Tabela 3. Os valores de CIM e CBM foram iguais para todos os óleos e as concentrações variaram de 10 mg/mL (Tangerina e cravo) a 1,25 mg/mL (Coentro).

Tabela 3 - Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) dos quatro óleos essenciais em MRSA-USA300.

Óleos essenciais	MRSA-USA300	
	CIM*	CBM**
Canela	2,5	2,5
Coentro	1,25	1,25
Tangerina	10	10
Cravo	10	10

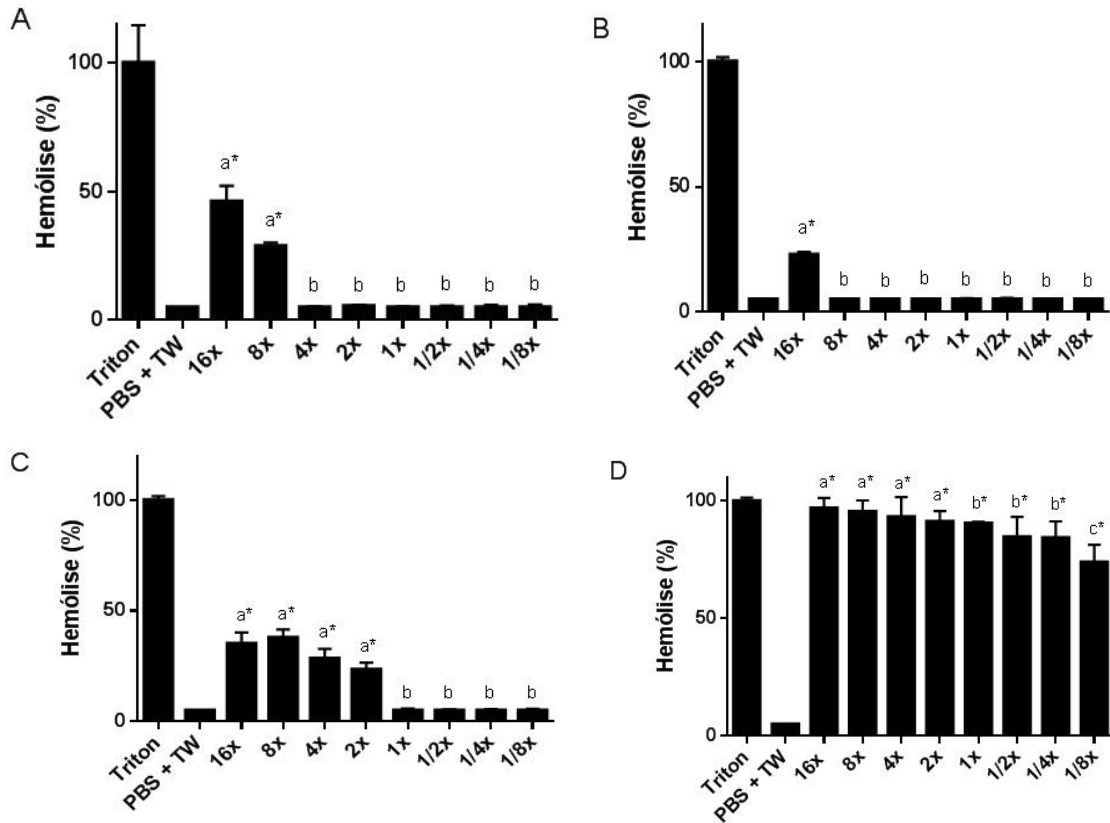
\*CIM: Concentração inibitória mínima. \*\*CBM: Concentração bactericida mínima

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 52

### 5.4. Citotoxicidade em eritrócitos

Os gráficos contendo os resultados da análise de citotoxicidade em eritrócitos estão presentes na Figura 11. Os óleos de canela e coentro foram os que apresentaram menor percentual de hemólise nas diferentes concentrações analisadas. Sendo o óleo de coentro, diferindo apenas do controle negativo na concentração de 16xCIM. Por outro lado, o óleo de tangerina foi responsável por causar hemólise em todas as concentrações analisadas.

Figura 11 - Resultados da análise de hemólise (%). **A** – Óleo essencial de canela. **B** – Óleo essencial de coentro. **C** – Óleo essencial de cravo. **D** – Óleo essencial de tangerina. Triton – Controle positivo (100 % hemólise). PBS + TW – Controle negativo, contendo solução de PBS com Tween 80. \* - Significativo em relação ao controle negativo (considerado como 0 % de hemólise; Dunnett  $p < 0,05$ ). Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey a 5 %.



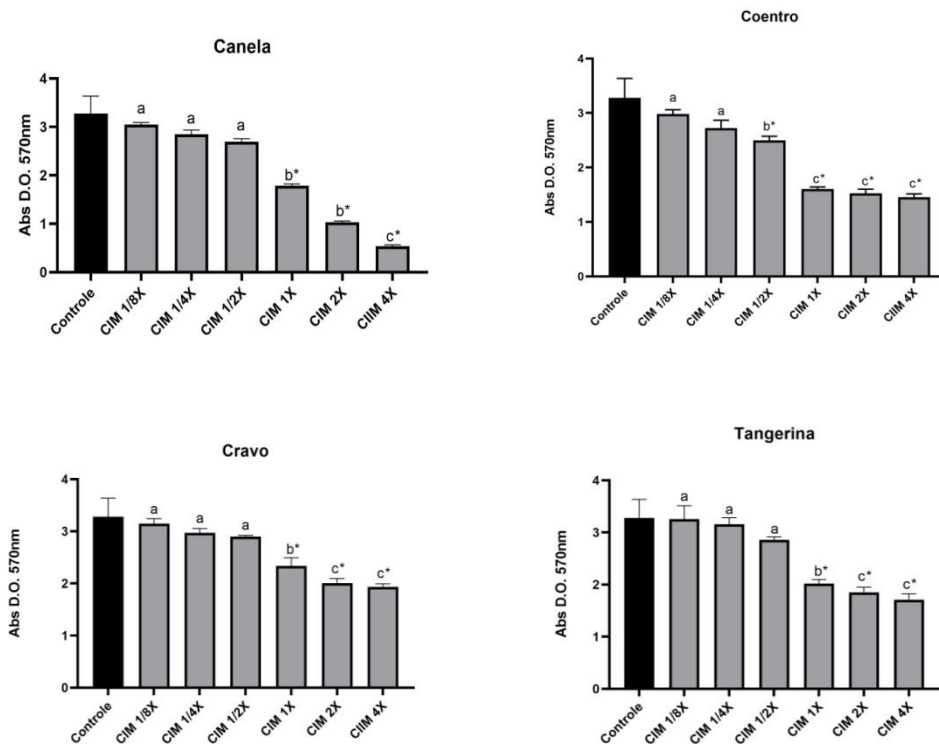
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 53

### 5.5. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme pré-formado

O isolado MRSA-USA300 foi considerado como um forte formador de biofilme por critérios estabelecidos por Stepanović e colaboradores (2007) e a quantificação do seu biofilme está exposta no controle positivo dos próximos experimentos. Os resultados em percentual do rompimento do biofilme nos isolados, pela utilização dos óleos essenciais estão representados na Tabela 4. Os resultados gráficos das análises dos óleos essenciais nos biofilmes pré-formados dos isolados selecionados estão presentes na Figura 12. Todos os quatro óleos essenciais foram capazes de romper o biofilme pré-formado em concentrações CIM e supra-CIM (2x e 4x), quando comparados com o controle positivo. O óleo essencial de coentro foi o único capaz de romper o biofilme em um valor sub-CIM (1/2x), sendo o rompimento igual a 23,84 %. O óleo

essencial de canela apresentou o valor mais alto no rompimento do biofilme, este na concentração de 4xCIM (83,64 %).

Figura 12 - Avaliação da atividade dos óleos essenciais no biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 54

Tabela 4 - Percentual do rompimento do biofilme pré-formado de MRSA-USA300, pelos óleos essenciais.

Óleos essenciais	MRSA-USA300					
	4xCIM	2xCIM	1xCIM	1/2xCIM	1/4xCIM	1/8xCIM
Canela	83,64 %	68,57 %	45,62 %	-	-	-
Coentro	55,57 %	53,52 %	51,03 %	23,84 %	-	-
Cravo	41,02 %	38,85 %	28,75 %	-	-	-
Tangerina	47,84 %	43,58 %	38,37 %	-	-	-

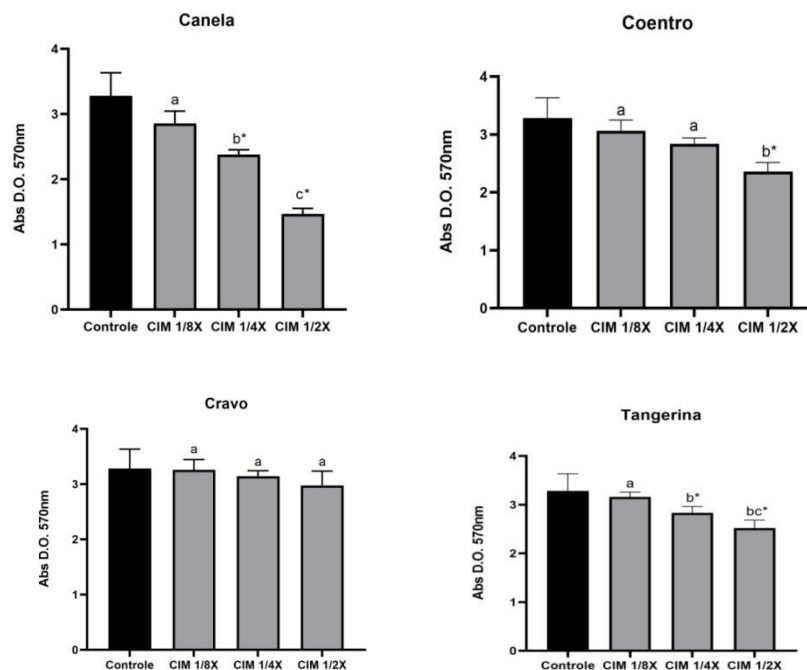
- Não significativo em relação ao controle positivo.

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 54

### 5.6. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais frente ao biofilme em formação

Os resultados em percentual de inibição do biofilme em formação estão representados na Tabela 5. Os resultados gráficos das análises dos óleos essenciais nos biofilmes pré-formados estão presentes na Figura 13. Os óleos essenciais de canela e o de tangerina, nas concentrações de 1/2xCIM e 1/4xCIM, foram capazes de inibir a formação de biofilme do isolado, sendo o primeiro óleo mais eficiente com 55,30 % de inibição na maior concentração. O óleo essencial de coentro, capaz de romper o biofilme pré-formado na concentração 1/2xCIM, apresentou capacidade de inibir a formação do biofilme nesta mesma concentração (28,12 %). O óleo essencial de cravo não apresentou resultados significativos na inibição da formação do biofilme em nenhuma das concentrações analisadas.

Figura 13 - Avaliação da atividade dos óleos essenciais na inibição do biofilme em formação do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 55

Tabela 5 – Percentual da inibição do biofilme em formação de MRSA-USA300, pelos óleos essenciais.

Óleos essenciais	MRSA-USA300		
	1/2xCIM	1/4xCIM	1/8xCIM
Canela	55,30 %	27,49 %	-
Coentro	28,12 %	-	-
Cravo	-	-	-
Tangerina	27,13 %	13,57 %	-

- Não significativo em relação ao controle positivo.

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 56

### 5.7. CIM de antibióticos comerciais

Os resultados da CIM dos antibióticos ampicilina e tetraciclina em MRSA-USA300 estão presentes na Tabela 6. A placa de 96-poços demonstrando a CIM de ambos os antibióticos está evidenciada na Figura 14. Os valores de CIM foram semelhantes para ambos os antibióticos (64  $\mu\text{g/mL}$ ).

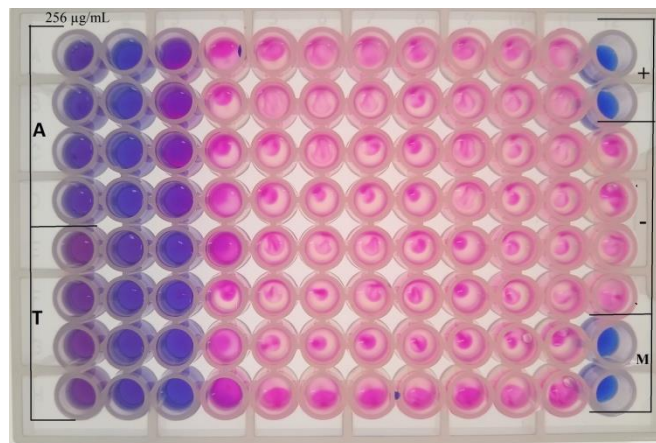
Tabela 6 - Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da ampicilina e tetraciclina em MRSA-USA300.

Antibióticos	MRSA-USA300
	CIM*
Ampicilina	64 $\mu\text{g/mL}$
Tetraciclina	64 $\mu\text{g/mL}$

\*CIM: Concentração inibitória mínima.

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 57

Figura 14 - Ensaio de CIM contendo ampicilina (A) e tetraciclina (T). Ambos apresentaram a CIM de 64  $\mu\text{g/mL}$ . +: Controle positivo. -: Controle negativo. M: Controle de meio.



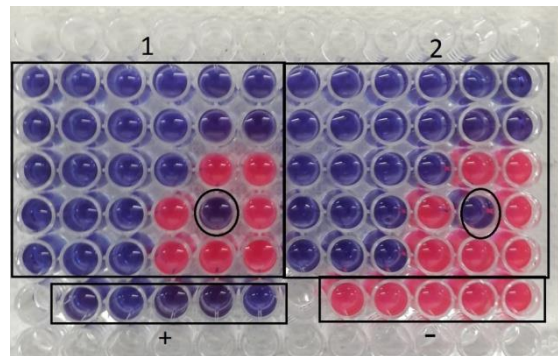
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 57

### 5.8. Sinergismo

Os resultados das análises do sinergismo em MRSA-USA300 estão presentes na Tabela 7. A placa de 96-poços demonstrando o sinergismo entre o óleo de canela e o antibiótico ampicilina está presente na Figura 15. Os óleos essenciais de canela e coentro, em combinação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina apresentaram um  $\Sigma\text{CIF}$  menor do que 0,5. Este

resultado evidencia o sinergismo da união do óleo essencial com o antibiótico analisado. Por outro lado, a união dos óleos de canela e coentro, assim como os demais óleos essenciais com os antibióticos apresentou um  $\Sigma$ CIF de  $\cong 4$ , apresentando um resultado indiferente.

Figura 15 - Ensaio de sinergismo contendo o óleo de canela (diluição na vertical) e o antibiótico ampicilina (diluição na horizontal). A marca circular apresenta as diluições em que houve o sinergismo. 1 – Primeira replicata técnica. 2 – Segunda replicata técnica. +: Controle positivo. -: Controle negativo.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 58

Tabela 7 - Valores de  $\Sigma$ CIF dos compostos analisados em MRSA-USA300, com a sua conclusão referente a atividade sinérgica.

<b>Composto 1</b>	<b>Composto 2</b>	<b><math>\Sigma</math>CIF</b>	<b>Conclusão</b>
Canela	Ampicilina	0,49	Sinergismo
Canela	Tetraciclina	0,49	Sinergismo
Coentro	Ampicilina	0,49	Sinergismo
Coentro	Tetraciclina	0,49	Sinergismo
Cravo	Ampicilina	$\cong 4$	Indiferente
Cravo	Tetraciclina	$\cong 4$	Indiferente
Tangerina	Ampicilina	$\cong 4$	Indiferente
Tangerina	Tetraciclina	$\cong 4$	Indiferente
Canela	Coentro	$\cong 4$	Indiferente
Cravo	Canela	$\cong 4$	Indiferente
Canela	Tangerina	$\cong 4$	Indiferente
Cravo	Tangerina	$\cong 4$	Indiferente
Coentro	Tangerina	$\cong 4$	Indiferente
Cravo	Coentro	$\cong 4$	Indiferente

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 59

### 5.9. Preparação das formulações tópicas

Os óleos essenciais de canela e coentro foram selecionados para serem incorporados em formulações tópicas na consistência de um gel dérmico. Estes óleos apresentaram as menores CIM e CBM além de que sua toxicidade para eritrócitos humanos foi reduzida.

### 5.10. CIM e CBM das formulações tópicas em MRSA-USA300

Os resultados da CIM e da CBM das duas formulações tópicas em MRSA-USA300 estão presentes na Tabela 8. Os resultados da CIM realizados em microplaca 96-poços estão presentes na Figura 16. A imagem da placa de Petri com o resultado da CBM está presente na Figura 17. Os valores de CIM e CBM foram iguais para ambos os óleos e as concentrações variaram de 2,5 mg/mL (Canela) a 1,25 mg/mL (Coentro). Estes resultados são semelhantes aos de quando se analisou apenas os óleos essenciais sem estarem em formulação.

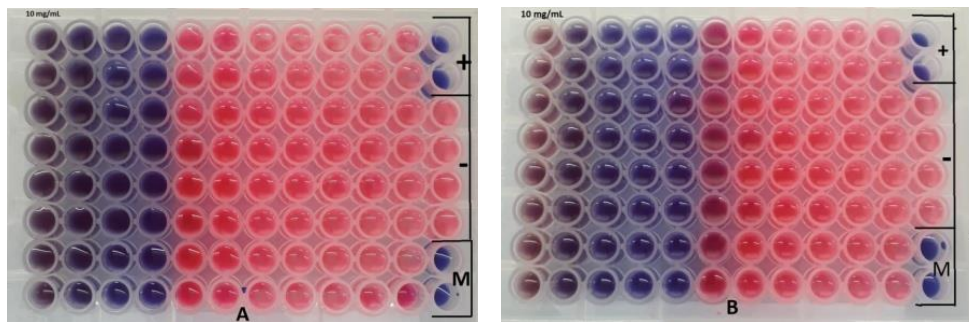
Tabela 8 - Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) das formulações tópicas MRSA USA300.

Formulações	MRSA-USA300	
	CIM*	CBM**
Óleo de canela	2,5	2,5
Óleo de coentro	1,25	1,25

\*CIM: Concentração inibitória mínima; \*\*CBM: Concentração bactericida mínima

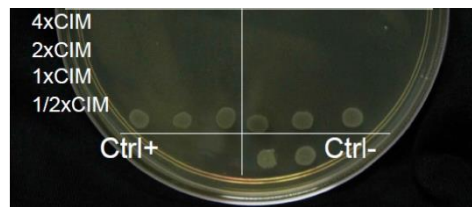
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 60

Figura 16 - Ensaio de CIM das formulações tópicas para o isolado MRSA-USA300. Óleo na placa A: Canela. Óleo na placa B: Coentro. Primeira coluna contendo a concentração de 10 mg/mL. +: Controle positivo (Ampicilina) -: Controle negativo. M: Controle de meio contendo meio MH.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 60

Figura 17 - Resultado da CBM utilizando quatro concentrações (4xCIM a 1/2xCIM) das formulações tópicas. Cada quadrante da placa de Petri recebeu um tratamento com uma formulação diferente. Ctrl+: Controle positivo. Ctrl-: Controle negativo.

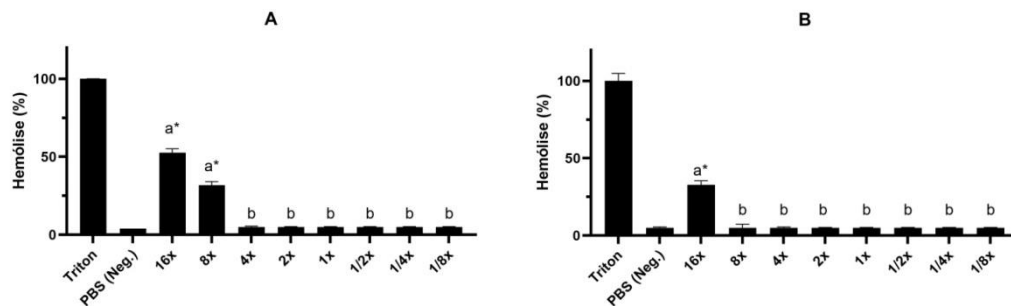


Fonte: Rodrigues, 2022, p. 60

### 5.11. Citotoxicidade das formulações tópicas em eritrócitos humanos

Os gráficos contendo os resultados da análise de citotoxicidade das formulações tópicas em eritrócitos humanos estão presentes na Figura 18. As formulações tópicas contendo os dois óleos essenciais apresentaram resultados semelhantes aos da análise anterior, apenas com os óleos essenciais. A formulação contendo o óleo de canela apresentou resultado significativo de hemólise em concentrações de 16xCIM e 8xCIM. A formulação contendo o óleo essencial de coentro causou hemólise nos eritrócitos humanos apenas na concentração máxima de 16xCIM.

Figura 18 - Resultados da análise de hemólise (%). **A** – Formulação tópica contendo o óleo de canela. **B** – Formulação tópica contendo o óleo de coentro. Triton – Controle positivo (100 % hemólise). PBS (Neg.) – Controle negativo, contendo solução de PBS com a formulação sem óleos essenciais. \* - Significativo em relação ao controle negativo – considerado como 0 % de hemólise (Dunnett  $p < 0,05$ ). Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey a 5 %.

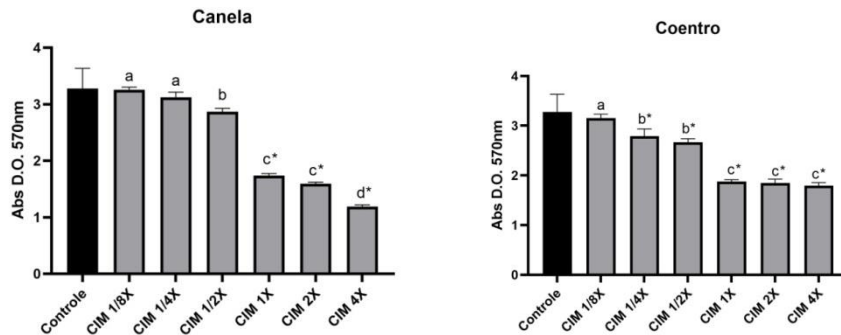


Fonte: Rodrigues, 2022, p. 61

### 5.12. Atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme pré-formado

Os resultados em percentual do rompimento do biofilme nos isolados, pela utilização das formulações tópicas contendo os óleos essenciais estão representados na Tabela 9. Os resultados gráficos das análises no biofilme pré-formado do isolado selecionado estão presentes na Figura 19. A formulação tópica contendo o óleo essencial de canela foi capaz de romper o biofilme pré-formado na concentração CIM e nas supra-CIM, semelhante ao observado na análise com os óleos essenciais. A concentração 4xCIM deste óleo foi capaz de romper em 63,76 % o biofilme pré-formado em relação ao controle. A formulação tópica contendo o óleo essencial de coentro apresentou resultado semelhante no rompimento do biofilme pré-formado. Concentrações sub-CIM (1/4x e 1/2x) foram capazes de romper o biofilme em 14,95 % e 18,77 %, respectivamente.

Figura 19 - Avaliação da atividade das formulações tópicas no biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 62

Tabela 9 - Percentual do rompimento do biofilme pré-formado de MRSA-USA300, pelas formulações tópicas.

Óleos essenciais	MRSA-USA300					
	4xCIM	2xCIM	1xCIM	1/2xCIM	1/4xCIM	1/8xCIM
Canela	63,76 %	51,46 %	47,09 %	-	-	-
Coentro	45,27 %	43,69 %	42,77 %	18,77 %	14,95 %	-

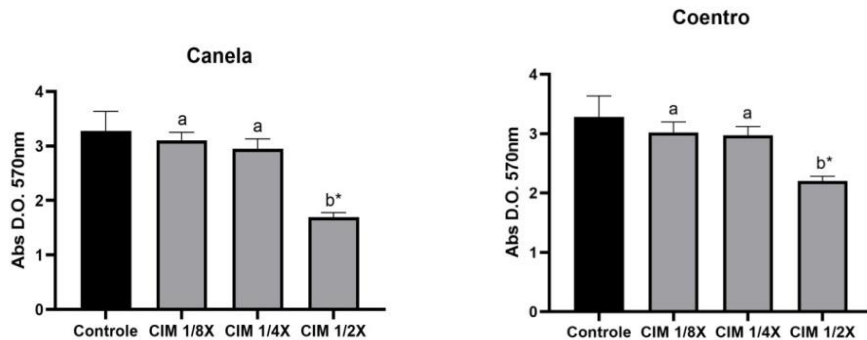
- Não significativo em relação ao controle positivo.

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 62

### 5.13. Atividade antibiofilme das formulações tópicas frente ao biofilme em formação

Os resultados em percentual de inibição do biofilme em formação estão representados na Tabela 10. Os resultados gráficos das análises das formulações tópicas nos biofilmes em formação do isolado estão presentes na Figura 20. As formulações tópicas contendo os óleos de canela e o de coentro, nas concentrações de 1/2xCIM, foram capazes de inibir a formação de biofilme do isolado, sendo a primeira formulação com uma eficiência de 48,41 % e o segundo de 32,87 %. Estes resultados apresentam semelhança com os observados quando os óleos essenciais foram analisados sem estarem em formulações tópicas.

Figura 20 - Avaliação da atividade das formulações tópicas na inibição do biofilme em formação do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 63

Tabela 10 - Percentual da inibição do biofilme em formação de MRSA-USA300, pelas formulações tópicas.

Óleos essenciais	MRSA-USA300		
	1/2xCIM	1/4xCIM	1/8xCIM
Canela	48,41 %	-	-
Coentro	32,87 %	-	-

- Não significativo em relação ao controle positivo.

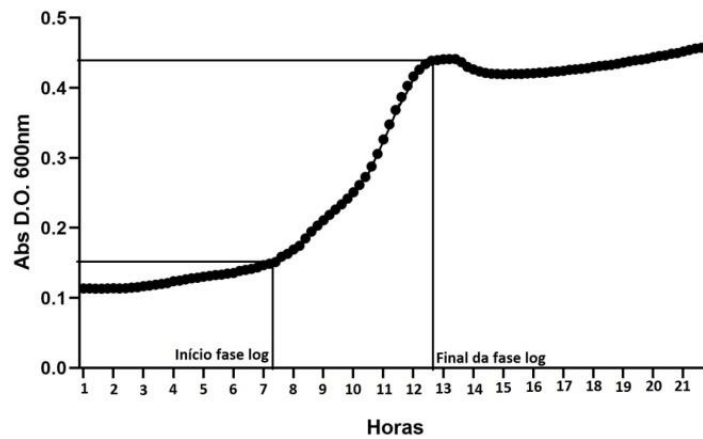
Fonte: Rodrigues, 2022, p. 63

#### 5.14. Cinética de crescimento bacteriano na presença das formulações tópicas

Os resultados gráficos das análises das formulações tópicas no crescimento do isolado MRSA-USA300 estão presentes nas Figuras 21 e 22. A Figura 21 representa a curva de crescimento do isolado em microplacas com meio MH, durante 24 horas. A fase *log* se inicia após as 7 horas de crescimento e finaliza próximo das 13 horas. Utilizando estes dados, foi estabelecida a metade da fase *log* como sendo o momento em que a D.O.<sub>600nm</sub> é de 0,3. A partir deste valor, as formulações tópicas, contendo os óleos essenciais foram adicionadas juntamente com a bactéria, e o resultado da curva está presente na Figura 22. Ambas as formulações apresentaram características bactericidas ao reduzir a população bacteriana aferida pela D.O.<sub>600nm</sub>. A formulação contendo o óleo de canela reduziu a população bacteriana até aproximadamente a sétima hora da análise. A partir deste momento, a população bacteriana

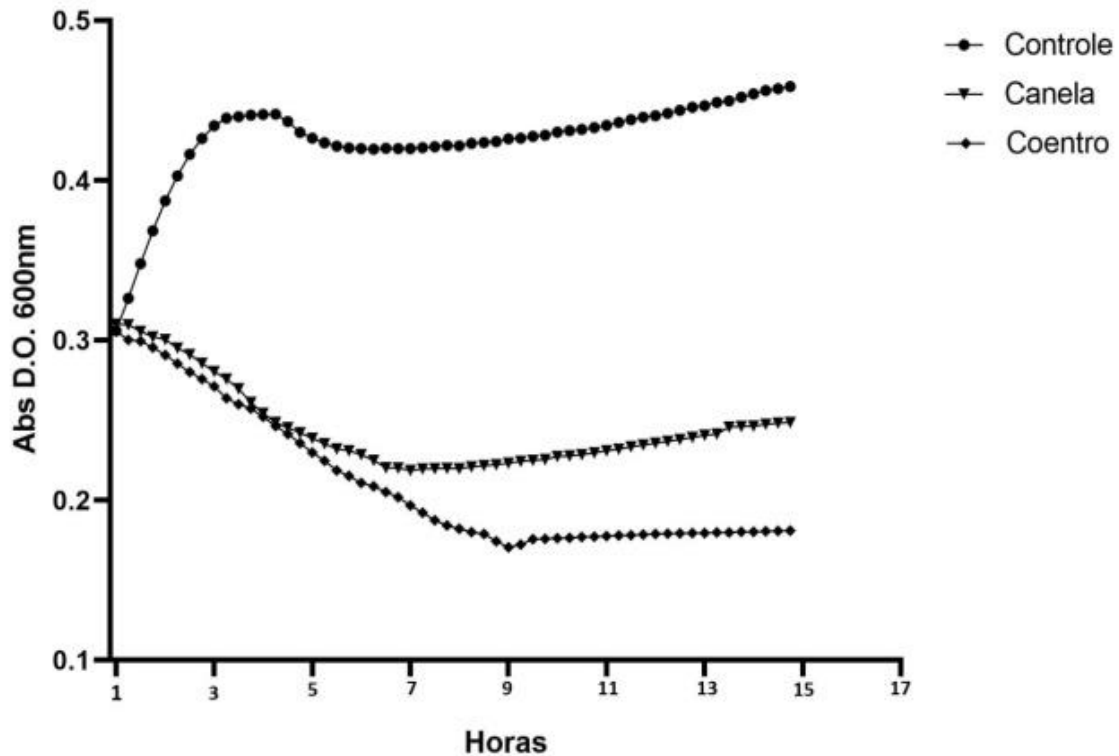
estabilizou-se e apresentou uma leve alta nas horas seguintes. Em comparação, a formulação contendo o óleo de coentro apresentou uma redução maior na população bacteriana, tendo sua maior taxa de morte observada perto da nona hora de análise. Após este momento, semelhante ao que ocorreu com a formulação com o óleo de canela, a população bacteriana se estabilizou.

Figura 21 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 24 horas. O início e o final da fase *log* foram calculados e adicionados ao gráfico.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 64

Figura 22 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 17 horas na presença das formulações tópicas contendo os óleos essenciais nas concentrações CIM.

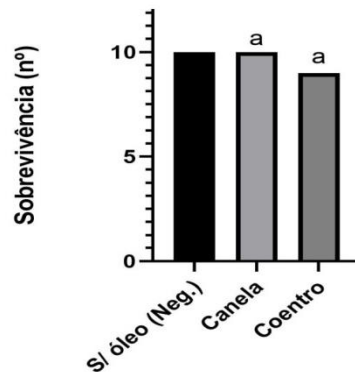


Fonte: Rodrigues, 2022, p. 65

### 5.15. Toxicidade *in vivo* utilizando *Galleria mellonella* como modelo animal

Os resultados gráficos das análises de toxicidade em *G. mellonella* estão apresentados na Figura 23. As imagens de larvas vivas e mortas estão presentes na Figura 24. Após 96 horas de observação, todas as dez larvas que receberam a diluição contendo o controle (sem óleos) e as que receberam a formulação com o óleo de canela estavam vivas e saudáveis, sem indícios de melanização. O tratamento com a formulação contendo o óleo de coentro causou a morte de um indivíduo. Entretanto, esta morte isolada pode ter ocorrido por motivos como a perfuração acidental de algum órgão no momento da aplicação, ou a larva não estava totalmente saudável no início do experimento. Ademais, os resultados demonstram que, na concentração CIM, não houve toxicidade das formulações tópicas nas larvas de *G. mellonella*.

Figura 23 - Sobrevivência (em quantidade de larvas) de *G. mellonella*, após 96 horas na presença das formulações tópicas contendo os óleos essenciais nas concentrações CIM. S/ óleo (Neg.) – Concentração CIM da formulação tópica na qual não contém os óleos essenciais. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 66

Figura 24 - Larvas de *G. mellonella* na comparação de vida e morte. **A** – Larva viva e saudável. **B** – Larva morta e melanizada



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 66

## 6. DISCUSSÃO

A prospecção e o desenvolvimento de novas substâncias com potencial antibacteriano vêm se tornando fundamental à resistência bacteriana (WHO, 2018). Os óleos essenciais tem-se apresentado promissores no combate a essas bactérias. Dos dezenove óleos essenciais analisados no presente trabalho, quatro foram eficazes contra o isolado MRSA-USA300: canela, coentro, cravo e tangerina. Estudos anteriores relataram a atividade desses óleos essenciais em diversas espécies bacterianas. Chao e colaboradores (2008) relataram setenta e oito óleos essenciais com atividade de inibição contra MRSA. O óleo essencial de canela apresentou atividade contra isolados de *S. aureus* e *Escherichia coli* (Unlu et al., 2010) assim como o óleo de coentro em *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Xanthomonas campestris* (Lo Cantore et al., 2004; Matasyoh et al., 2009). O óleo essencial de cravo apresentou atividade contra *Staphylococcus epidermidis* e isolados de MRSA (Palombo & Semple, 2002). Por fim, o óleo essencial de tangerina apresentou atividade contra *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* (Viuda-Martos et al., 2008). A similaridade entre a CIM e a CBM evidenciou a característica bactericida dos óleos. Zhang e colaboradores (2016) relataram a CIM do óleo de canela em *S. aureus*, como sendo de 1 mg/mL. Pesquisas anteriores relataram os óleos essenciais contendo características bactericidas (Friedman et al., 2002). Essas atividades estão relacionadas com os componentes presentes na mistura do óleo essencial. A análise cromatográfica elucidou componentes majoritários e traços, tendo predominância moléculas da classe dos terpenos e fenilpropanoides. O eugenol, composto majoritário do óleo de cravo, é um fenilpropanoide que possui atividade antibacteriana (Das et al., 2016; Niu et al., 2019). Esse componente, por ter característica hidrofóbica, interage com a bicamada lipídica de bactérias, causando um aumento da permeabilidade e levando à morte do organismo (Gill & Holley, 2006; Devi et al., 2010). O cinamaldeído é um fenilpropanoide, sendo o composto majoritário do óleo essencial de canela e que apresenta característica antibacteriana (Shen et al., 2015). Este composto pode desestabilizar a parede celular, gerando estresse osmótico e, por fim, levando ao rompimento da célula (Gill & Holley, 2004). Outros componentes dos óleos, principalmente os fenólicos, possuem afinidade por compostos hidrofóbicos da bicamada lipídica. Essa interação pode desestabilizar os lipídeos da bicamada e aumentar a permeabilidade de membrana (Singh et al., 2002; Oyedemi et al., 2009). Esses compostos podem, adicionalmente, desnaturar enzimas citoplasmáticas, afetar o processo de respiração celular e impedir a divisão celular (Sacchetti et al., 2005).

Por outro lado, os óleos essenciais são geralmente reconhecidos como seguros (em inglês “GRAS”) para as células de mamíferos (FDA, 2016). Essa característica faz com que eles sejam amplamente utilizados na indústria de alimentos e aromaterapia (Setzer, 2009; Prakash et al, 2015). A análise de citotoxicidade em eritrócitos humanos evidenciou a segurança dos óleos essenciais, exceto o óleo essencial de tangerina. Duarte e colaboradores (2012), analisando o óleo essencial de coentro observaram que, em pequenas concentrações (1 e 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), o percentual de hemólise era baixa (6 % a 10 %, respectivamente). Entretanto, ao aumentar a concentração para 32  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , os autores observaram que o percentual de hemólise passou a ser de 46 %. Resultado semelhante com o presente estudo, confirmando que, com o aumento da concentração dos óleos essenciais, o percentual de hemólise poderá se elevar. Barros e colaboradores (2016) analisaram a concentração de 0,2 mg/mL do óleo essencial de canela e observaram o percentual de hemólise na faixa de 3 %. Na concentração do óleo de canela em 1/8xCIM (0,31 mg/mL) não houve diferença significativa em relação ao controle negativo, no presente estudo, evidenciando um baixo percentual de hemólise. Entretanto, foi observado que o aumento da concentração dos óleos essenciais elevou o percentual de hemólise. Esse fenômeno pode estar relacionado com a interação entre as moléculas do óleo essencial e os lipídeos da membrana dos eritrócitos. Os componentes dos óleos essenciais podem interagir com os fosfolipídios da membrana plasmática, desestabilizando a bicamada lipídica (Taib et al., 2009). Decorrente disto, podem ocorrer alterações na morfologia celular e o aumento na permeabilidade de membrana, desencadeando a lise do eritrócito (Barros et al, 2016).

O óleo essencial de tangerina foi responsável por causar uma alta citotoxicidade em eritrócitos. Aparentemente, esse é o primeiro estudo que observou a citotoxicidade do óleo de tangerina em eritrócitos humanos. Este óleo possui como composto majoritário o limoneno (60,4 %). Mendanha e colaboradores (2013) observaram que o limoneno não foi tóxico para os eritrócitos. Entretanto, o componente terpineol, presente na concentração traço (6,0 %), é capaz de formar ligações de hidrogênio, sendo capaz de causar a lise (Jain et al., 2002). Mendanha e colaboradores (2013) observaram que o terpineol, mesmo em baixas concentrações, é capaz de causar toxicidade em fibroblastos e eritrócitos. Adicionalmente, a interação com os outros componentes do óleo essencial de tangerina pode levar a uma maior toxicidade quando comparada com a análise de um componente separado.

Os quatro óleos essenciais foram capazes de romper o biofilme pré-formado principalmente em concentrações CIM e supra-CIM. Componentes dos óleos que contêm alta hidrofobicidade e função fenólica possuem maior capacidade de interação com a matriz externa de EPS (Mah & O’Toole, 2001). Essa interação causa uma desestabilização da matriz EPS

como um todo, e o biofilme pode sofrer um colapso. Após a desestruturação do biofilme, as células antes presentes na matriz EPS, passam a ter maior interação com o meio contendo os agentes antibacterianos, sendo mais susceptíveis à morte e impossibilitando a retomada na formação do biofilme (Mah & O'Toole, 2001). Como exemplo, Alvez e colaboradores (2016) relataram o óleo de coentro como efetivo no rompimento do biofilme de *Acinetobacter baumannii*. Assim como Bazargani & Rohloff (2016) observaram que este mesmo óleo foi capaz de romper o biofilme pré-formado de *S. aureus* em 90 %. O presente trabalho, por meio da GC-MS mostrou a característica hidrofóbica do óleo de coentro, contendo o decenal e decanal como moléculas majoritárias. Essa alta hidrofobicidade pode resultar na desestabilização da EPS e até mesmo com lipídeos da membrana das células formadoras do biofilme.

Indústrias como as de alimento, limpeza e sanitização utilizam produtos contendo óleos essenciais para evitar a adesão das bactérias, e sua futura produção de biofilme, em diferentes superfícies, como vidro, plástico, aço e até vegetais (Cui et al., 2016). Por conter moléculas antibacterianas e possuir característica hidrofóbica, os óleos essenciais previamente dispostos sob uma superfície, fazem com que aquele ambiente apresente uma maior dificuldade na aderência de células formadoras de biofilme. Quando os óleos essenciais do presente trabalho foram adicionados na microplaca junto com as bactérias, estes podem ter rapidamente se aderido às paredes dos poços, levando a um ambiente hostil para as bactérias se aderirem e formarem o biofilme. Dos Santos Rodrigues e colaboradores (2017) observaram que o óleo essencial de orégano e o carvacrol (seu constituinte), mesmo em concentrações sub-CIM foram capazes de diminuir a formação de biofilme em superfícies plásticas a exemplo do poliestireno, mesmo material das microplacas de 96-poços utilizadas no estudo.

Para os testes de sinergismo, dois antibióticos foram escolhidos para fazerem parte da combinação com os óleos essenciais, ampicilina e tetraciclina. A ampicilina é um antibiótico semi-sintético da classe dos  $\beta$ -lactâmicos e, portanto, interage com as PBPs da parede celular bacteriana, evitando que esta se forme (Kaushik et al., 2014). Por outro lado, a tetraciclina pertence a uma classe de antibióticos contendo quatro anéis lineares fundidos. As tetraciclinas interagem com o receptor do t-RNA na subunidade 30s do ribossomo de procaríotos, inibindo a síntese proteica e causando a morte celular. Entretanto, alguns mecanismos de resistência já são relatados, como bombas de efluxo que expulsam o antibiótico do citoplasma bacteriano, e a modificação estrutural do sítio ligante ao antibiótico (Chopra & Roberts, 2001).

O presente estudo evidenciou a CIM de dois antibióticos de uso clínico no isolado MRSA-USA300. Entretanto, na presença dos óleos essenciais de canela e coentro, houve interação

sinérgica dos componentes, reduzindo a quantidade necessária destes para causar a morte celular. El Atki e colaboradores (2019) relataram que o óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (espécie de canela), juntamente com a ampicilina apresentou efeito sinérgico na morte celular de *S. aureus* ATCC 25923. Gill & Holley (2004) relataram a atividade do cinamaldeído, componente principal do óleo essencial de canela, como possuindo grande afinidade por moléculas da parede celular bacteriana, podendo desestabilizar a mesma. Este efeito observado para o cinamaldeído, aliado com a ampicilina que possui sua atividade inibindo a síntese da parede celular, pode aumentar o efeito destas duas moléculas causando um efeito sinérgico. Com a desestabilização da parede celular bacteriana, esta se torna mais permeável a antibióticos que possuem sua atividade no citoplasma, como a tetraciclina. Apesar dos mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo, serem capazes de expulsar grande parte da tetraciclina, a entrada facilitada deste antibiótico pode fazer com que a célula gaste muita energia na via de expulsão, acarretando um colapso energético, e posterior morte celular. Por outro lado, este estudo elucidou o óleo de coentro possuindo o linalol como um dos componentes majoritários. Aelenei e colaboradores (2019) analisaram o linalol e o óleo essencial de coentro em sinergismo com diversos antibióticos. Os pesquisadores observaram o sinergismo do óleo essencial de coentro com o antibiótico tetraciclina em isolados MRSA. O óleo essencial e seus constituintes interagiram com lipídeos da membrana celular, causando a desestabilização e o colapso celular (Zengin & Baysal, 2014). Esta característica pode interferir na taxa de entrada do antibiótico tetraciclina no citoplasma celular, causando a lise por motivos anteriormente discutidos. Ademais, essa desestabilização pode afetar a síntese da parede celular, alvo da ampicilina, por estar uma camada abaixo dessa. Este fenômeno pode estar relacionado com a maior efetividade da ampicilina quando presente na mistura com o óleo essencial de coentro.

Os óleos essenciais de canela e coentro foram selecionados para serem incorporados em formulações tópicas. A bactéria *S. aureus* está presente na microbiota da pele em uma taxa de aproximadamente 30 %, em comparação com outras bactérias, na maioria das vezes não sendo patogênica (CDC, 2007). Entretanto, diversos fatores, como estresse, baixa imunidade e o uso contínuo de antibióticos podem desencadear infecções, sendo as mais comuns as de pele (CDC, 2003a). Dentre estas, podemos citar as foliculites, impetigo (lesões generalizadas na pele), formação de abscessos purulentos e a colonização de feridas não cicatrizadas (Lee et al., 2004). Estas infecções podem ser adquiridas no meio comunitário (CA-MRSA, em inglês), através do contato com feridas ou fômites que contenham a bactéria ou, mais comumente, no meio hospitalar (HA-MRSA, em inglês) (CDC, 2007). Apesar de diferenças genéticas e fisiológicas dos isolados adquiridos nos dois ambientes, o tratamento de infecções é semelhante, sendo

constituído da administração oral e venal de antibióticos. Entretanto, para diversos casos clínicos, formulações tópicas contendo antibacterianos são prescritas (CDC, 2007). Estes tratamentos tópicos apresentam vantagens como sendo um tratamento localizado, com a fácil visualização da evolução do quadro clínico e por causar menos efeitos colaterais comparados com outros tratamentos (Schwaber, 2004). Neste contexto, o desenvolvimento de formulações tópicas contendo agentes antibacterianos, é uma estratégia para que o tratamento ocorra no início da infecção, de forma localizada e com uma baixa probabilidade de que a bactéria entre na corrente sanguínea e atinja outros órgãos.

As análises da curva de crescimento reforçam os resultados de que os óleos essenciais possuem características bactericidas. Ambas as formulações contendo os óleos essenciais reduziram a população bacteriana, observada pelo decréscimo da D.O. Guimarães e colaboradores (2019) analisaram diversos óleos essenciais e seus componentes na curva de crescimento em bactérias patogênicas, inclusive em isolados de *S. aureus*. Os resultados foram semelhantes aos do presente estudo ao relatar uma curva de morte a partir do momento em que os componentes, na sua concentração CIM, eram incorporados ao meio. Adicionalmente, os autores observaram a deformação da membrana plasmática, através de microscopia de varredura, evidenciando a atividade bactericida dos compostos. A estagnação da morte celular após o início do experimento foi anteriormente observada, inclusive em MRSA (Barbosa et al., 2015). Esse fenômeno pode estar relacionado com a degradação natural dos compostos no meio analisado, não sendo mais capazes de causar a morte bacteriana. Adicionalmente, não houve crescimento expressivo da população bacteriana nas horas subsequentes ao pico de morte, mantendo a população constante. Esta informação apresenta resultados para um possível tratamento clínico, indicando em quais momentos as formulações tópicas devem ser reaplicadas para que haja uma nova fase de morte na população bacteriana.

Por fim, os testes *in vivo* do presente estudo foram realizados em larvas de *G. mellonella*, um modelo animal amplamente utilizado e que possui diversas vantagens em análises de toxicidade (Cutuli et al., 2019). Algumas dessas vantagens estão relacionadas ao baixo custo de criação em relação a outros modelos animais, um curto ciclo de vida (40-60 dias) e um sistema imune inato contendo similaridades com os de vertebrados (Tsai et al., 2016; Sheehan et al., 2018). Na hemolinfa das larvas, estão presentes os hemócitos, células análogas aos fagócitos humanos, responsáveis pela fagocitose e inativação de agentes externos. As formulações tópicas, com as CIMs dos óleos essenciais, foram inoculadas nas larvas e a sobrevivência e o comportamento foram observados durante 96 horas. A formulação contendo o óleo de canela não causou a morte de nenhuma das dez larvas presentes no experimento. Entretanto, a

formulação contendo o óleo de coentro foi responsável pela morte de apenas uma larva. Todavia, essa morte não pode ter ocorrido por uma possível toxicidade do óleo de coentro, mas por outros motivos, como a perfuração de algum órgão interno no momento da inoculação, da larva não estar completamente saudável ou por outro fator externo não relacionado ao experimento. Portanto, podemos concluir que as duas formulações tópicas não foram tóxicas para as larvas, apresentando uma segurança para futuras análises *in vivo* em outros modelos animais. Wijesinghe e colaboradores (2020) analisaram a toxicidade em *G. mellonella* do óleo essencial da Canela-da-Índia (*Cinnamomum verum*), espécie semelhante à utilizada no presente estudo. Os autores observaram que, após cinco dias, a taxa de sobrevivência das larvas foi de 100 % em diversas concentrações analisadas. Estudos confirmando a não-toxicidade dos óleos essenciais em células eucarióticas e modelos *in vivo* corroboram com o presente estudo ao concluir a segurança dos mesmos para aplicações em formulações tópicas.

## 7. CONCLUSÕES

Dezenove óleos essenciais foram avaliados em relação à atividade antibacteriana. Os óleos essenciais de canela, coentro, cravo e tangerina foram efetivos na inibição do MRSA-USA300. Dentre estes óleos, os de canela e coentro foram os mais efetivos mediante os parâmetros avaliados. Os valores iguais dessas duas concentrações evidenciaram a característica bactericida dos óleos essenciais analisados.

As análises de cromatografia gasosa permitiram revelar os componentes dos óleos essenciais, sendo que muitos são conhecidos por apresentarem atividade antibacteriana. A análise de hemólise evidenciou que os óleos de canela e coentro possuem uma citotoxicidade baixa, mesmo nas maiores concentrações analisadas. Entretanto, o óleo de tangerina apresentou uma taxa mais elevada de hemólise, em todas as concentrações analisadas.

As análises de sinergismo demonstraram a atividade sinérgica dos óleos essenciais de canela e coentro com os antibióticos ampicilina e tetraciclina. Os quatro óleos essenciais foram eficazes no rompimento do biofilme pré-formado nas concentrações CIM e supra-CIM. Para o biofilme em formação, apenas óleo essencial de cravo não foi eficaz na inibição, tendo os outros três óleos apresentado eficácia na inibição da formação do biofilme em concentrações sub-CIM.

Os óleos essenciais de canela e coentro foram incorporados à formulações tópicas com a característica de gel dérmico. As análises de CIM, CBM, biofilme e hemólise contendo as formulações tópicas nas concentrações similares de óleos essenciais apresentaram resultados semelhantes quando comparadas com as análises dos óleos essenciais isolados.

A cinética de crescimento bacteriano utilizando as formulações tópicas reforçou a característica bactericida dos óleos essenciais, sendo o óleo de coentro mais efetivo ao diminuir a população bacteriana em um menor período de tempo. As análises utilizando *G. mellonella* revelaram a baixa toxicidade das formulações tópicas contendo os óleos essenciais neste modelo *in vivo*. As duas formulações tópicas contendo os óleos essenciais de canela e de coentro apresentam-se promissoras para uso no combate às infecções causadas por bactérias resistentes, a exemplo do MRSA-USA300.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E. P. & Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, 146(3713):837, 1940.
- Aelenei, P.; Rimbu, C. M.; Guguianu, E.; Dimitriu, G.; Aprotosoiaie, A. C.; Brebu, M.; Miron, A. Coriander essential oil and linalool-interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, 68(2):156-164, 2019.
- 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**, 32(2):155-165, 2016.
- 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**, 11:245 - 255, 1997.
- Arias, C. A.; Rincon, S.; Chowdhury, S.; Martínez, E.; Coronell, W.; Reyes, J.; Murray, B. E. MRSA-USA300 clone and VREF—a US–Colombian connection? **New England Journal of Medicine**, 359(20):2177-2179, 2008.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food Chem Toxicology**, 46:446 - 75, 2008.
- Barbieri, C.; Borsotto, P. Essential oils: market and legislation. **Potential of Essential Oils**, p. 107-127, 2018.
- Barbosa, L. N.; da Silva Probst, I.; Andrade, B. F. M. T.; Alves, F. C. B.; Albano, M.; de Souza M. D. L. R.; Júnior, A. F. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, 64(3):289-298, 2015.
- Barros, F. J.; Costa, R. J. O.; Cesário, F. R. A. S.; Rodrigues, L. B.; da Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M.; de Menezes, I. R. A. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **European Journal of Integrative Medicine**, 8(4):505-512, 2016.
- Bartlett, J. G.; Gilbert, D. N.; Spellberg, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, 56(10):1445-1450, 2013.
- Batista, M. N.; Braga, A. C. S.; Campos, G. R. F.; Souza, M. M.; Matos, R. P. A. D.; Lopes, T. Z.; Rahal, P. Natural products isolated from oriental medicinal herbs inactivate Zika virus. **Viruses**, 11(1):49, 2019.
- Bazargani, M. M.; & Rohloff, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, 6:156-164, 2016.
- Bilia, A.R.; Guccione, C.; Isacchi, B.; Righeschi, C.; Firenzuoli, F.; Bergonzi, M.C. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid. Based Complement. Alternative Medicine*, 2014.

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**, 84:1837-1846, 2012.

Bootsma, M. C.; Wassenberg, M. W.; Trapman, P.; Bonten, M. J. The nosocomial transmission rate of animal-associated ST398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of the Royal Society Interface**, rsif20100349, 2010.

Burns, R. C., & Hardy, R. W. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants, 2012.

Calo, J. R.; Crandall, P. G.; O'Bryan, C. A.; Ricke, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, 54:111-119, 2015.

Carneiro, F. M.; Silva, M. D.; Borges, L. L.; Albernaz, L. C.; Costa, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, 3(2):44-75, 2014.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among competitive sports participants--Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles County, 2000-2003. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 52(33):793, 2003 (a).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in correctional facilities---Georgia, California, and Texas, 2001-2003. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 52(41):992, 2003. (b).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections--Los Angeles County, California, 2002-2003. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 52(5):88, 2003 (c).

Centers for Disease Control and Prevention. Questions and answers about methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in schools. **Retrieved September**, 13, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services: Atlanta, GA. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>, acesso em janeiro de 2022, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention, 2019.

Chao, S.; Young, G.; Oberg, C.; Nakaoka, K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, 23(6):444-449, 2008.

Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65(2):232-260, 2001.

Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Versão, 8**, 2018.

Conlon, B. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. **Bioessays**, 36(10):991–996, 2014.

Cui, H.; C. Ma; L. Lin. Synergetic antibacterial efficacy of cold nitrogen plasma and clove oil against *Escherichia coli* O157: H7 biofilms on lettuce. **Food Control**, 66:8-16, 2016.

Cutuli, M. A.; Petronio, G.; Vergalito, F.; Magnifico, I.; Pietrangelo, L.; Venditti, N., Di Marco, R. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: new developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, 10(1):527-541, 2019.

Da Silva Trentin, D. S.; Giordani, R. B.; Macedo, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, 14(22):213-236, 2013.

Danhorn, T. & Fuqua, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review Microbiology**, 61:401-422, 2007.

Das, B.; Mandal, D.; Dash, S. K.; Chattopadhyay, S.; Tripathy, S.; Dolai, D. P.; Roy, S. Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage-associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, 9, IDRT-S31741, 2016.

DeLeo, F. R.; Diep, B. A.; Otto, M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, 23:17-34, 2009.

Demain, A. L.; & Zhang, L. Natural products and drug discovery. In: **Natural products. Humana Press**, 3-29, 2005.

Desai, R.; Pannaraj, P. S.; Agopian, J.; Sugar, C. A.; Liu, G. Y.; Miller, L. G. Survival and transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from fomites. **American Journal of Infection Control**, 39(3):219-225, 2011.

Devi, K. P.; Nisha, S. A.; Sakthivel, R.; Pandian, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, 130(1):107-115, 2010.

Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, 3(4):25, 2016.

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**, 52:153-159, 2013.

- Diep, B. A.; Chambers, H. F.; Graber, C. J.; Szumowski, J. D.; Miller, L. G.; Han, L. L.; Carleton, H. A. Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. **Annals of Internal Medicine**, 148(4):249-257, 2008.
- Domadia, P.; Swarup, S.; Bhunia, A.; Sivaraman, J.; Dasgupta, D. Inhibition of bacterial cell division protein *FtsZ* by cinnamaldehyde. **Biochemical Pharmacology**, 74:831-840, 2007.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, 15:167-193, 2002.
- Dos Santos Rodrigues, J. B. R. J; de Carvalho, N. T; de Souza, K; de Sousa Oliveira, O. L.; Franco, D.; Schaffner, E. L.; de Souza, M. M.; Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 73:1237-46, 2017.
- Duarte, A.; Ferreira, S.; Silva, F.; Domingues, F. C. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**, 19(3-4):236-238, 2012.
- Eckburg, P. B.; Lister, T.; Walpole, S.; Keutzer, T.; Utlely, L.; Tomayko, J.; Coleman, S. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and drug interaction potential of SPR741, an intravenous potentiator, after single and multiple ascending doses and when combined with  $\beta$ -lactam antibiotics in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 63(9):e00892-19, 2019.
- El Atki, Y.; Aouam, I.; El Kamari, F.; Taroq, A.; Nayme, K.; Timinouni, M.; Abdellaoui, A. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, 10(2):63, 2019.
- El-Hossary, E. M.; Cheng, C.; Hamed, M. M.; Hamed, A. N. E. S.; Ohlsen, K.; Hentschel, U.; Abdelmohsen, U. R. Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 126:631-651, 2017.
- Elipoulos, G. M. Antimicrobial combinations. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, p. 432-492, 1991.
- 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. **Biotechnology Letters**, 38(6):1015 - 1019, 2016.
- Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *Baccilus influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, 10(3):226, 1929.

Food and Drug Administration (FDA). Code of federal regulations (CFR). Title 21: Food and drugs. Chapter I e food and drug administration, department of health and human services, subchapter B e food for human consumption (continued), Part 182 e substances generally recognized as safe (GRAS), subpart a e general provisions, subpart 182.20 e essential oils, oleoresins, and natural extractives. Office of the Federal Register, Washington, (Revised April, 2016). Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>, 2016.

Frank, D. N.; Feazel, L. M.; Bessesen, M.; Price, C. S.; Janoff, E. N.; Pace, N. R. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. **PLoS One**, 5(5):e10598, 2010.

Friedly, E. C.; Crandall, P. G.; Ricke, S. C.; Roman, M.; O'Bryan, C.; Chalova, V. I. *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, 74:M67-M72, 2009.

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**, 65(10):1545-1560, 2002.

Ghotaslou, R.; Yekani, M.; Memar, M. Y. The role of efflux pumps in *Bacteroides fragilis* resistance to antibiotics. **Microbiological Research**, 2(10):1-5, 2018.

Gibbs, E. P. J. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. **Veterinary Record**, 174(4):85-91, 2014.

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**, 70(10):5750-5755, 2004.

Gill, A. O., & Holley, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, 108(1):1-9, 2006.

Gottlieb, T.; Su, W. Y.; Merlino, J.; Cheong, E. Y. Recognition of USA300 isolates of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. **Medical Journal of Australia**, 189(3):179, 2008.

Guerra, F. Q. S.; Mendes, J. M.; Sousa, J. P. D.; Morais-Braga, M. F.; Santos, B. H. C.; Melo Coutinho, H. D.; Lima, E. D. O. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. **Natural Product Research**, 26(23):2235-2238, 2012.

Guimarães, A. C.; Meireles, L. M.; Lemos, M. F.; Guimarães, M. C. C.; Endringer, D. C.; Fronza, M.; Scherer, R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, 24(13):2471, 2019.

Haddi, K.; Turchen, L. M.; Viteri Jumbo, L. O.; Guedes, R. N.; Pereira, E. J.; Aguiar, R. W.; Oliveira, E. E. Rethinking biorational insecticides for pest management: Unintended effects and consequences. **Pest Management Science**, 76(7):2286-2293, 2020.

- 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**, 25:2227-2238, 2009.
- Hageman, J. C.; Patel, J.; Franklin, P.; Miscavish, K.; McDougal, L.; Lonsway, D.; Khan, F. N. Occurrence of a USA300 vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 62(4):440-442, 2008.
- Hahlbrock, K.; & Scheel, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, 40:347-369, 1989.
- 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**, 296:202-211, 2006.
- Hamm, S.; Bleton, J.; Connan, J.; Tchaplal, A. A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various *Olibanum* samples. **Phytochemistry**, 66:1499-1514, 2005.
- Hanson, J. R. Natural products: the secondary metabolites. **Royal Society of Chemistry**, 17, 2003.
- Henkel, T.; Brunne, R. M.; Müller, H.; Reichel, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, 38(5):643-647, 1999.
- Hinchliffe, S. More than one world, more than one health: Re-configuring interspecies health. **Social Science & Medicine**, 129:28-35, 2015.
- Hurwitz, J.L.; Zhan, X.; Brown, S.A.; Bonsignori, M.; Stambas, J.; Lockey, T.D.; Sealy, R.; Surman, S.; Freiden, P.; Jones, B. HIV-1 vaccine development: Tackling virus diversity with a multi-envelope cocktail. **Front Bioscience**, 13:609-620, 2008.
- Hussain, F. M.; Boyle-Vavra, S.; Bethel, C. D.; Daum, R. S. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 19(12):1163-1166, 2000.
- Ibrahim, N. I.; Wong, S. K.; Mohamed, I. N.; Mohamed, N.; Chin, K. Y.; Ima-Nirwana, S.; Shuid, A. N. Wound healing properties of selected natural products. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 15(11):2360, 2018.
- Jain, A. K., Thomas, N. S., Panchagnula, R. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride.: I. Effect of terpenes. **Journal of Controlled Release**, 79(1-3):93-101, 2002.
- Jevons, M. P. "Celbenin"-resistant staphylococci. **British Medical Journal**, 1(5219):124, 1961.

- Joly, C. A.; Haddad, C. F.; Verdade, L. M.; Oliveira, M. C. D.; Bolzani, V. D. S.; Berlinck, R. G. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista Usp**, (89):114-133, 2011.
- Kaushik, D.; Mohan, M.; Borade, D. M.; Swami, O. C. Ampicillin: rise fall and resurgence. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**. 8(5):ME01-3, 2014.
- Keynan, Y.; & Rubinstein, E. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. **Critical Care Clinics**, 29(3):547-562, 2013.
- Kiefer, D. M. The Way We Were: A century of pain relief. **Today's Chemist at Work**, 6:38-39, 1997.
- King, M. D.; Humphrey, B. J.; Wang, Y. F.; Kourbatova, E. V.; Ray, S. M.; Blumberg, H. M. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. **Annals of Internal Medicine**, 144(5):309-317, 2006.
- 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**, 10(3):e0120514, 2015.
- Kotwani, A., & Holloway, K. Trends in antibiotic use among outpatients in New Delhi, India. **BMC Infectious Diseases**, 11(1):99, 2011.
- Kourtis, A. P.; Hatfield, K.; Baggs, J.; Mu, Y.; See, I.; Epton, E.; Cardo, D. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 68(9):214, 2019.
- Krishna A.; Tiwari R.; Kumar S. Aromatherapy-an alternative health care through essential oils. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, 22:798-804, 2000.
- Lammie, S. L.; & Hughes, J. M. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, 7:287-312, 2016.
- Langeveld, W. T.; Veldhuizen, E. J.A; Burt, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, 40:76-94, 2014.
- Lau, K. M.; Lai, K. K.; Liu, C. L.; Tam, J. C. W.; To, M. H.; Kwok, H. F.; Lau, C. P.; Ko, C. H.; Leung, P. C.; Fung, K. P. Synergistic interaction between Astragali Radix and Rehmanniae Radix in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, 141:250-256, 2012.
- Le, K. Y.; & Otto, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. **Frontiers in Microbiology**. 6:1174, 2015.
- LeBel, G.; Vaillancourt, K.; Bercier, P.; Grenier, D. Antibacterial activity against porcine respiratory bacterial pathogens and in vitro biocompatibility of essential oils. **Archives of Microbiology**, 201(6), 833-840, 2019.

- Lee, M. C.; Rios, A. M.; Aten, M. F.; Mejias, A.; Cavuoti, D.; McCracken Jr, G. H.; Hardy, R. D. Management and outcome of children with skin and soft tissue abscesses caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Pediatric infectious disease journal**, 23(2):123-127, 2004.
- 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**, 45:192-200, 2008.
- Lim, D., & Strynadka, N. C. Structural basis for the  $\beta$  lactam resistance of PBP2a from Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Structural & Molecular Biology**, 9(11):870, 2002.
- Livermore, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, 34(5):634-640, 2002.
- 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**, 52(26):7862-7866, 2004.
- Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**.339(8):520-32, 1998.
- Lu, M.; Dai, T.; Murray, C. K.; Wu, M. X. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2329, 2018.
- Machowska, A.; & Stålsby Lundborg, C. Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 16(1):27, 2019
- Mackay, M. L.; Milne, I. M.; Gould, I. M. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 15:125-129, 2000.
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, 9:34-39, 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)**, 83: e50854-e50854, 2014.
- Manion, C. R.; & Widder, R. M. Essentials of essential oils. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 74(9):e153-e162, 2017.
- 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**, 113(2):526-529, 2009.

McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., Tenover, F. C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(11):5113-5120, 2003.

McDougal, L. K.; Fosheim, G. E.; Nicholson, A.; Bulens, S. N.; Limbago, B. M.; Shearer, J. E.; Patel, J. B. Emergence of resistance among USA300 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54(9):3804-3811, 2010.

Mendanha, S. A., Moura, S. S., Anjos, J. L., Valadares, M. C., Alonso, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in vitro**, 27(1):323-329, 2013.

Moran, G. J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B.; Talan, D. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department. **New England Journal of Medicine**, 355(7):666-674, 2006.

Mullard, A. **2014 FDA drug approvals**, 2015.

Murray, P.R. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan **Microbiologia Médica**, p, 513, 1992.

Musser, J. M.; Schlievert, P. M.; Chow, A. W.; Ewan, P.; Kreiswirth, B. N.; Rosdahl, V. T.; Naidu, A. S.; Witte, W.; Selander, R. K. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1990.

Nacif-Marçal, L.; Pereira, G. R.; Abranches, M. V.; Costa, N. C.; Cardoso, S. A.; Honda, E. R.; Oliveira, L. L. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). **Toxicon**, 99:16-22, 2015.

Nadimpalli, M. L.; Stewart, J. R.; Pierce, E.; Pisanic, N.; Love, D. C.; Hall, D.; Larsen, J.; Carroll, K. C.; Tekle, T.; Perl, T. M.; Heaney, C. D. Face mask use and persistence of livestock-associated *Staphylococcus aureus* nasal carriage among industrial hog operation workers and household contacts, USA. **Environmental Health Perspectives**, 126(12):127005, 2018.

Nascimento, F. R.; Albuquerque, K. R.; Oliveira, M. R.; Pizziolo, V. R.; Brasileiro, B. G.; Diaz, G.; Diaz, M. A. Antibiotic activity of *Plectranthus ornatos* Codd, a Traditional Medicinal Plant. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89(3):2461-2469, 2017.

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**, 75:311–335, 2012.

Newman, D. J.; & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 83(3), 770-803, 2020.

Newsom, S. W. Ogston's coccus. **Journal of Hospital Infection**, 70:369-372, 2008.

Niu, D.; Wang, Q. Y.; Ren, E. F.; Zeng, X. A.; Wang, L. H.; He, T. F.; Brennan, C. S. Multi-target antibacterial mechanism of eugenol and its combined inactivation with pulsed electric fields in a hurdle strategy on *Escherichia coli*. **Food Control**, 106, 106742, 2019.

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

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**, 8(7):2009.

Palaniappan, K., & Holley, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 140(2-3):164-168, 2010.

Palombo, E. A. & Semple, S. J. Antibacterial activity of Australian plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, 42(6):444-448, 2002.

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

Pei, R. S.; Zhou, F.; Ji, B. P.; Xu, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 379–383, 2009.

Pereira, M. F.; Rossi, C. C.; de Queiroz, M. V.; Martins, G. F.; Isaac, C.; Bosse, J. T.; Bazzolli, D. M. S. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, 161(2):387-400, 2015.

Piatek, M., Sheehan, G.; & Kavanagh, K. (2020). Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. **Pathogens and Disease**, 78(8), ftaa059, 2020.

Piddock, L. J. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, 12(3):249-253, 2012.

Prakash, B.; Media, A.; Mishra, P. K.; Dubey, N. K. Plant essential oils as food 811 preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri812 food commodities - Potentials and challenges. **Food Control**, 47:381-391, 2015.

Probst-Kepper, M.; & Geginat, G. New antibiotics for treatment of highly resistant Gram-negative bacteria. **Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS**, 53(7-08):529-542, 2018.

Rasigade, J. P.; & Vandenesch, F. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. **Infection, Genetics and Evolution**, 21:510-4, 2014.

Rayan, A.; Raiyn, J.; Falah, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PloS one**, 12(11):e0187925, 2017.

Reinthalder, F. F.; Posch, J.; Feierl, G.; Wüst, G.; Haas, D.; Ruckenbauer, G.; Marth, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, 37(8):1685-1690, 2003.

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**, 38:27-38, 2012.

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**, 91(4):621-632, 2005.

Sales, G. B.; de Alencar, J. B.; Santos, R. O.; Neto, S. D. C. R.; de Sousa, A. P.; de Oliveira Filho, A. A. *Origanum majorana* como agente ansiolítico em Odontologia: uma revisão literária. **Research, Society and Development**, 9(5):e148953186-e148953186, 2020.

Salgado-Pabón, W.; Breshears, L.; Spaulding, A. R.; Merriman, J. A.; Stach, C. S.; Horswill, A. R.; Peterson, M. L.; Schlievert, P. M. Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. **MBio**, Aug 20, 4(4), 2013.

Sarkar, P.; Yarlagadda, V.; Ghosh, C.; Haldar, J. (2017). A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. **Medicinal Chemistry Communication**, 8(3):516-533, 2017.

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**, 42(4):321-324, 2007.

Sauer, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, 4(6):219, 2003.

Schwaber, M. J. Clinical implications of varying degrees of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Emerging Infectious Diseases**, 10(1):160-160, 2004.

Setzer, William N. Essential oils and anxiolytic aromatherapy. **Natural Product Communications**, 4(9):1934578X0900400928, 2009.

Sharmeen, J. B.; Mahomoodally, F. M.; Zengin, G.; Maggi, F. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, 26(3):666, 2021.

Sheehan, G.; Garvey, A.; Croke, M.; Kavanagh, K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? **Virulence**, 9(1):1625-1639, 2018.

Shen, S.; Zhang, T.; Yuan, Y.; Lin, S.; Xu, J.; Ye, H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, 47:196-202, 2015.

- Shi, X. & Zhu, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, 20:407-413, 2009.
- 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**, 89:277-283, 2003.
- Simões, L. C.; & Vieira, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, 43:573-583, 2011.
- 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**, 16:680-682, 2002.
- 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**, 115(8):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**, 29:361-367, 2002.
- Strohl, W.S. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery**, 5:39-41, 2000.
- Sulaeman, A.; Marliyati, S. A.; Fahrudin, M. Antiemetic activity of *Trigona* spp. propolis from three provinces of Indonesia with two methods of extraction. **Pharmacognosy Journal**, 10(1), 2018.
- 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**, 13:196-202, 2003.
- Taib, I. S.; Budin, S. B.; Ain, S. M. S. N.; Mohamed, J.; Louis, S. R.; Das, S.; Hidayatulfathi, O. Toxic effects of *Litsea elliptica* Blume essential oil on red blood cells of Sprague-Dawley rats. **Journal of Zhejiang University Science B**, 10(11):813, 2009.
- Tallarida, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes & Cancer**, 2(11):1003-1008, 2011.
- Tallarida, R. J.; & Raffa, R. B. The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. **Pharmacology & Therapeutics**, 127:165-74, 2010.
- Tenover, F. C.; McDougal, L. K.; Goering, R. V.; Killgore, G.; Projan, S. J.; Patel, J. B.; Dunman, P. M. Characterization of a strain of community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, 44(1):108-118, 2006.

Thakuria, B. & Lahon, K. The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: an update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, 7(6):1207, 2013.

Tsai, C. J. Y.; Loh, J. M. S.; Proft, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, 7(3):214-229, 2016.

Trevijano-Contador, N.; & Zaragoza, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. **Journal of Fungi**, 5(1), 3, 2019.

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**, 48(11):3274-3280, 2010.

Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M. C.; Lina, G.; Nimmo, G. R.; Heffernan, H.; Etienne, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**, 9(8):978, 2003.

Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernandez-Lopez, J.; Perez-Álvarez, J. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Journal of Food Safety**, 28(4):567-576, 2008.

Wang, L., Weller, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, 17:300-312, 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**, 17(3):2704-2713, 2012.

Wijesinghe, G. K.; Maia, F. C.; de Oliveira, T. R.; de Feiria, S. N. B.; Joia, F.; Barbosa, J. P.; Höfling, J. F. Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 115, 2020.

Witte, W., Bräulke, C., & Strommenger, B. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8 ("USA300") in an HIV-positive patient in Cologne, Germany, February, 2008.

World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance, fact sheet, 194. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/>, 2012.

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

World Health Organization (WHO): Antimicrobial resistance and primary health care (No. WHO/HIS/SDS/2018.56). **World Health Organization**, 2018.

Wright, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Canadian Journal of Microbiology**, 60(3):147-154, 2014.

Wu, G.; Liu, Y.; Ding, Y.; Yi, Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue and Cell**, 48(4):297-304, 2016.

Yang, Y.; Zhang, Z.; Li, S.; Ye, X.; Li, X.; He, K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, 92:133-147, 2014.

Yano, Y.; Oguma, T.; Nagata, H.; Sasaki, S. Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of in vitro bactericidal kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 87(10):1177-1183, 1998.

Zengin, H. & Baysal, A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage -forming bacteria and cell structure activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules**, 19:17773-177798, 2014.

Zhang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Jiang, P.; Quek, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, 59:282-289, 2016.

## **CAPÍTULO II**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME *IN VITRO* DE COMPOSTOS  
ORGÂNICOS SINTÉTICOS EM METICILINA-RESISTENTE *Staphylococcus aureus*  
USA300**

## RESUMO

RODRIGUES, Fábio Assad Féres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022. **Atividade antibacteriana e antibiofilme *in vitro* de compostos orgânicos sintéticos em Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* USA300.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Mateus Ferreira Santana.

A antibioticoterapia é a principal forma de tratar infecções bacterianas tanto no âmbito humano quanto no veterinário. Entretanto, a utilização indiscriminada destes compostos é um agravante para que populações bacterianas com marcas de resistência sejam selecionadas. O presente estudo analisou o efeito antimicrobiano de compostos sintéticos em MRSA-USA300. Este isolado, inicialmente descrito nos EUA, atualmente é responsável por grande parte das infecções hospitalares pelo mundo. Tem gerado preocupações médicas, por causar infecções oportunistas principalmente em pacientes imunossuprimidos, em órgãos como a pele, pulmão e fígado. Inicialmente descrito apenas com a marca de resistência à ampicilina, diversos isolados de MRSA-USA300 já são considerados multirresistentes, inclusive a antibióticos de último recurso. Neste contexto, há a necessidade de desenvolvimento de novas moléculas com atividade antibacteriana, principalmente contra isolados resistentes aos antibióticos empregados na prática clínica. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de 172 compostos sintéticos em MRSA-USA300. Inicialmente, 172 compostos sintéticos foram analisados quanto à sua atividade antibacteriana. Destes, dois apresentaram atividade (MI23 e MI24), ambos pertencentes a classe das xantenodionas, moléculas derivadas dos xantenos. As análises de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) foram realizadas para ambos os compostos. As duas concentrações foram idênticas para os compostos, com valores de 0,25 mg/mL. Adicionalmente, os dois compostos foram analisados quanto a efetividade no rompimento do biofilme pré-formado e na inibição do crescimento do mesmo. Ambos os compostos foram capazes de romper o biofilme pré-formado em concentrações supra-CIM. Entretanto, o composto MI23 apresentou um melhor resultado devido à sua capacidade de romper o biofilme pré-formado na concentração CIM. Adicionalmente, as bactérias foram cultivadas com os compostos em concentrações sub-CIM para avaliar a capacidade destes em inibir a formação do biofilme. O composto MI23 foi capaz de inibir a formação do biofilme em duas concentrações sub-CIM (1/2x e 1/4x), enquanto que o MI24 foi capaz de inibir a formação na concentração 1/2xCIM. Por fim, foi realizada a

curva de crescimento/morte do isolado MRSA-USA300 utilizando uma microplaca 96-poços. Ambos os compostos foram adicionados juntamente com a bactéria na metade da sua fase *log*. Os resultados confirmaram o efeito bactericida dos compostos, ao reduzir a população bacteriana, tendo um pico de redução em torno de 7 horas após o início do experimento. Esses resultados evidenciam o possível uso de ambos os compostos no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, a exemplo do MRSA-USA300.

Palavras-chave: Antibióticos. Compostos sintéticos. Multirresistência.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Fábio Assad Féres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2022. **Antibacterial and antibiofilm activity in vitro of synthetic compounds on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Mateus Ferreira Santana.

Antibiotic therapy is the main way to treat bacterial infections both at the human and veterinary level. However, the indiscriminate use of these compounds is an aggravating factor for bacterial populations with resistance marks to be selected. The present study analyzed the antimicrobial effect of synthetic compounds on MRSA-USA300. This isolate, initially described in the USA, is currently responsible for most hospital infections worldwide. It has generated medical concerns, as it causes opportunistic infections mainly in immunosuppressed patients, in organs such as the skin, lung and liver. Initially described only with the ampicillin resistance mark, several MRSA-USA300 isolates are already considered multiresistant, including to antibiotics of last resort. In this context, there is a need to develop new molecules with antibacterial activity, especially against antibiotic-resistant isolates used in clinical practice. Thus, the objective of this work was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of 172 synthetic compounds in MRSA-USA300. Initially, 172 synthetic compounds were analyzed for their antibacterial activity. Of these, two showed activity (MI23 and MI24), both belonging to the class of xanthenediones, molecules derived from xanthenes. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) analyzes were performed for both compounds. The two concentrations were identical for the compounds, with values of 0.25 mg/mL. Additionally, the two compounds were analyzed for their effectiveness in disrupting the preformed biofilm and inhibiting its growth. Both compounds were able to disrupt the preformed biofilm at supra-MIC concentrations. However, the compound MI23 presented a better result due to its ability to break the preformed biofilm at the MIC concentration. Additionally, bacteria were cultured with the compounds at sub-MIC concentrations to assess their ability to inhibit biofilm formation. Compound MI23 was able to inhibit biofilm formation at two sub-MIC concentrations (1/2x and 1/4x), while MI24 was able to inhibit biofilm formation at 1/2xMIC concentration. Finally, the growth/death curve of the MRSA-USA300 isolate was performed using a 96-well microplate. Both compounds were added together with

the bacterium at mid-log phase. The results confirmed the bactericidal effect of the compounds, by reducing the bacterial population, with a peak of reduction around 7 hours after the beginning of the experiment. These results show the possible use of both compounds in the treatment of infections caused by resistant bacteria, such as MRSA-USA300.

Keywords: Antibiotics. Synthetic compounds. Multidrug resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

A antibioticoterapia é a principal forma de combate a infecções bacterianas. Apenas no ano de 2015, aproximadamente duzentas mil toneladas destes compostos foram consumidas no mundo, sendo divididas entre a pecuária e a medicina. Entretanto, a utilização indiscriminada destes compostos é um dos fatores que selecionam bactérias com marcas de resistência e multirresistência. Há quase um século de estudos, pesquisadores relatam a descoberta de isolados bacterianos resistentes aos antibióticos. Diversas organizações mundiais têm publicado notificações e apelos para a comunidade científica e empresas farmacêuticas desenvolverem moléculas antibacterianas.

Os primeiros antibióticos utilizados foram produtos naturais, a exemplo da penicilina, extraída de fungos. Entretanto, a resistência bacteriana a estes compostos tende a ser maior pela co-evolução com esses indivíduos nos ambientes em que habitam, sendo selecionadas populações resistentes a estes compostos. Mesmo para antibióticos semi sintéticos como a meticilina, se observa o relato de populações bacterianas resistentes em um curto período de tempo. Assim, os compostos sintéticos surgem como uma alternativa viável no combate a estas bactérias resistentes. Estes compostos podem ser desenvolvidos utilizando moléculas preexistentes, modificando a estrutura ao alterar parte da molécula, desta forma tornando-a mais letal aos microrganismos. Outra estratégia é a síntese completa do composto, em que moléculas com baixa massa molecular são unidas a partir de ligações químicas e, a partir destas, desenvolvido um grupo de moléculas nos quais são analisados os seus efeitos antibacterianos. Como exemplo, as xantenodionas, também conhecidas como 1,8-dioxo-octaidroxanteno, são moléculas derivadas do xanteno que tem como característica a presença de um núcleo pirano fundido a dois anéis cicloexen-2-ona. Estes derivados sintéticos por sua vez tem apresentado atividades antibacteriana, antifúngica e antineoplásica. A síntese de novos compostos possui vantagens ao interagir com vias fisiológicas de diferentes isolados, na qual estes podem não possuir mecanismos de resistência.

Um exemplo destes isolados é o Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA, em inglês). A resistência à meticilina é devida à alteração estrutural das proteínas-ligadoras de penicilina (PBP, em inglês), conferindo menor interação com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Isolados de MRSA podem infectar diversos órgãos, sendo os mais comuns a pele, pulmão, podendo atingir a corrente sanguínea. Um desses isolados é o MRSA-USA300, relatado primeiramente no ano 2000. Diretrizes internacionais recomendam a aplicação tópica do antibiótico mupirocina, quando há infecção na pele, e a administração do antibiótico

vancomicina quando observada a infecção em órgãos internos. Entretanto, populações de MRSA-USA300 resistentes a esses antibióticos já foram relatadas. Nesse contexto, há a necessidade da prospecção e desenvolvimento de novos compostos orgânicos com potencial antibacteriano. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de 172 compostos sintéticos em MRSA-USA300. Ademais, a invenção objeto do presente pedido de patente, se refere ao uso dos compostos sintéticos ativos para a produção de medicamentos para tratamento e prevenção de infecções contra bactérias resistentes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de 172 compostos sintéticos em Meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* USA300 (MRSA-USA300).

### 2.2. Objetivos específicos

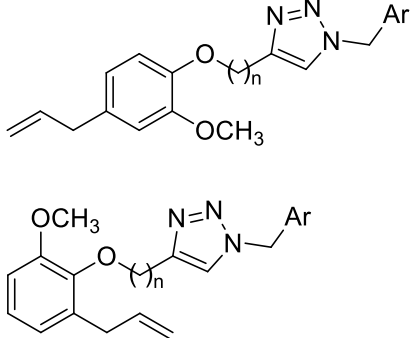
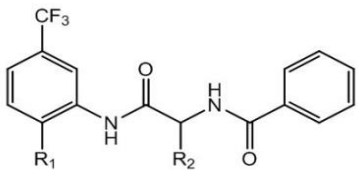
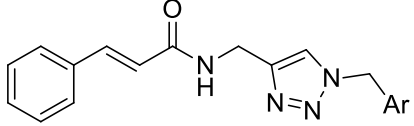
- Realizar o *screening* para a atividade antibacteriana dos 172 compostos sintéticos, na concentração de 1 mg/mL, em MRSA-USA300;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), e a concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos que apresentaram atividade;
- Analisar a capacidade dos compostos sintéticos em romper o biofilme pré-formado e inibir o biofilme em formação do isolado;
- Determinar a cinética de crescimento bacteriano na presença dos compostos ativos.

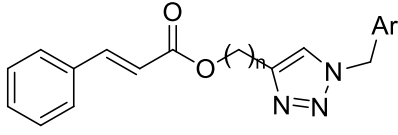
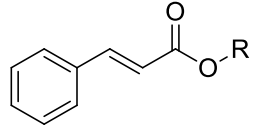
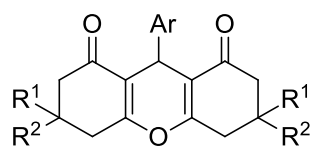
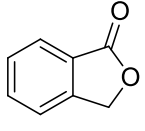
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção dos compostos**

Os 172 compostos foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Estes compostos foram analisados previamente por Ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Para os compostos sólidos, as temperaturas de fusão foram determinadas. Os compostos foram inicialmente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a fim de se obter soluções estoque (50 mg/mL). As classes de compostos avaliados, juntamente com suas estruturas químicas gerais, bem como o número de compostos avaliados para cada classe, estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação das classes de compostos avaliados, número de compostos avaliados por classe e estruturas químicas gerais.

Número de compostos	Classe	Estrutura química geral
42	Derivados 1,2,3-triazólicos do eugenol	 <p>Ar = diferentes grupos aromáticos n = 1 ou 3</p>
22	Trifluorometilarildiamidas	 <p>R<sub>1</sub> = diferentes grupos amino R<sub>2</sub> = benzil ou H</p>
6	Amidas derivadas do ácido cinâmico com porções 1,2,3-triazólicas	 <p>Ar = diferentes grupos aromáticos</p>

25	Ésteres derivados do ácido cinâmico com porções 1,2,3-triazólicas	 <p>Ar = diferentes grupos aromáticos n = 1 ou 3</p>
4	Ésteres derivados do ácido cinâmico	 <p>R=diferentes grupos aromáticos e alicíclicos.</p>
31	Xantenodionas	 <p>Ar = diferentes grupos aromáticos; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = metila, isopropila ou H</p>
42	Isobenzofuranonas	

### **3.2. Obtenção do isolado**

O isolado MRSA-USA300 foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Para a preparação do inóculo nos experimentos, uma amostra de um criotubo congelado foi retirada de ultrafreezer, inoculada em frascos de cultura contendo meio Muller-Hinton (MH) e incubada a 37 °C e agitação de 180 rpm até atingirem a concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL (McFarland = 0,5). As suspensões, quando necessário, foram diluídas com meio MH.

### **3.3. *Screening* dos compostos**

Para a avaliação de uma possível atividade antibacteriana, soluções dos 172 compostos, já em DMSO, foram novamente diluídas para concentrações de 1 mg/mL, utilizando meio MH. 100 µL das soluções dos compostos foram adicionados em poços de uma microplaca contendo 96-poços. Posteriormente, 100 µL de inóculo bacteriano, na concentração de  $1 \times 10^6$  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 % m/v) foram adicionados em cada poço, sendo a placa novamente incubada durante 2 horas a 37 °C, e posteriormente observada a coloração (Sarker et al., 2007).

### **3.4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana**

O protocolo utilizado foi descrito por Elshikh e colaboradores (2016), com modificações e está de acordo com os manuais do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (BrCAST, 2018). Em uma microplaca de 96 poços, 100 µL de meio MH foram adicionados em cada poço. Posteriormente, foram preparadas as soluções contendo os compostos com meio MH. Cada poço inicial do teste recebeu 100 µL dessa solução, sendo a primeira concentração de 0,5 mg/mL. Após a homogeneização, foram realizadas onze diluições seriadas com valores variando de 0,5 mg/mL a 1,95 µg/mL.

Após a diluição seriada ter sido realizada, 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 % m/v) foram adicionados em cada poço, e a placa novamente incubada durante 2 horas a 37 °C, e posteriormente

observada a coloração. O valor da CIM foi considerado como a menor diluição do derivado em que não houve a mudança na coloração azul nos poços. Para controle positivo foi utilizado a CIM do antibiótico ampicilina (64 µg/mL), e para o controle negativo foi utilizado meio MH com DMSO (2 % v/v). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

### **3.5. Concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana**

A CBM dos compostos sintéticos que apresentaram atividade antibacteriana foi determinada de acordo com Mah (2014), com modificações. Em uma microplaca 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio MH, juntamente com 100 µL de uma solução a 0,5 mg/mL dos compostos e, posteriormente, realizadas 11 diluições seriadas (0,5 mg/mL – 0,24µg/mL). Após esse procedimento, 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, um volume de 1,5 µL foram inoculados em placa de Petri contendo meio MH-ágar. 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. A CBM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano nos inóculos transferidos para a placa de Petri. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

### **3.6. Avaliação da atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme pré-formado**

Inicialmente, o isolado MRSA-USA300 foi classificado de acordo com a sua capacidade de formar biofilme de acordo com Stepanović e colaboradores (2007), em etapa anterior.

A análise da atividade dos compostos no biofilme pré-formado foi realizada de acordo com Klein e colaboradores (2015), com modificações. Para isso, o isolado foi inoculado em microplacas de 96 poços como descrito acima. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e 200 µL de solução contendo meio MH com os compostos sintéticos 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, ao final desse período, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os poços lavados duas vezes com água destilada. A coloração com cristal violeta e a leitura de absorbância ocorreram como descritos anteriormente. Os experimentos ocorreram em triplicata biológica, sendo o resultado final a média destas repetições. Os dados foram submetidos a 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 ( $P \leq 0.05$ ).

### **3.7. Avaliação da atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme em formação**

A análise da atividade dos compostos sintéticos no biofilme em formação foi realizada de acordo com O'Toole (2011), com modificações. A partir dos valores de CIM, foram utilizadas as seguintes concentrações dos compostos sintéticos: 4xCIM, 2xCIM, 1xCIM, 1/2xCIM, 1/4xCIM e 1/8xCIM. Para isso, 100  $\mu$ L de meio MH foram adicionados em cada poço de uma microplaca 96-poços. Os compostos sintéticos foram diluídos em meio MH a fim de gerar a solução com as concentrações desejadas. Em seguida, 100  $\mu$ L dessas soluções foram acrescentados nos poços e as diluições seriadas realizadas, atingindo os valores propostos para o teste. Por fim, 100  $\mu$ L da bactéria na população de  $1 \times 10^6$  UFC/mL foram adicionados em cada poço e a microplaca incubada durante 24 horas a 37 °C. Após esse período, o meio foi retirado cuidadosamente, e os poços foram lavados duas vezes com água destilada. Posteriormente, 200  $\mu$ L de cristal violeta 0,1 % m/v foram adicionados em cada poço, e a placa incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, o cristal violeta foi retirado e a placa novamente lavada com água destilada com o objetivo de retirar o excesso do corante. Para a quantificação do biofilme, 250  $\mu$ L de ácido acético 33 % v/v foram adicionados em cada poço. Após 10 minutos em contato com o cristal violeta do biofilme, 150  $\mu$ L da solução foram retirados e transferidos para uma nova microplaca de 96 poços. As leituras de absorvância ocorreram em D.O.<sub>570nm</sub>. Meio MH com DMSO (2 % v/v) foi utilizado como controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata biológica, e o resultado final foi a média das repetições. Os dados foram submetidos a 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 ( $P \leq 0.05$ ).

### **3.8. Cinética de crescimento bacteriano na presença dos compostos sintéticos**

As seguintes análises do crescimento do isolado MRSA-USA300 foram realizadas em protocolo proposto por Yano e colaboradores (1998), com modificações. Inicialmente, para construir a curva de crescimento do isolado MRSA-USA300, a bactéria foi inoculada em um erlenmeyer de vidro contendo meio MH. Deixada em agitação a 180 rpm e a 37 °C até que atingisse a D.O.<sub>570nm</sub> de 0.5, contendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente,

foram feitas diluições para se atingir as D.Os.<sub>570nm</sub> de 0.01, 0.1 e 0.2. Em uma microplaca de 96-poços, 200 µL de inóculo bacteriano nas diferentes concentrações foram adicionadas aos poços. A placa foi incubada em um espectrofotômetro, a 37 °C, durante 24 horas. Durante este tempo, a placa passava por períodos de 15 minutos, sendo 10 minutos em estagnação e 5 minutos de agitação constante, com posterior leitura de D.O.<sub>600nm</sub>. Por fim, os dados de absorbância foram coletados para que a curva de crescimento, contendo as principais fases fosse elucidada, em especial a metade da fase exponencial, em que foram adicionados os compostos sintéticos.

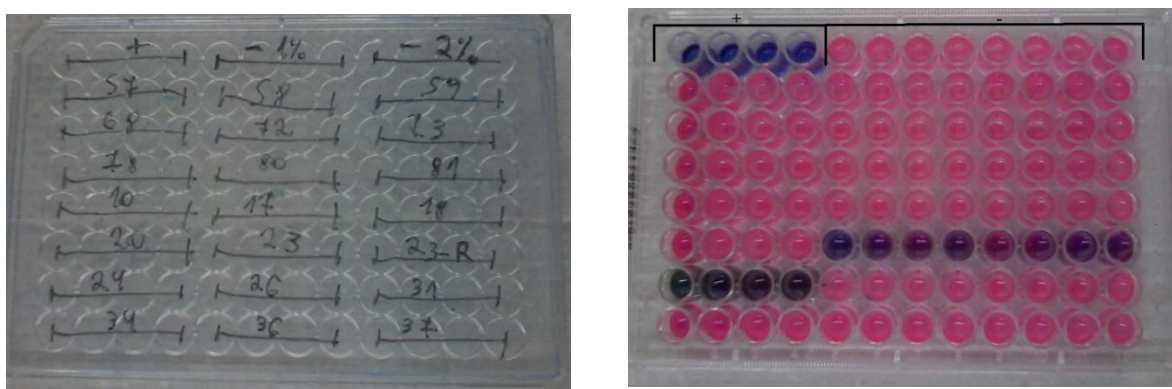
Para observar o comportamento do crescimento bacteriano na presença dos compostos sintéticos, estes foram diluídos com meio MH na concentração de 2xCIM. 100 µL dessas soluções foram adicionadas aos poços juntamente com 100 µL do inóculo bacteriano na concentração do dobro da absorbância encontrada como sendo a metade da fase exponencial. Neste caso, tanto a concentração dos compostos sintéticos quanto a concentração da bactéria caíam pela metade, ao ponto em que o experimento pudesse ser analisado. A placa foi incubada em um espectrofotômetro, a 37 °C, durante 17 horas. Durante este tempo, a placa passava por períodos de 15 minutos, sendo 10 minutos em estagnação e 5 minutos de agitação constante, com posterior leitura de D.O.<sub>600nm</sub>. O controle negativo foi realizado a partir da diluição de DMSO (2 % v/v) com meio MH.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Screening* dos compostos

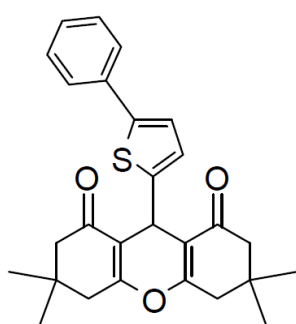
Dos 172 compostos, dois deles apresentaram atividade antibacteriana na análise de *screening* na concentração de 1 mg/mL (Figura 1). Os dois compostos, codificados de MI23 e MI24, pertencem à classe das xantenodionas (Figura 2).

Figura 1 - Compostos MI23 e MI24 apresentando atividade antibacteriana na concentração 1 mg/mL. +: Controle positivo (Meio MH com ampicilina em sua CIM). -: Controle negativo (Meio MH com DMSO na concentração de 1 % e 2 %).

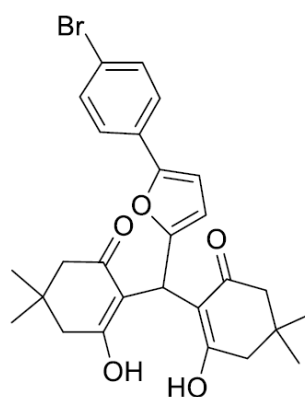


Fonte: Rodrigues, 2022, p. 103

Figura 2 - Estrutura química dos compostos codificados como MI23 e MI24.



**MI23**



**MI24**

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 103

#### 4.2. CIM e CBM dos compostos sintéticos com atividade antibacteriana

Os resultados da CIM e da CBM dos dois compostos sintéticos em MRSA-USA300 estão presentes na Tabela 2. As imagens das placas apresentando as diluições estão na Figura 3. Os valores de CIM e CBM foram iguais para ambos os compostos, sendo estas iguais a 0,25 mg/mL.

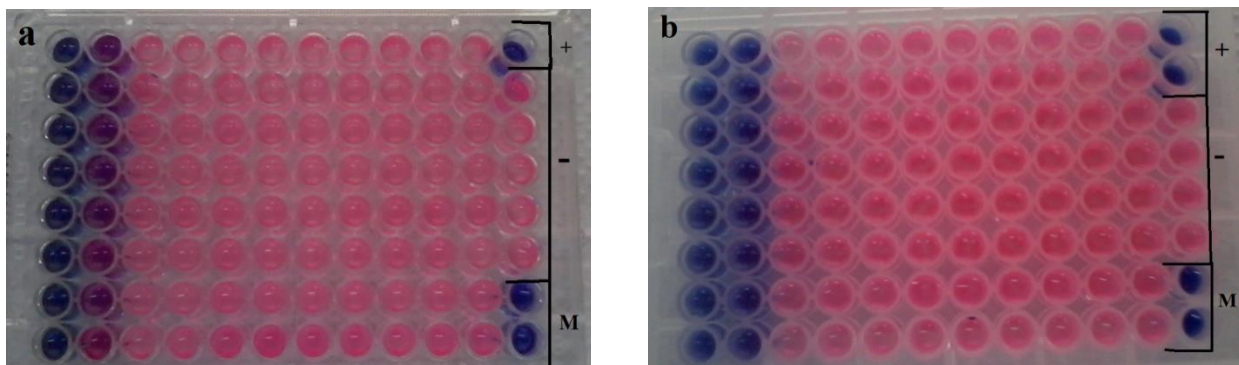
Tabela 2 - Valores de CIM (mg/mL) e CBM (mg/mL) dos compostos sintéticos em MRSA-USA300.

Compostos sintéticos	MRSA-USA300	
	CIM*	CBM**
MI23	0,25 mg/mL	0,25 mg/mL
MI24	0,25 mg/mL	0,25 mg/mL

a)\*CIM: Concentração inibitória mínima; b)\*\*CBM: Concentração bactericida mínima

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 104

Figura 3 - CIM dos compostos MI23 (a) e MI24 (a) apresentando atividade antibacteriana na concentração 0,25 mg/mL (Primeira concentração sendo 0,5 mg/mL). +: Controle positivo (Meio MH com ampicilina). -: Controle negativo (Meio MH, DMSO e inóculo bacteriano). M: Controle de meio (Meio MH).

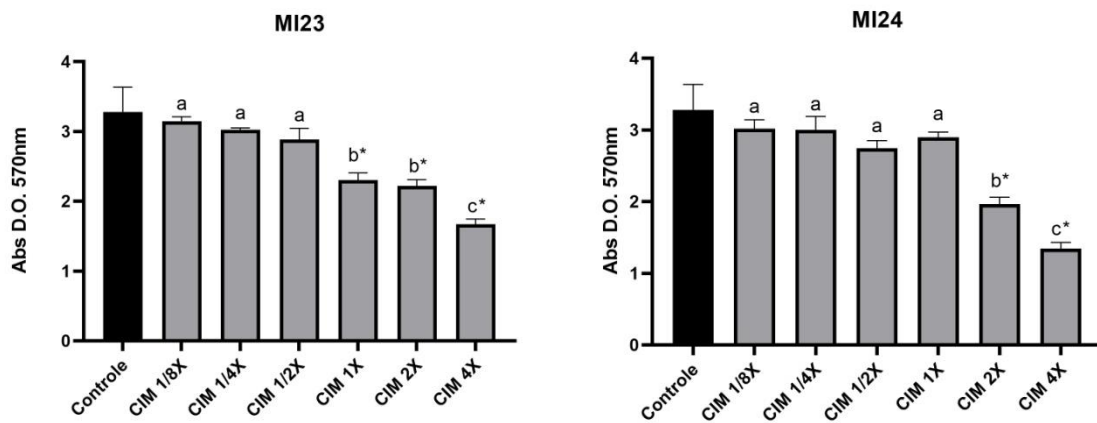


Fonte: Rodrigues, 2022, p. 104

### 4.3. Atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme pré-formado

O isolado MRSA-USA300 foi considerado como um forte formador de biofilme por critérios estabelecidos por Stepanović e colaboradores (2007) e a quantificação do seu biofilme está exposta no controle positivo dos próximos experimentos. Os resultados em percentual do rompimento do biofilme nos isolados, pela utilização dos compostos sintéticos estão representados na Tabela 3. Os resultados gráficos das análises dos compostos sintéticos nos biofilmes pré-formados dos isolados selecionados estão presentes na Figura 4. Ambos os compostos sintéticos apresentaram capacidade de rompimento do biofilme pré-formado em concentrações supra-CIM (2x e 4x), tendo o composto MI24 a capacidade de romper o biofilme em relação ao controle de 59,03 %. O composto MI23 apresentou capacidade de rompimento do biofilme na sua concentração CIM, este valor sendo de 29,82 %.

Figura 4 - Avaliação da atividade dos compostos sintéticos no biofilme pré-formado do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 105

Tabela 3 - Percentual do rompimento do biofilme pré-formado de MRSA-USA300, pelos compostos MI23 e MI24.

MRSA-USA300						
	4xCIM	2xCIM	1xCIM	1/2xCIM	1/4xCIM	1/8xCIM
MI23	49,08 %	32,33 %	29,82 %	-	-	-
MI24	59,03 %	40,08 %	-	-	-	-

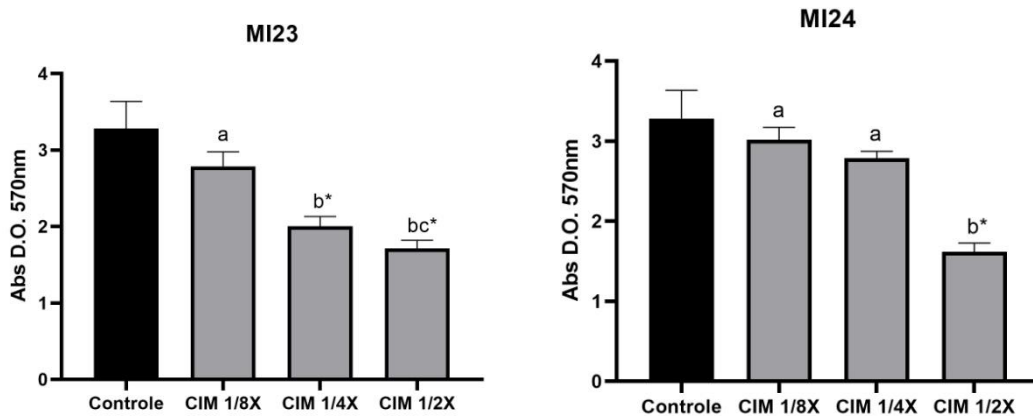
- Não significativo em relação ao controle positivo.

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 106

#### 4.4. Atividade antibiofilme dos compostos sintéticos frente ao biofilme em formação

Os resultados em percentual de inibição do biofilme em formação estão representados na Tabela 4. Os resultados gráficos das análises dos compostos sintéticos nos biofilmes pré-formados estão presentes na Figura 5. O composto MI24 foi capaz de inibir a formação do biofilme na concentração 1/2xCIM a uma taxa de 50,62 %. O composto MI23 apresentou capacidade na inibição da formação do biofilme em duas concentrações sub-CIM (1/2x e 1/4x).

Figura 5 - Avaliação da atividade dos compostos sintéticos na inibição do biofilme em formação do isolado MRSA-USA300. Letras iguais para os tratamentos que não diferenciaram pelo teste de Tukey 5 %. \* - Tratamento significativo em relação ao controle (Dunnett,  $p < 0,05$ ).



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 107

Tabela 4 - Percentual da inibição do biofilme em formação de MRSA-USA300, pelos compostos MI23 e MI24.

MRSA-USA300			
	1/2xCIM	1/4xCIM	1/8xCIM
MI23	47,85 %	38,92 %	-
MI24	50,62 %	-	-

---

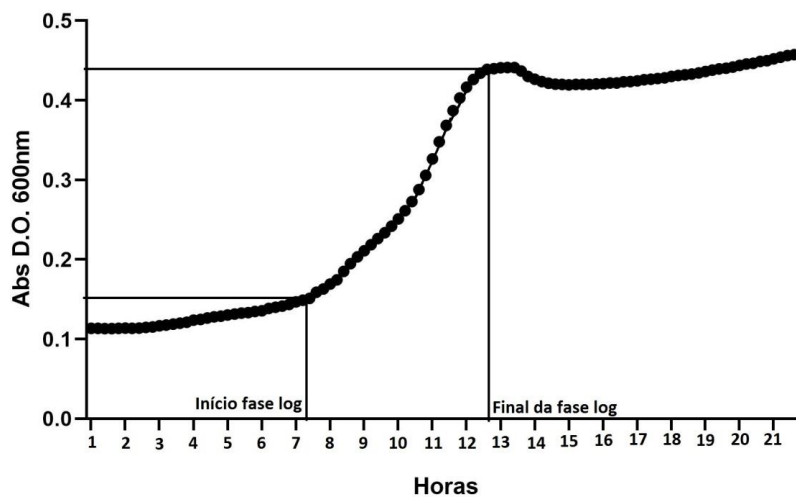
- Não significativo em relação ao controle

Fonte: Rodrigues, 2022, p. 108

#### 4.5. Cinética de crescimento bacteriano na presença dos compostos sintéticos

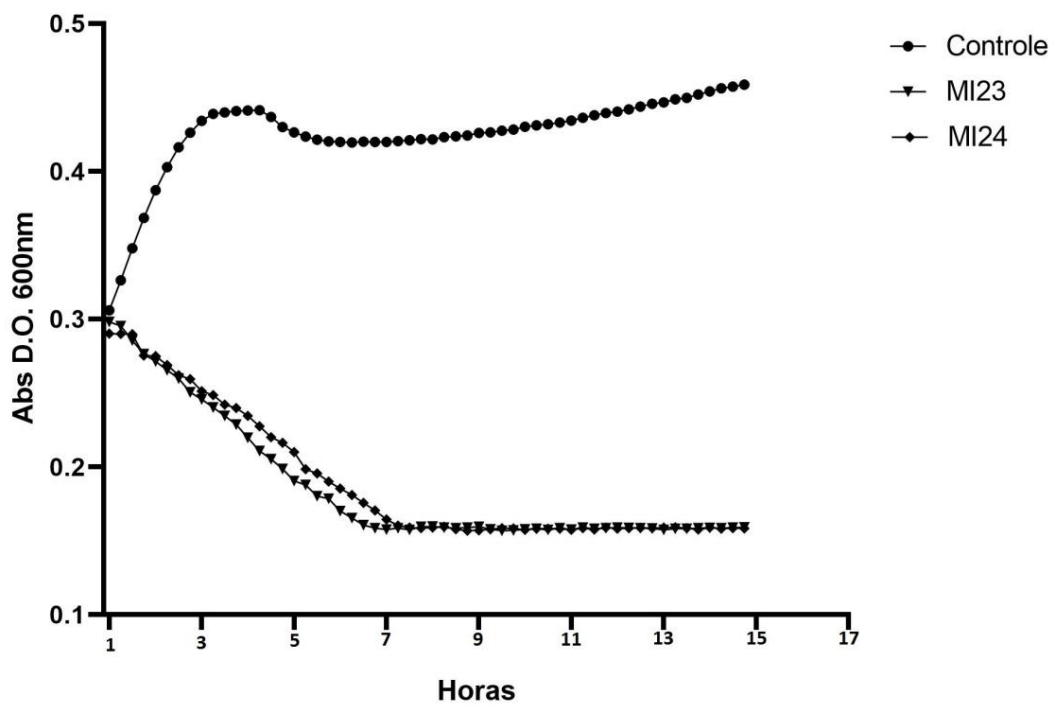
Os resultados gráficos das análises com os compostos sintéticos no crescimento do isolado MRSA-USA300 estão presentes nas Figuras 6 e 7. A Figura 6 representa a curva de crescimento do isolado em microplacas contendo meio MH, durante 24 horas. A fase *log* se inicia após as 7 horas de crescimento e finaliza perto das 13 horas. Utilizando estes dados, foi estabelecida a metade da fase *log* como sendo o momento em que a D.O.<sub>600nm</sub> é de 0,3. A partir deste valor, os compostos MI23 e MI24, foram adicionadas juntamente com a bactéria, e o resultado da curva está presente na Figura 7. Ambos os compostos apresentaram características bactericidas ao reduzir a população bacteriana aferida pela D.O.<sub>600nm</sub>, confirmando o resultado da CBM. Os dois compostos reduziram a população bacteriana até aproximadamente a sétima hora da análise. A partir deste momento, a população se estabilizou.

Figura 6 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 24 horas. O início e o final da fase *log* foram calculados e adicionados ao gráfico.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 109

Figura 7 - Curva de crescimento em microplaca do isolado MRSA-USA300, durante 17 horas na presença dos compostos MI23 e MI24 nas concentrações CIM.



Fonte: Rodrigues, 2022, p. 110

## 5. DISCUSSÃO

A resistência bacteriana a antibióticos comerciais tem resultado em apelos de diversas organizações globais para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial antibacteriano. Variados isolados de MRSA apresentam multirresistência inclusive para antibióticos considerados de último recurso. O desenvolvimento de compostos sintéticos é uma estratégia que apresenta vantagens no combate à estas bactérias, principalmente por serem passíveis de modificação estrutural visando a sua maior especificidade no mecanismo de ação. Ademais, estes compostos podem afetar vias metabólicas nas quais as bactérias não possuam mecanismos ainda para evitar a sua morte. Com isso, o objetivo do trabalho foi analisar o potencial antibacteriano e antibiofilme de compostos sintéticos de diferentes classes.

Dos 172 compostos sintéticos analisados, dois apresentaram atividade antibacteriana, sendo ambos da classe das xantenodionas. Esta classe se caracteriza, do ponto de vista estrutural, por possuir um anel pirânico fundido a dois anéis cicloexen-2-ona. Trabalhos anteriores relataram a atividade antibacteriana de derivados de xantenodionas contra *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis* (Murthy et al., 2014), *Bacillus subtilis* (Rahimifard et al., 2016) e *S. aureus* (Kaya et al., 2013). Adicionalmente, foi observada atividade antiviral (Pengsuparp et al., 1995), antitumoral (Finnegan et al., 1973) e antimalárico (Ignatushchenko et al., 2000). Chu e colaboradores (2016) relataram a CIM do antibiótico carbenicilina para o MRSA-USA300 como sendo de 32 µg/mL. Adicionalmente, os autores observaram que a CIM do antibiótico humimicina e dicloxacilina, para outro isolado de MRSA, foi respectivamente, 512 µg/ml e 256 µg/mL. Esses valores elevados comprovam a resistência de isolados MRSA contra antibióticos convencionais. O valor de CIM encontrado para ambos os compostos do estudo é semelhante à CIM de muitos antibióticos contra isolados resistentes de MRSA. Por ser uma nova classe de moléculas, pode interagir com proteínas de outras vias da célula ainda não elucidadas.

Apesar do mecanismo de ação das xantenodionas em células bacterianas ainda não ter sido descrito, estudos relataram o possível mecanismo de ação dos xantenos, precursores destas. Castano e colaboradores (2004) relataram a atividade oxidante e foto-oxidante de hidroxixantenos em bactérias. Essas moléculas podem interagir com a cadeia transportadora de elétrons, coenzimas e citocromos produzindo espécies reativas de oxigênio, causando danos à célula. Resultado semelhante foi relatado por Wang e colaboradores (2006), em que células de *S. aureus*, em contato com diferentes moléculas da classe dos xantenos, apresentaram alta concentração de espécies reativas de oxigênio. Este efeito foto-tóxico seria o responsável pela

morte de bactérias nas quais entraram em contato com derivados de xantenos. Tumir e colaboradores (2020), além de relatarem a interação de benzoxantenos com lipídeos na membrana externa de bactérias, observaram a interação dessa classe de moléculas com o DNA, RNA e proteínas relacionadas à replicação. Esse novo mecanismo de interação pode estar relacionado com o efeito bactericida das xantenodionas. Devido à interação com proteínas da síntese de DNA e RNA a célula não seria capaz de manter vias fisiológicas estáveis, causando à morte celular.

O rompimento do biofilme pré-formado e a inibição do biofilme em formação do isolado foram observados para ambos os compostos. Além de causarem a morte celular, os compostos podem interagir diretamente com a matriz de EPS e afetar diretamente a estabilidade do biofilme. Kato e colaboradores (2012) observaram que xantenos podem induzir a formação de poros na parede celular de bactérias Gram-positivas, com isso, aumentando a sua permeabilização. A matriz EPS do biofilme é composta de diversas moléculas como polissacarídeos, proteínas e minerais. Assim como há indução de poros na parede bacteriana, compostos como as xantenodionas podem interagir com componentes da camada externa do biofilme, induzindo a formação de poros. Estes podem facilitar a entrada dos compostos para atingir as células do interior do biofilme, causando a morte celular e um colapso do biofilme em determinadas regiões.

Por fim, a análise da curva de crescimento do isolado na presença dos compostos confirmou a atividade bactericida dos mesmos, tendo a população bacteriana reduzida até a sétima hora do experimento e, posteriormente, a sua estabilização. Este foi o primeiro estudo relatando a atividade bactericida de xantenodionas. Os mecanismos de ação contra bactérias como a foto-toxicidade e a interação com DNA, RNA e proteínas da replicação pode causar este efeito bactericida observado na curva de crescimento. Esta curva de morte apresenta um resultado no qual, em âmbito clínico, poderá sinalizar um possível momento para que um medicamento a base destes compostos possa ser re-administrado no paciente.

## 6. CONCLUSÕES

No presente estudo, 172 compostos foram analisados quanto à sua atividade antibacteriana. Dois compostos, da classe das xantenodionas (MI23 e MI24), apresentaram efeito antibacteriano no isolado MRSA-USA300. Ambos os compostos apresentaram concentrações semelhantes de CIM e CBM, sendo esta igual a 0,25 mg/mL, evidenciando a característica bactericida dos compostos. Ambos os compostos apresentaram eficácia no rompimento do biofilme pré-formado nas concentrações supra-CIM. O composto MI23, além de romper o biofilme nas concentrações supra-CIM, apresentou eficácia no rompimento desde na CIM, com um valor de 29,82 %. Para o biofilme em formação, o composto MI23 foi capaz de inibir a formação do biofilme em duas concentrações sub-CIM (1/2x e 1/4x), enquanto que o MI24 foi capaz de inibir a formação na concentração 1/2xCIM.

A curva de crescimento bacteriano na presença dos compostos evidenciou a característica bactericida de ambos. Os dois compostos apresentaram o pico de redução da população bacteriana em torno de 7 horas após o início do experimento. Posteriormente, a população bacteriana ficou estável em relação ao seu crescimento, mesmo na presença dos compostos. Os dois compostos sintéticos avaliados apresentam-se promissores como agentes antibacterianos no combate às infecções causadas por bactérias resistentes, a exemplo do MRSA-USA300.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Versão, 8**, 2018.

Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 1,4:279-293, 2004.

Chu, J.; Vila-Farres, X.; Inoyama, D.; Ternei, M.; Cohen, L. J.; Gordon, E. A.; Jaskowski, M. Discovery of MRSA active antibiotics using primary sequence from the human microbiome. **Nature Chemical Biology**, 12(12):1004, 2016.

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. **Biotechnology Letters**, 38(6):1015 - 1019, 2016.

Finnegan, R. A.; Merkel, K. E.; Patel, J. K. Constituents of *Mammea americana* L. XII: Biological data for xanthenes and benzophenones. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 62(3):483-485, 1973.

Ignatushchenko, M. V.; Winter, R. W.; Riscoe, M. Xanthenes as antimalarial agents: stage specificity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 62(1):77-81, 2000.

Kato, H.; Komagoe, K.; Nakanishi, Y.; Inoue, T.; Katsu, T. Xanthene dyes induce membrane permeabilization of bacteria and erythrocytes by photoinactivation. **Photochemistry and Photobiology**, 88(2):423-431, 2012.

Kaya, M.; Demir, E.; Bekci, H. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel xanthene sulfonamide and carboxamide derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 28(5):885-893, 2013.

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**, 10(3):e0120514, 2015.

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)**, 83:e50854-e50854, 2014.

Murthy, Y. L. N.; Mahesh, P.; Devi, B. R.; Durgeswarai, L. K.; Mani, P. Synthesis and Antibacterial Assay of 9-Substituted Aryl-1, 8-dioxo-octahydroxanthenes. **Asian Journal of Chemistry**, 26(15):4594, 2014.

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

Pengsuparp, T.; Cai, L.; Constant, H.; Fong, H. H.; Lin, L. Z.; Kinghorn, A. D.; Hughes, S. H. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. **Journal of Natural Products**, 58(7):1024-1031, 1995.

Rahimifard, M.; Ziarani, G. M.; Badiei, A.; Asadi, S.; Soorki, A. A. One-pot solvent-free synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives using sulfonic acid-functionalized LUS-1 and their antimicrobial activities. **Research on Chemical Intermediates**, 42(4):3847-3861, 2016.

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**, 42(4):321-324, 2007.

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**, 115(8):891-899, 2007.

Tumir, L. M.; Zonjić, I.; Žuna, K.; Brkanac, S. R.; Jukić, M.; Huđek, A.; Stojković, M. R. Synthesis, DNA/RNA-interaction and biological activity of benzo [k, l] xanthene lignans. **Bioorganic Chemistry**, 104:104190, 2020.

Wang, H.; Lu, L.; Zhu, S.; Li, Y.; Cai, W. The phototoxicity of xanthene derivatives against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, 52(1):1-5, 2006.

Yano, Y.; Oguma, T.; Nagata, H.; Sasaki, S. Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of in vitro bactericidal kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 87(10):1177-1183, 1998.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO PERMANENTE DE PROPRIEDADE INTELECTUAL  
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA



A Comissão Permanente de Propriedade Intelectual (CPPI), Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), instituída pela Portaria nº 0769/99, Ato nº 00021/2019/PPG, por meio da sua Presidente Professora Maria Catarina Megumi Kasuya, declara, para os devidos fins, que a Professora Marisa Alves Nogueira Diaz, vinculada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, solicitou o auxílio do NIT no processo de depósito de dois pedidos de patente inicialmente intitulados "Uso de compostos derivados de xantenodionas para tratamento de infecções por bactérias multidroga resistente" e "Composição farmacêutica contendo óleos essenciais para tratamento de infecções por bactérias multidroga resistente" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Os pedidos de patente vieram acompanhado dos seguintes documentos:

- 1) Relatório descritivo com a busca de anterioridades;
- 2) Figuras;
- 3) Reivindicações;
- 4) Contrato de inventores autores;
- 5) Questionário para conhecimento da invenção.

No momento o processo irá passar pelo crivo dos analistas do NIT para eventuais correções e assim, dar início ao depósito junto ao INPI.

Viçosa, 26 de janeiro de 2022.

  
Maria Catarina Megumi Kasuya