

Ac:133219
Req: 4070529
Data: 23/04/2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng FRENTE A CEPAS DE BACILOS
ANAERÓBIOS GRAM NEGATIVOS**

D 616.9041
M 491a
Enc: 1

FORTALEZA/CE

2012

HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng FRENTE A CEPAS DE BACILOS
ANAERÓBIOS GRAM NEGATIVOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho

FORTALEZA/CE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M492a Mendes, Hermínio Benítez Rabello .

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng frente a cepas de bacilos anaeróbios gram negativos / Hermínio Benítez Rabello Mendes. – 2012.
82 f. : il. color. ; 30 cm.

M492a Mendes, I. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal
Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal
Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

CDD 616.9041

I. Bactérias Anaeróbicas. 2. *Plectranthus*. 3. Óleos Voláteis I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES**, REALIZADA NO DIA VINTE E TRÊS DE MARÇO DO ANO DE DOIS MIL E DOZE.

Às catorze horas do dia vinte e três de março do ano de dois mil e doze, na Sala de aula do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, realizou-se a Sessão de Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno **HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES**, intitulada: "Atividade do óleo essencial Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng contra cepas de bacilos gram negativos anaeróbios". A Banca Examinadora foi composta pelos professores doutores: **CIBELE BARRETO MANO DE CARVALHO (ORIENTADORA)**, **KENIO COSTA DE LIMA (UFRN)** **MÁRCIA MARIA DE NEGREIROS PINTO ROCHA (UNIFOR)** E **ROSSANA DE AGUIAR CORDEIRO (UFC)**. A sessão foi aberta pela Coordenadora, **Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst**, que apresentou os membros da Banca Examinadora e passou à palavra ao candidato. Após a exposição, seguiu-se o processo de arguição do mestrando. A primeira examinadora foi a doutora Márcia Maria de Negreiros Pinto Rocha. Logo após procederam à arguição os professores doutores Kenio Costa de Lima e Rossana de Aguiar Cordeiro. Em seguida a Banca Examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do candidato. Por unanimidade a Banca Examinadora considerou **APROVADO** o trabalho do Mestrando. Nada mais havendo a relatar a sessão foi encerrada às (s) 17:00 horas. Esta ata depois de lavrada, lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora. Fortaleza, vinte e três de março de dois mil e doze.

Cibe Barreto Mano de Carvalho
Prof. Dr. Cibe Barreto Mano de Carvalho
(Orientadora)

Kenio Costa de Lima
Prof. Dr. Kenio Costa de Lima
(UFRN)

Márcia Maria de Negreiros Pinto Rocha
Profa. Dra. Márcia M^a de Negreiros Pinto Rocha
(UNIFOR)

Rossana de Aguiar Cordeiro
Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
(UFC)

*À Deus, minha eterna fonte de inspiração e iluminação para
alcançar todos os meus objetivos
Aos meus pais, Mendes e Profª Maria José, meus irmãos
Prof. Charles e Fafá e a minha namorada
Mari Arruda, minha pequena companheira de
todas as horas,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e toda a glória deste trabalho, pois estando com ele tudo posso.

Logo após minha graduação, envolto pela napa do desemprego e esperando ser absorvido pelo mercado de trabalho, um pequeno convite do Prof. Dr. Valério Monteiro Neto me abriu as portas para uma grande viagem dentro do mundo dos microrganismos.

Esta, não seria uma viagem tranquila.

Hoje, sei que fui certo ao preferir ingressar este caminho e agradeço a todos que depositaram em mim confiança e credibilidade no momento da minha escolha maior, entrar para o mestrado de Microbiologia Médica.

Sem vocês amigos, jamais chegaria até aqui. Muito obrigado!

Gostaria de começar, agradecendo quem me ajudou a chegar literalmente ao mestrado, Wandyson Oliveira, o Baleia, este amigo de infância e para todas as horas, valeu irmão.

A um velho amigo cearense, Nadir, pela amizade e auxílio nas indas e vindas.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cibelle Barreto Mano de Carvalho, por ter me aceito e pelo privilégio de ter trabalhado ao seu lado no mundo dos anaeróbios. Você professora, faz a diferença diante de tantos iguais.

À minha namorada, amiga, companheira, confidente e dentre outras mais, Mariana Arruda, pessoa especial, humilde e bem quista por todos, que esteve presente em todos os momentos importantes da minha vida acadêmica. Mari, sei que nem tudo saiu como queríamos, porém tudo que Deus faz é bom e ele sempre sabe o que faz. Obrigado por mais esta conquista.

A Jamila Ricarte, por toda amizade, ajuda e diálogo nos momentos de bancada, esta conquista também é sua Rolim.

Aos Professores Bruno Jeagler e Olavo pelas explicações e pelo tradicionalíssimo café, que depois virou *capuccino* na sala dos alunos. Muito obrigado amigos!

A Rosa Freire, a rosinha do LAFICA, na construção das imagens microscópicas utilizadas no trabalho. E como ela me disse uma vez: “Quem tem como me pagar, nunca está me devendo”. Muitíssimo obrigado Rosa!

Aos amigos do Doutorado Carlos Eduardo e Manoel Paiva, pela ajuda na elaboração dos experimentos com *Artemia* sp. Amigos da Micologia, vocês são os caras.

Aos Tios Ricardo e Conceição pela ajuda no processo de estabilização. No momento em que mais precisei vocês me acolheram, agora, os frutos desta conquista são de vocês também. Obrigado por tudo!

À inabalável colega Kylvia Maria. Valeu amiga pelos momentos de lazer.

A Carol, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela sinceridade, amizade e disponibilidade em sempre ajudar-me, mesmo estando longe. Gracias Carol.

Aos meus irmãos, Charles e Fafá, pelo apoio, carinho e torcida para que tudo desse certo. Obrigado irmãos!

Aos meus Pais, especialmente minha mãe, este exemplo de moral e dignidade. Sempre quando vejo você mãe, tento ser um pouco igual a ti. E se algum dia conseguir, saberei que estará feliz. Muito obrigado pela educação que me deste. Te amo mãe!

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação, na pessoa do Prof. Dr. Júlio Sidrim, este verdadeiro “mestre de obras” da Microbiologia Médica, pela oportunidade de fazer este curso de mestrado.

À banca de qualificação, professoras Dr^a Rossana Aguiar e Dr^a Cristiane Cunha, pelas sugestões, críticas e exemplo de postura ética e moral.

Ao Laboratório de Química do Programa de Pós-Graduação, em especial ao aluno Carlos, pela ajuda na análise química da planta. Obrigado!

A todos os colegas de bancada do Laboratório de Bacteriologia.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta dissertação.

OBRIGADO!

*“Os obstáculos não podem te deter.
Os problemas não podem te deter.
Mais que tudo, outras pessoas não podem te deter.
Somente você pode deter a si mesmo.”*

Jeffrey Gitomer

RESUMO

Os microrganismos anaeróbios constituem um importante grupo bacteriano implicados na etiologia de diversos processos infecciosos, sendo considerados potenciais patógenos oportunistas. Dentro deste grupo destacam-se os bastonetes Gram negativos, bactérias associadas com doenças periodontais, abscessos e infecções de ferida cirúrgica. Como alternativa para o tratamento dessas infecções, o uso de plantas medicinais tem ganhado força, uma vez que muitos desses patógenos estão se mostrando resistentes às terapias antibacterianas usuais. Diante disto, este estudo teve por objetivo investigar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial (OE) de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng contra cepas de bacilos Gram negativos anaeróbios. Para tanto, o OE foi obtido por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa. Sua concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de diluição em agar e os efeitos da sua ação sobre a parede celular e membrana plasmática foram analisados por microscopia de força atômica. Após análise do OE, o carvacrol foi o componente majoritário (90,5%). Os valores obtidos de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima variaram respectivamente, entre 64-128 µg/mL e a curva de crescimento bacteriano apontou um sugestivo efeito bactericida e bacteriostático. Portanto, estes resultados sugerem que o óleo essencial de *P. amboinicus* possui atividade contra bacilos Gram negativos anaeróbios. Tais dados ainda são corroborados pela utilização desta planta na medicina popular para o tratamento de infecções causadas por outros bacilos Gram negativos.

Palavras-chave: *Plectranthus amboinicus*. Bacilos Gram negativos anaeróbios. Óleo essencial. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The anaerobic microorganisms are an important bacterial group involved in the aetiology of various infectious processes, being considered powerful opportunistic pathogens. Inside this group the gram negative bacteria associated with periodontal disease, abscess and wound infection stand out from the others. As an alternative for the treatment of these infections, the use of medicinal plants has gained strength, since many of these pathogens are proving resistant to usual antibacterial therapy. Therefore, this study aimed to investigate the *in vitro* antibacterial activity of essential oil (EO) of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against anaerobic Gram negative strains involved with those diseases. Thus, the EO was obtained by hydrodistillation and analized by gas chromatography mass spectrometry. The minimal inhibitory concentration was determined by the agar dilution method and the effects of their action on cell wall and cell membrane was examined by atomic force microscopy. After analisys of the EO carvacrol (90.5%) was the major component. The rates of minimal inhibitory concentration and minimal bacterial concentration range respectively, between 64-128 $\mu\text{g/ml}$ and the bacterial kill curve showed a suggestive bacteriostatic and bactericidal effect. These results suggest that the *P. amboinicus* essential oil has activity against Gram negative anaerobes. These data corroborate with the use of this plant in the folk medicine for the treatment of infections caused by other Gram negative bacteria.

Key words: *Plectranthus amboinicus*. Gram negative anaerobes. Essential oil. Antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Aspecto morfotintorial de esfregaço de cultura microbiana corado pelo método de Gram	20
FIGURA 1 (a) <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285.....	20
FIGURA 1 (b) <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586.....	20
FIGURA 2 – Modelo de desenvolvimento do biofilme	28
FIGURA 3 – Folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng (Malvaricô) cultivada no horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Ceará	35
FIGURA 4 – Placas controle de pré e pós aerobiose e pré e pós anaerobiose.....	69
FIGURA 5 – Larva de <i>Artemia</i> sp. durante a fase de metanáuplio II	70
FIGURA 6 – Esquema do aquário utilizado para eclosão dos cistos de <i>Artemia</i>	71
FIGURA 7 – Cromotograma (CG/EM) do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.....	73
FIGURA 8 – Espectro de massas do 4-terpineol	74
FIGURA 9 - Espectro de massas do carvacrol	74
FIGURA 10 - Espectro de massas do β -cariofileno	75
FIGURA 11 - Espectro de massas do α -Bergamoteno	75
FIGURA 12 - Espectro de massas do óxido de cariofileno	75
FIGURA 13 - Porcentagem de absorção do cristal violeta por <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741 após exposição a concentração de 128 μ g/mL do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng por 1 hora	77
FIGURA 14 - Porcentagem de absorção do cristal violeta por <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 após exposição a concentração de 128 μ g/mL do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng por 1 hora	77
FIGURA 15 - Porcentagem de absorção do cristal violeta por <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 após exposição a concentração de 128 e 64 μ g/mL do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng por 1 hora	78
FIGURA 16 – Imagens de Microscopia de Força Atômica de <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	78
FIGURA 16 (a) Cultura anaeróbia controle	78
FIGURA 16 (b) - Cultura anaeróbia após exposição a concentrações inibitórias (64 μ g/mL) do OE de <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng por 1 hora, mostrando células lisadas	78
FIGURA 17 – Porcentagem de larvas de <i>Artemias</i> sp. mortas em relação ao aumento da concentração do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng, evidenciada pelos pontos no gráfico. A CL ₅₀ é observada entre 36,55 a 37,91 μ g/mL do óleo.....	79

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Preparo das soluções de antimicrobianos.....	67
QUADRO 2 – Meio de cultura e preparo das placas.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng..... 74

TABELA 2 – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, carvacrol e carvacrol + timol sobre as cepas bacterianas testadas..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCC – ácido graxo de cadeia curta
ASA – agar sangue
ATCC – American Type Culture Collection
BFT – toxina do *B. fragilis*
BHIS – infusão de cérebro e coração bovino suplementado
CAT – enzima catalase
CIM – concentração inibitória mínima
CL₅₀ – concentração letal para 50% das larvas
CV – cristal violeta
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
Eh – potencial de óxido-redução
eV – elétron-volts
GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a um espectrofômetro de massa
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IR – índice de retenção de kovats
LPS – lipopolissacarideo
MCVL – microscópio confocal de varredura a laser
MEC – matriz extracelular
MEV – microscópio eletrônico de varredura
MFA – microscópio de força atômica
CBM – concentração bactericida mínima
NA₂SO₄ – sulfato de sódio anidro
OE – óleo essencial
PBS – tampão salina fosfato
RNAr – ácido ribonucléico ribossômico
SDC – sangue desfibrinado de carneiro
SOD - enzima superóxido dismutase
SPE – substância polimérica extracelular
Supra-CIM – concentração supra-inibitória mínima
UFC – unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Microrganismos anaeróbios	16
1.2 Bacilos Gram negativos anaeróbios	17
1.2.1 Aspectos taxonômicos	17
1.2.2 Aspectos morfológicos e fisiológicos	18
1.2.3 Patogenicidade	21
a) Infecções intra-abdominais	22
b) Infecções de pé diabético	22
c) Infecções de ferida cirúrgica	22
1.2.4 Virulência	23
a) Cápsula	24
b) Adesão e invasão às células do hospedeiro.....	24
c) Toxinas	24
d) Produção de metabólitos	25
e) Enzimas de defesa antioxidante	25
f) Biofilmes	26
1.3 Biofilmes	26
1.3.1 <i>Quorum Sensing</i>	29
1.3.2 Biofilmes e anaeróbios.....	30
1.4 Sensibilidade a Antimicrobianos entre bacilos Gram negativos anaeróbios	30
1.5 Plantas medicinais	33
1.5.1 Gênero <i>Plectranthus</i>	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 PERGUNTA DE PARTIDA	38
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	38
5 OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo Geral	39
5.2 Objetivos Específicos.....	39
6 ARTIGO	40
7 CONCLUSÃO	56

REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	66
Apêndice 1 – Metodologia complementar	67
Apêndice 2 – Resultado complementar	73
Apêndice 3 – Referência complementar	80
ANEXOS	81
Anexo I - Informe das bactérias adquiridas a partir do INCQS.....	82
Anexo II – Nota fiscal compra de bactérias a partir da BIOSCAN.....	85
Anexo III – Análise cromatográfica do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microrganismos anaeróbios

Os microrganismos anaeróbios constituem também um importante grupo de patógenos bacterianos implicados na etiologia dos mais diversos processos infecciosos.

O fenômeno biológico da anaerobiose foi descrito em 1861 por Pasteur que cunhou o termo anaeróbios (anaérobies) para microrganismos que não requerem oxigênio para seu crescimento (CITRON, 2001). Coube a Veillon e Zuber (1898) o isolamento do primeiro microrganismo anaeróbio de um processo infeccioso. A partir de então ocorreu um avanço no estudo destes microrganismos, em especial dos anaeróbios esporulados do gênero *Clostridium*, por serem responsáveis por quadros clínicos graves e específicos associados à produção de toxinas, como o tétano, botulismo, entre outros. Os demais gêneros de bactérias anaeróbias não esporuladas de importância médica causam quadros clínicos inespecíficos e compreendem espécies da microbiota humana, especialmente do meio ambiente oral, do trato gastrintestinal e trato geniturinário, porém nas últimas décadas têm sido reconhecidas como causadoras de significativa morbidade e mortalidade mundialmente (FINEGOLD, 1995).

Segundo Bartlett (1989), o declínio nas pesquisas sobre bactérias anaeróbias ocorreu com o advento dos antimicrobianos e com o surgimento das duas grandes guerras mundiais na primeira metade do século XX e recrudesceu na década de 60, provavelmente devido à simplificação nas técnicas de isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias, tendo a escola americana um importante papel no desenvolvimento destes avanços tecnológicos. Atualmente, são utilizadas como técnicas e instrumentos para o cultivo e isolamento de bactérias anaeróbias a jarra Gas Pak®, a câmara de anaerobiose para manutenção de anaerobiose contínua, o sistema de meios pré-reduzidos e esterilizados em anaerobiose e os envelopes geradores de anaerobiose (KONEMAN et al., 2008).

Hoje, sabe-se que a maioria das infecções anaeróbias humanas são causadas por microrganismos anaeróbios da microbiota da pele, trato gastrintestinal, meio ambiente oral e trato geniturinário. Os anaeróbios não esporulados, particularmente os bastonetes Gram negativos, estão envolvidos numa frequência pelo menos dez a quinze vezes maior que os anaeróbios do gênero *Clostridium* (FINEGOLD, 1995).

1.2 Bacilos Gram negativos anaeróbios

1.2.1. Aspectos taxonômicos

Nos últimos anos os bacilos Gram negativos anaeróbios passaram por várias mudanças taxonômicas decorrentes da introdução de novos métodos para identificação destas bactérias, principalmente através de estudos de homologia de DNA e sequenciamento da região 16S do RNA ribossômico (RNAr). As principais mudanças ocorreram particularmente no gênero *Bacteroides*, que atualmente é composto apenas por bacilos Gram negativos resistentes à bile. Os bacilos Gram negativos, sacarolíticos pigmentados e não pigmentados, outrora desse gênero, foram transferidos para o gênero *Prevotella* e as espécies assacarolíticas pigmentadas para o gênero *Porphyromonas* (JOUSIMIES-SOMER; SUMMANEN, 2002).

O gênero *Bacteroides* comprehende 22 espécies, das quais *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides thetaiotaomicron* são os patógenos proeminentes (WEXLER, 2007). Em 1974, no Manual Bergey de Determinação Bacteriológica, estudos morfológicos e fisiológicos realizados por Holdeman e Moore subclassificaram as espécies de *B. fragilis* em *B. fragilis* subespécie *vulgatus*, *B. fragilis* subsp. *distasonis*, *B. fragilis* subsp. *ovatus*, *B. fragilis* subsp. *thetaiotaomicron*, *B. fragilis* subsp. *eggerthii* e *B. fragilis* subsp. *uniformis*. Posteriormente, com o advento da biologia molecular, verificou-se que essas subespécies eram geneticamente distintas, voltando a vigorar a classificação como espécies do gênero *Bacteroides* incluídas no grupo *B. fragilis* (CATO; JOHNSON, 1976).

Em 1984, o grupo *B. fragilis* era constituído de sete espécies: *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus*. Em 1986, três novas espécies foram adicionadas ao grupo: *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris* e em 2005 várias espécies foram incorporadas ao gênero, incluindo *B. goldsteinii*, *B. nordii*, *B. salyersai*, *B. plebeius*, *B. coprocola*, *B. massiliensis*. Em 2006, a partir de estudos realizados em ceco de galinha, outras três novas espécies foram adicionadas e, no mesmo ano, houve uma reclassificação taxonômica para um novo gênero e as espécies *B. merdae*, *B. distasonis* e *B. goldsteinii* foram incorporadas ao novo gênero denominado *Parabacteroides* (BOENTE et al., 2010).

O gênero *Fusobacterium* (do latim *fusos*, alongado) foi proposto por Korn em 1923 para bacilos pontiagudos não esporulados e Gram negativos (Figura 1b). Pertence à família *Fusobacteriaceae* que comprehende cinco subespécies: *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *animalis*, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*, *F. nucleatum*

subsp polimorphum e *F. nucleatum vincentii*. As fusobactérias são diferentes dos bacteróides pela produção de quantidades maiores de ácido *n*-butírico. A espécie *F. nucleatum* é a mais frequente em infecções humanas, sendo isolada do meio ambiente oral, trato respiratório superior, gastrintestinal e geniturinário feminino. As espécies do gênero *Fusobacterium* mais comumente isoladas a partir de mucosas são *F. nucleatum* e *F. necrophorum* que, embora sejam comensais, podem atuar como patógenos oportunistas, estando implicados em diversas infecções que acometem o homem e outras espécies animais (CITRON, 2002).

1.2.2 Aspectos morfológicos e fisiológicos

Dentre as bactérias anaeróbias, as espécies do grupo *B. fragilis* têm como característica a aerotolerância e apesar de não crescerem na presença de oxigênio, podem sobreviver à sua exposição por tempos prolongados, devido a presença de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) que lhes conferem alta resistência à oxidação (MEEHAN; MALAMY, 2011). Esta característica explica em parte a maior frequência de isolamento destas espécies em infecções extraintestinais, infecções de ferida cirúrgica, pé diabético, bacteremia, entre outras (BROOK, 2010).

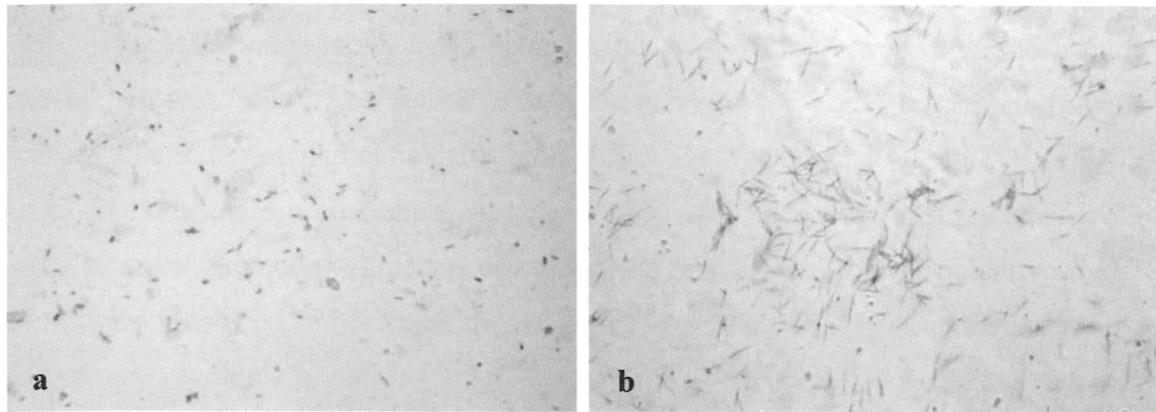
Durante muitos anos, bactérias anaeróbias foram definidas como microrganismos que só poderiam crescer na ausência de oxigênio. Entretanto, no ano de 1969, Loesche propôs uma nova classificação para bactérias anaeróbias, baseada no gradiente de concentração de oxigênio presente na natureza. Segundo o autor, a concentração de oxigênio varia de 0 a 21% e se distribui nos mais variados nichos ecológicos. As bactérias anaeróbias diferem na sua sensibilidade ao oxigênio e segundo sua classificação podem ser divididas em dois grupos: anaeróbias estritas, incapazes de crescer em ambientes com concentração de oxigênio maior que 0,5% e anaeróbias moderadas, capazes de crescer em ambiente contendo 2 a 8% de oxigênio e, ainda podem ser expostas ao oxigênio ambiental por aproximadamente 60 a 90 minutos sem perder sua viabilidade.

Walden e Hentges (1975), estudando os efeitos do oxigênio e do potencial de óxido-redução (Eh) na multiplicação de bactérias anaeróbias, concluíram que a eliminação do oxigênio do ambiente de cultivo é provavelmente mais importante que um Eh negativo. O oxigênio é um dos componentes que influenciam o Eh do habitat e sua ação inibitória é geralmente atribuída a sua capacidade de aumentar o potencial redox. Mesmo que o oxigênio seja totalmente retirado do ambiente, alguns anaeróbios

não irão crescer se o potencial redox for alto demais. Da mesma forma, algumas bactérias podem tolerar concentrações elevadas de oxigênio se o Eh for mantido em níveis baixos (MARSH; MARTIN, 2009). A explicação para a intolerância estaria relacionada à reatividade do oxigênio e de seus radicais livres, que se formam durante o metabolismo bacteriano e a ausência ou a presença em reduzidas concentrações de enzimas como CAT e SOD.

Já para Imlay (2008), este modelo tradicional é insustentável, visto que na natureza nenhum habitat é totalmente livre da incursão ocasional do oxigênio. Nas últimas décadas, com o sequenciamento do genoma de muitas bactérias, em especial das anaeróbias, foi descrito que outras enzimas como superóxido redutase e peroxidase podem atuar como neutralizadoras do oxigênio e seus metabólitos. Experimentos realizados com bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*, têm demonstrado que elas possuem estas enzimas neutralizadoras, porém a presença de uma molécula repressora dificulta a resposta na presença do oxigênio e outros compostos tóxicos. De um modo geral, tem sido aceito que os anaeróbios causadores de doença são capazes de tolerar exposição ao oxigênio e que a CAT e SOD inativam o peróxido de hidrogênio e radicais livres superóxidos, respectivamente, presentes em muitas amostras patológicas (WALDEN; HENTGES, 1975).

Bactérias do grupo *Bacteroides fragilis* são quimioheterotróficas e sacarolíticas, não formadoras de esporos, Gram negativas, imóveis, pequenas e pleomórficas, com extremidades arredondadas, apresentando diâmetro de 0,5-0,8 μ m e 1,5-4,5 μ m de comprimento, sendo a maioria das cepas encapsuladas. Fazem parte da microbiota do intestino do homem e de outros animais, principalmente no cólon (KONEMAN et al., 2008) (Figura 1a).



Fonte: MENDES, 2011

Figura 1. Aspecto morfotintorial de esfregaço de cultura microbiana corado pelo método de Gram, utilizando objetiva de imersão (aumento de 100 x). (a) *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e (b) *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

As bactérias anaeróbias crescem em meios de cultura contendo carboidratos, amônia, hemina, vitamina B12, sais orgânicos e agentes redutores. Uma característica das espécies do grupo *B. fragilis* consiste no estímulo de seu crescimento pela bile, que funciona como base para seu cultivo em meio seletivo, bastante utilizado no isolamento a partir de fezes ou materiais clínicos. São ainda bactérias onde seus produtos de fermentação de carboidratos são o lactato, succinato, acetato e propionato cuja análise por cromatografia gasosa permite a diferenciação das espécies (KONEMAN et al., 2008).

O gênero *Fusobacterium* comprehende bacilos fusiformes, Gram negativos, fracamente fermentadores de carboidratos que produzem butirato como principal produto final do seu metabolismo. Em geral, estes microrganismos metabolizam pequenos peptídeos ou, preferencialmente, aminoácidos, como o glutamato, sua principal fonte de energia (SUMMANEN, 1993; KONEMAN et al., 2008) (Figura 1b).

Porphyromonas gingivalis são cocobacilos Gram negativos, pleomórficos, componentes naturais da microbiota oral e agente causador de doença periodontal (exemplo: periodontite), otite media crônica e apendicite perfurativa. Apresentam limitada capacidade de fermentar carboidratos e ampla capacidade proteolítica. *P. gingivalis* invade e se replica em células endoteliais humanas, produzindo uma matriz de fatores de virulência, incluindo proteases extracelulares, como colagenase e fosfolipase A. Para invadir as células hospedeiras, as fimbrias bacterianas se conectam a receptores celulares do tipo $\beta 1$ -integrina (YILMAZ, 2008).

Prevotella intermedia, antes denominada *Bacteroides intermedius*, são bacilos curtos, imóveis, não esporulados e quimiorganotróficos, que fermentam alguns carboidratos e apresentam atividade proteolítica. As bactérias do gênero *Prevotella* estão bem adaptadas a ambientes estritamente anaeróbios do trato gastrintestinal e do sulco gengival. Acredita-se que sua capacidade de resposta ao estresse oxidativo figure como uma adaptação importante durante o processo de saída do ambiente anaeróbico natural para colonizar tecidos mais oxigenados, bem como resistir aos eventos oxidativos do sistema imunológico do hospedeiro (SANTOS, 2007). Essas bactérias participam da etiologia da gengivite e outras patologias da cavidade oral. (BROOK, 2009).

1.2.3 Patogenicidade

As bactérias anaeróbias são potentes patógenos oportunistas, podendo ser isoladas de diversos tipos de infecção em humanos e em outros hospedeiros animais. A grande maioria dessas infecções é originária de desequilíbrios nas populações da microbiota anfibiônica. No trato intestinal humano, mais especificamente no cólon, as bactérias anaeróbias obrigatórias superam as bactérias anaeróbias facultativas numa proporção de 1000:1 e, aproximadamente 65% desta população microbiana pertence ao gênero *Bacteroides*. As bactérias anaeróbias de relevância clínica pertencem a poucos gêneros, os Gram-negativos e o grupo *Bacteroides fragilis* são os mais importantes, seguido por *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp. e *Bilophila* spp. (JOUSIMIES-SOMER et al., 2003; WEXLER, 2007).

Os mecanismos de participação dos microrganismos anaeróbios, em especial dos bacilos Gram negativos, na patogênese de muitos processos infecciosos na clínica humana e veterinária ainda são muito discutidos (GAETTI-JARDIM et al., 2010). A espécie *B. fragilis* responde por 0,5% da micobiota do cólon, entretanto é o anaeróbio mais isolado de infecção humana, explicado pela produção de potentes fatores de virulência. Entre os bacilos Gram negativos anaeróbios, é o mais estudado em relação à patogenicidade, fator de virulência e resistência a antimicrobianos (OYSTON, HANDLEY, 1991).

a) Infecções intra-abdominais

Uma das infecções em que mais frequentemente participam os bacilos Gram negativos anaeróbios, principalmente as espécies do grupo *B. fragilis*, são as infecções intra-abdominais, que ocorrem após a entrada de microrganismos na cavidade peritoneal, geralmente a partir de um trauma (HAO; LEE, 2004). Estas infecções são geralmente acompanhadas por deposição de fibrina na cavidade abdominal. Tal fenômeno pode conduzir a formação de aderências e abscessos. Os abscessos abdominais são geralmente polimicrobianos, no entanto, em 70% dos casos o principal agente etiológico são as bactérias anaeróbias. O *B. fragilis* é o microrganismo mais encontrado, seguido pelos cocos anaeróbios e *Clostridium* sp. (TZIANABOS et al., 1993).

b) Infecções de pé diabético

Úlceras nos pés estão entre as principais causas de morbidade em indivíduos diabéticos, representando a causa mais comum de internação nesta população (CARAVAGGI et al., 2009). Geralmente sua etiologia é de origem polimicrobiana. Nas infecções mais superficiais, as bactérias aeróbias são os organismos proeminentes, no entanto, nas infecções mais profundas, anaeróbios Gram negativos são mais frequentemente encontrados.

Num estudo realizado por Viswanathan et al. (2002) sobre prevalência de patógenos em úlceras de pé diabético, foi demonstrado que patógenos anaeróbios representaram 33,2% dos isolados, e ainda, que úlceras infectadas por estes, requerem um tempo de cura maior que úlceras infectadas por microrganismos aeróbios.

No Brasil, Carvalho et al. (2004) realizaram um estudo microbiológico em pacientes com pé diabético atendidos no Centro de Referência de Diabetes e Hipertensão de Fortaleza no Ceará. As bactérias mais isoladas foram *Enterobacteriaceae* (83,7%), *S. aureus* (43,3%) e bacilos Gram negativos anaeróbios (17%).

c) Infecções de ferida cirúrgica

As feridas são ambientes ideais para a formação de biofilmes, devido a sua susceptibilidade a contaminação, disponibilidade de substrato e superfície para a

fixação. Infecções de feridas crônicas compartilham dois atributos importantes com outras doenças por biofilme: infecção persistente, que não é eliminada pelo sistema imune do hospedeiro e resistência à terapia antimicrobiana tópica e sistêmica. As primeiras evidências de que bactérias em feridas crônicas estão sob a forma de biofilme foram baseadas na visualização de agregados bacterianos nestes ferimentos através da microscopia eletrônica (BJARNSHOLT, GIVSKOV, 2010). James et al. (2008) demonstraram a presença de grande quantidade de agregados microbianos (microcolônias) em feridas crônicas quando compararam estes achados com os obtidos em feridas agudas, utilizando a microscopia eletrônica.

O risco de contaminação de uma ferida cirúrgica quando feita assepsia é de 1 a 5%, enquanto é estimado em 27% o risco de infecção após uma cirurgia contaminada. Infecções de ferida cirúrgica refletem a microbiota do órgão que foi manipulado. As infecções de feridas cirúrgicas abdominais são polimicrobianas e envolvem microrganismos aeróbios e anaeróbios (BOWLER et al., 2011).

Os anaeróbios, particularmente o *B. fragilis*, estão presentes em feridas cirúrgicas abdominais infectadas e pé diabético, tendo sido relatada diferentes práticas para o tratamento destas feridas, dentre estas podemos mencionar a utilização de produtos naturais e antissépticos. O tratamento de feridas infectadas continua sendo um tema de grande importância médica, particularmente na prática cirúrgica, numa época em que o uso indiscriminado de antimicrobianos tem dificultado o tratamento hospitalar dos pacientes, com repercussão no aparecimento cada vez maior de microrganismos resistentes a estes fármacos (NAGOBA et al., 2008).

Na atualidade, há disponível comercialmente mais de 2000 produtos para tratar feridas, o que torna a escolha do curativo uma tarefa difícil e desafiadora (NEWTON, 2000; OUSEY; MCINTOSH, 2009).

1.2.4 Virulência

Fatores de virulência são atributos dos microrganismos que contribuem para sua patogenicidade. Os principais fatores de virulência associados com patógenos anaeróbios, assim com outros patógenos são: cápsula, adesão e invasão às células do hospedeiro, toxinas, produção de metabólitos, enzimas de defesa antioxidante e biofilme (OLSEN; DAHLÉN, 2004).

a) Cápsula

Os polissacarídeos capsulares, quando presentes, podem interferir na atuação do sistema imunológico do hospedeiro, reduzindo a habilidade fagocitária dos polimorfonucleares. O complexo polissacarídico capsular de *B. fragilis* é o maior fator de virulência na formação de abscessos. Injeções experimentais de polissacarídeo capsular purificado em modelos animais *germ-free* induziram a formação de abscessos contribuindo para sua virulência (BABB, CUMMINS, 1978; COYNE et al., 2000).

b) Adesão e invasão às células do hospedeiro

B. fragilis e outros *Bacteroides* spp. e *P. gingivalis* são capazes de aderir às células epiteliais e moléculas extracelulares (fibrinogênio, fibronectina, lactoferrina). Adesinas semelhantes à lectinas foram demonstradas em *B. fragilis* (OYSTON; HANDLEY, 1991).

As fímbrias desempenham importante papel na interação entre bactéria e célula hospedeira. Segundo Xie et al. (2004) a fímbria de *P. gingivalis* possui várias atividades biológicas, incluindo: imunogenicidade, ligação á várias proteínas do hospedeiro, estimulação da produção de citocinas e reabsorção óssea.

c) Toxinas

O lipopolissacarídeo (LPS) também denominado de endotoxina é o maior fator de virulência presente em bactérias Gram negativas, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Sua liberação ocorre quando as bactérias se multiplicam ou quando são fagocitadas e degradadas por células de defesa (TUIN et al., 2006). O LPS presente em *B. fragilis* é estruturalmente diferente do LPS clássico encontrado em bactérias como a *Escherichia coli*, embora tenha sido demonstrado toxicidade. Este, assim como a cápsula, pode atuar como adesina, permitindo o estabelecimento da bactéria em um sítio infeccioso (MANCUSO et al., 2005).

As amostras de *B. fragilis* enterotoxigênicas que causam diarréia, produzem uma toxina termolábil dependente de zinco, a metaloprotease (BFT – toxina do *B. fragilis*).

Esta toxina causa alterações morfológicas no epitélio intestinal por meio de rearranjo da F-actina, resultando na estimulação da secreção de cloretos e consequente perda de eletrólitos (SEARS, 2009).

d) Produção de metabólitos

A produção de enzimas extracelulares como hialuronidases, proteases, DNases, colagenases, neuraminidases, heparinases e fosfolipases, capazes de promover hidrólise nos tecidos do hospedeiro, alterando e destruindo as células e promovendo ainda a invasão, são alguns metabólitos produzidos por patógenos anaeróbios, como os pigmentados (OLSEN; DAHLÉN, 2004). Em, *B. fragilis* a hialuronidase e acondroitina sulfatase parecem estar em maior quantidade e atuam desorganizando a matriz extracelular (MEC). A neuraminidase, que é o produto do gene *nanH* em espécies de *Bacteroides*, quebra glicoproteínas presentes no muco, gerando glicose livre, sendo aproveitada pelas bactérias. Esta enzima, também denominada sialidase, remove o ácido siálico de células eucarióticas, expondo assim, os sítios de adesão (BERG et al., 1983).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o ácido succinílico, produto final do metabolismo fermentativo de *B. fragilis*, inibem a fagocitose e a morte intracelular. Podem ainda, inibir a ativação de neutrófilos e induzir apoptose de macrófagos (KURITA-OCHIAI et al., 1998).

e) Enzimas de defesa antioxidante

A presença das enzimas CAT e SOD, agentes neutralizadores do oxigênio e seus metabólitos, ajudam a criar ambientes anaeróbicos ótimos para proliferação de patógenos anaeróbios. A enzima SOD é um importante fator de virulência, porque neutraliza espécies reativas de oxigênio que são produzidas durante o contato celular com o O₂ e, portanto, promove a existência de patógenos anaeróbios em tecidos vivos durante o período inicial da infecção, antes do desenvolvimento de condições anaeróbias ótimas para o crescimento destes microrganismos (BRIOUKHANOV; NETRUSOV, 2004).

A CAT, enzima presente em todos os aeróbios e em muitos anaeróbios aerotolerantes, protege as células contra o efeito oxidativo do H₂O₂ e, atualmente tem sido bastante estudada em microrganismos aeróbios, no entanto, pouco se conhece nos

anaeróbios. Antigamente, pensava-se que bactérias anaeróbias não poderiam crescer em condições aeróbias por ausência da CAT e que em suas células havia acúmulo de H₂O₂, porém, alguns anaeróbios estritos são conhecidos por conter quantidades pequenas de catalase (ZAMOCKY et al., 2008). Não está claro se a ausência da atividade de CAT em alguns microrganismos está associada com a ausência do gene correspondente ou com a sua expressão apenas sob certas condições (IMLAY, 2008).

f) Biofilme

A espécie *B. fragilis* adere à parede intestinal do hospedeiro como mecanismo de sobrevivência, tornando-se parte da microbiota. Seu mecanismo de aderência às células do epitélio ocorre por diferentes tipos de interação: pili/fímbria, adesinas e formando biofilmes (PUMBWE et al., 2008).

Aproximadamente 80% dos microrganismos existentes no mundo residem como populações em biofilme e o *B. fragilis* é a principal bactéria anaeróbia isolada de infecções gastrointestinais em seres humanos capaz formar biofilmes. A formação do biofilme é um processo em vários estágios que se inicia quando as células aderem a uma superfície biótica ou abiótica com a posterior produção de uma matriz extracelular (JACQUES et al., 2010; PUMBWE et al., 2007).

1.3 Biofilmes

As bactérias quando invadem um novo ecossistema podem assumir duas formas: a planctônica, quando circulam isoladamente e sob a forma de biofilme. Nesta, elas inicialmente aderem a um substrato e posteriormente produzem uma matriz, denominada glicocálice, onde formam microcolônias (PASTERNAK, 2009).

Biofilmes são definidos como comunidades microbianas aderidas a uma superfície, consistindo-se de múltiplas camadas de células embebidas em uma matriz hidratada, inseridas numa matriz polimérica própria e aderida a uma superfície inerte ou viva. Muitos estudos têm demonstrado que várias bactérias colonizam sob a forma de biofilme (COSTERTON et al., 1999; MURPHY; KIRKHAM, 2002). A interface líquido-sólida, entre o meio aquoso e a superfície sólida, fornece um ambiente ideal para a fixação e crescimento de microrganismos. Estas comunidades são compostas de

microcolônias distintas, dispostas em torres que se erguem do substrato. As necessidades de oxigênio e nutrientes estão reduzidas neste estado. Há canais que penetram e separam as torres, suprindo água e nutrientes por difusão, além da dispersão dos resíduos (STOODLEY et al., 2002; REYSENBACH; CADY, 2001).

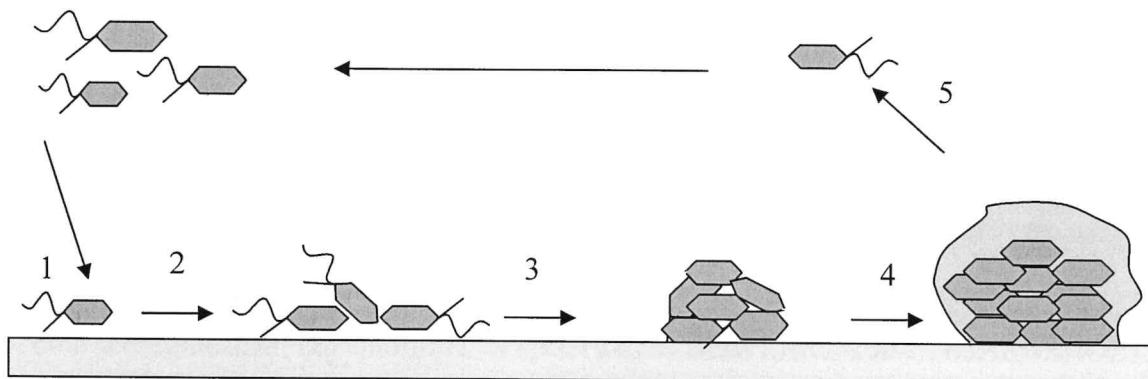
Os biofilmes, com sua resistência intrínseca a antibióticos e a resposta imune do hospedeiro, têm sido cada vez mais identificados como fonte de múltiplas infecções bacterianas. Estas incluem doença periodontal, endocardite, infecções do trato urinário, infecções de ouvido médio, infecções de cateter, doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras (DONLAN, 2001). Mais recentemente, tem se observado que o biofilme bacteriano pode prejudicar a cicatrização de feridas cutâneas e reduzir a eficiência antibacteriana tópica na cura ou tratamento de feridas de pele infectadas (DAVIS et al., 2008).

O estudo dos biofilmes foi relativamente lento até o início dos anos 70, restringindo-se até então à microbiologia ambiental. A primeira teoria sobre biofilmes foi apresentada por Costerton et al. (1978), que explica os mecanismos através dos quais os microrganismos aderem às superfícies vivas e inertes e as vantagens deste tipo de associação.

Vários passos na formação de biofilmes são descritos (Figura 2). Geralmente as bactérias são transportadas para a superfície pela sedimentação, fluxo de líquidos ou por motilidade quando então, realizam ligações fracas e transitórias à superfície. A próxima fase, a fixação irreversível, depende das propriedades da superfície bacteriana e da superfície a ser colonizada. Se as condições físico-químicas forem favoráveis, uma fixação reversível se tornará irreversível. Durante a fixação irreversível, uma monocamada de células individuais firmemente aderidas à superfície é formada. Assim, microcolônias se desenvolvem, eventualmente formando um biofilme maduro. Finalmente, se as condições deixarem de ser favoráveis, as células podem se desprender do biofilme e retornarem a forma planctônica (Figura 2, passo 5). Bactérias móveis e não móveis utilizam diferentes estratégias de colonização, no entanto, apêndices como fimbrias ou flagelos (pili), assim como moléculas da superfície celular (lipopolissacarídeos, lipoproteínas, proteínas de membrana e adesinas) ao entrarem em contato com superfícies, desempenham um importante papel na fixação dessas bactérias. Durante a transição da fixação inicial para a formação do biofilme maduro, as células bacterianas sofrem modificações significativas. Este processo de desenvolvimento de biofilme resulta na formação de um complexo de arquitetura tridimensional que geralmente incluem

estruturas como cogumelo, canalículos de água e poros. A formação de microcolônias exige crescimento clonal e interações célula-célula estáveis (REISNER et al., 2003; LEMON et al., 2008).

A dispersão de células bacterianas é uma parte importante do “ciclo de vida” do biofilme em ambientes naturais. Limitações nutricionais e outras condições ambientais desfavoráveis favorecem a dispersão de células e a subsequente colonização de novos locais. A dispersão de células de biofimes pode ocorrer por natação livre ou despreendimento de pequenas porções. Este processo é chamado de erosão, já o despreendimento rápido de grandes porções do biofilme é denominado descamação (HALL-STOODLEY et al., 2005).



Fonte: MENDES, 2011

Figura 2. Modelo de desenvolvimento do biofilme. Passo 1: Fixação reversível das células na superfície. Passo 2: Fixação irreversível e formação de uma monocamada. Passo 3: Desenvolvimento de microcolônias. Passo 4: Maturação do biofilme. Passo 5: Despreendimento de células do biofilme.

Biofilme maduro possui uma complexa arquitetura, que pode ser visualizada utilizando uma variedade de métodos de microscopia como: microscópio de transmissão de elétrons, microscópio de fluorescência, microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio de força atômica (MFA) e microscópio confocal de varredura a laser (MCVL). Em particular, o MFA permite uma alta resolução de imagem e informações quantitativas da estrutura e aderência de biofilmes (OH et al., 2009).

Muitos parâmetros afetam a arquitetura e estrutura de biofilmes, como condições hidrodinâmicas (fluxo laminar ou turbulento), mais especialmente, a viabilidade de nutrientes no ambiente e o número de organismos que o compõe (SIMÕES et al., 2008).

Klausen et al. (2003) demonstraram que diferentes fontes de carbono afetam enormemente a estrutura de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Biofilmes crescidos em glicose formam torres e formatos de cogumelo separados por canais de água típicos deste microrganismo. Quando cultivados sob a mesma condição com citrato, em substituição a glicose, os biofilmes formados por PA01 são planos, homogêneos e com pouca evidência de canais de água.

Nas bactérias, as células dos biofilmes bacterianos são mantidas juntas por uma MEC composta de uma mistura de polissacarídeos, proteínas, DNA e água, denominada de substância polimérica extracelular (SPE). A composição destas SPE varia de acordo com a estirpe bacteriana que a produz, por exemplo, em bactérias Gram negativas, alguns exopolissacarídeos são neutros, em outros são polianiônicos, devido à presença de ácidos urônicos como D-glucurônico, D-galacturônico e ácidos manurônicos ou piruvatos (SUTHERLAND, 2001).

Os biofilmes possuem a característica e a capacidade de aderir principalmente em corpos estranhos e tecidos danificados e/ou necrosados. Vários estudos têm demonstrado que as comunidades microbianas em feridas crônicas são polimicrobianas e os anaeróbios têm uma importante participação (SUN et al., 2009). Tem sido especulado há vários anos que as bactérias colonizadoras de feridas crônicas existem como comunidades em biofilme (PERCIVAL; BOWLER, 2004; BJARNSHOLT; GIVSKOV, 2010).

1.3.1 Quorum-Sensing

A formação de um biofilme não é um processo randômico. Quando bactérias encontram uma superfície, uma série de passos geneticamente determinados se iniciam. Estes passos são também coordenados através da atividade de *quorum sensing* (QS), que corresponde a um processo de comunicação intra e interespécies microbianas através de moléculas sinalizadoras, importantes na regulação da inicialização e término do processo (WILLIAMS, 2007).

O QS é a capacidade de bactérias secretarem pequenas moléculas auto-indutoras que são dependentes da densidade populacional existente no biofilme. Quando a concentração populacional atinge o limiar, existe quantidade de QS suficiente para que seja “sentida” pelas células, resultando na ativação ou desativação de genes específicos (que estão envolvidos no metabolismo bacteriano, reparo de DNA, biossíntese de proteína, síntese de toxinas e outros fatores de virulência, formação do biofilme,

exoenzima e exopolissacarídeo capsular) e no crescimento celular (PUMBWE et al., 2008). As bactérias Gram positivas ativam QS usando oligopeptídeos detectados por proteínas. As bactérias Gram negativas geralmente usam lactonas homoserina-aciladas (HA) como moléculas-sinal difusíveis dos sistemas QS (*las* e *rhl*) que regulam a expressão dos genes de virulência como já bem descrito em *P. aeruginosa*. O sistema *las* consiste nos ativadores *lasR* e *lasI*, os quais dirigem a síntese do auto-indutor, que é uma LHA (lactona homoserina N-(3-oxododecanoil). A indução de *LasB*, que codifica a elastase e outros fatores de virulência requerem *LasR* e AHL. O sistema *rhl* consiste nos ativadores *RhIR* e *Rhl* que dirigem a síntese da lactona homoserina-N-butiril. Para produzir ramnolipídio, *P. aeruginosa* precisa do sistema *rhl* (PESCI et al., 1997).

1.3.2 Biofilmes e Anaeróbios

O estudo *in vitro* de biofilmes formados por bactérias anaeróbias tem sido realizado desde 1980; a maioria dos trabalhos pertencem a área da Odontologia que realiza estudos com biofilmes dentários e com espécies Gram negativas da cavidade oral como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Fusobacterium nucleatum* (OKUDA et al., 2011; PAPAIOANNOU et al., 2011). Já com cepas do grupo *Bacteroides fragilis* os estudos ainda são incipientes (WEINACHT et al., 2004; PUMBWE et al., 2007, PUMBWE et al., 2008). Pumbwe et al. (2007) ao estudarem o papel dos sais biliares na co-agregação, adesão às células epiteliais, formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos, demonstraram um aumento nestas características quando tratadas com tais esteróides. O *B. fragilis* pode produzir biofilme que tem a capacidade de manter uma população ideal de microrganismos e usar bombas de efluxo membranares para expulsar agentes nocivos, incluindo antibióticos (PUMBWE et al., 2008).

1.4 Sensibilidade a antimicrobianos entre bacilos Gram negativos anaeróbios

O estudo da sensibilidade das bactérias anaeróbias aos antimicrobianos teve início em 1960. As espécies do grupo *B. fragilis* se destacam por apresentarem um espectro maior de resistência aos antimicrobianos (AYALA, 2005). Este quadro vem se agravando, conforme a área geográfica e escolha terapêutica (SNYDMAN, 2010). As

drogas comumente utilizadas no tratamento das infecções anaeróbias são os beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos, tetraciclínas, clindamicina e metronidazol).

Entre as bactérias anaeróbias, a resistência a antimicrobianos tem sido relatada entre os bacilos Gram negativos e, dentre estes, as espécies do grupo *Bacteroides fragilis*. Em relação à penicilina, os estudos relatam 95% de resistência, cefoxitina 10 a 20%, clindamicina 10 a 40% e fluoroquinolonas 20 a 40%. Relatos de resistência de bacilos Gram negativos anaeróbios ao metronidazol, cloranfenicol, associação beta-lactâmico-inibidor de beta-lactamase tem sido raros (HECHT, 2006; SILLEY, 2007; BROOK, 2010).

Snydman et al. (2007) realizaram estudo multicêntrico nos Estados Unidos sobre a resistência a antimicrobianos das espécies do grupo *Bacteroides fragilis* isoladas de infecção humana. No período compreendido entre 1997 e 2004 eles analisaram 5225 cepas obtidas de 10 centros hospitalares e observaram que a espécie *B. fragilis* foi a mais comum do grupo e a mais sensível a maioria dos antimicrobianos. Apresentou menores percentuais de resistência aos carbapenêmicos e β-lactâmicos e taxas de resistência à cefoxitina de cerca de 5%, enquanto as de clindamicina e moxifloxacina foram de 19% e 27%, respectivamente. Mais da metade das espécies de *B. vulgatus* foram resistentes à moxifloxacina (54,7%) e mais de um terço foram resistentes à clindamicina (35,3%). O metronidazol e cloranfenicol apresentaram excelente atividade contra os isolados do grupo *B. fragilis*.

Singer et al. (2008) na França, realizaram estudo multicêntrico e determinaram a concentração inibitória mínima de nove antibióticos frente a 376 bactérias anaeróbias isoladas de diversos espécimes clínicos humanos de vários hospitais do país. Espécies do grupo *B. fragilis* corresponderam a 67,5% dos isolados. Neste grupo detectaram alta resistência a clindamicina, moderada resistência a cefoxitina e alta sensibilidade ao imipenem, metronidazol e penicilina + inibidor de beta-lactamase.

No Brasil, Carvalho et al. (1997) realizaram um estudo em Fortaleza com o objetivo de analisar a resistência de espécies do grupo *B. fragilis* de amostras clínicas e microbiota normal intestinal a antimicrobianos. As espécies do grupo *B. fragilis* foram isoladas em 37% de 124 espécimes clínicos, sendo mais da metade isolados de infecções intra-abdominal e infecções de tecido mole. A espécie *B. fragilis* representou 68% das espécies do grupo *B. fragilis* encontradas nas amostras clínicas e 51% nas amostras fecais. Todas as amostras estudadas apresentaram sensibilidade uniforme ao

cloranfenicol e metronidazol. A resistência a penicilina, tetraciclina, clindamicina e cefoxitina em espécimes clínicos foram de: 93,5%, 80,5%, 21,7% e 10,9%, respectivamente e, em amostras fecais: 78,4%, 73%, 19% e 5,4%, respectivamente.

Ainda no Brasil, Ferreira et al. (2010) em Minas Gerais estudaram a ocorrência de espécies do grupo *B. fragilis* e cepas enterotoxigênicas e a sensibilidade antimicrobiana de fezes diarréicas e não diarréicas de crianças. O grupo *B. fragilis* foi encontrado em 64,3% das amostras fecais, 55% em fezes diarréicas e 80,4% em não diarréicas. As bactérias apresentaram resistência de 68,2%; 22,7%; 20,5% a ampicilina, clindamicina e ceftriaxona, respectivamente e sensibilidade de 100% a metronidazol e 90,9% a piperacilina + tazobactam.

No estudo de Boente et al. (2010) foi determinada a sensibilidade a antimicrobianos de 52 cepas de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis* isoladas de microbiota intestinal e de espécimes clínicos humanos. Todas as cepas foram sensíveis ao metronidazol. Percentuais de resistência a ampicilina, cefoxitina, tetraciclina e clindamicina foram de 98%, 9,6%, 65,3% e 19,2%, respectivamente.

O principal mecanismo de resistência contra β -lactâmicos é a produção de β -lactamases, especialmente entre o grupo *Bacteroides fragilis* e *Prevotella* spp. A resistência à cefoxitina em isolado de *Bacteroides* se dá através de uma β -lactamase. O gene de resistência (cfxA) é codificado por um transponson, MTn4555, responsável pela transferência horizontal. A mais importante β -lactamase é a metalo- β -lactamase, CfiA, do *B. fragilis*. Esta é codificada cromossomicamente; para sua expressão, sequências de inserção são necessárias, como em muitos mecanismos de resistência a antibióticos de *B. fragilis* (SÓKI et al., 2011).

O mecanismo de resistência para a clindamicina pode ocorrer através de metilação de uma ou duas adeninas do RNAr, evitando a ligação da droga aos ribossomos. Outra hipótese é que os genes que conferem resistência à clindamicina e à tetraciclina estariam localizados no mesmo transponson (SEBALD, 1993).

A resistência ao metronidazol vem surgindo em alguns países e dentre os mecanismos de resistência a essa droga destacam-se a alteração de proteínas de membrana afetando a permeabilidade da droga, a redução da atividade das enzimas oxidoreduzase e piruvato/ferredoxina e a redução da interação com o DNA bacteriano (SEBALD, 1993).

Na medicina humana, a contínua emergência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde e até mesmo na comunidade tem se constituído um grande desafio.

A resistência entre os anaeróbios aumentou consideravelmente dentro das últimas três décadas e sua sensibilidade aos antimicrobianos tem se tornado menos previsível. Sabendo-se que em biofilme estas bactérias aumentam sua resistência aos antimicrobianos entre 100 a 1000 vezes, a escolha terapêutica torna-se ainda mais desafiadora (MAH; O'TOOLE, 2001). Assim, a procura de terapias alternativas, inclusive tópicas, como já é realizado nas infecções de ferida cirúrgica, faz-se necessário.

1.5 Plantas medicinais

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muito dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Estima-se que existam 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas na Medicina tradicional em todo o mundo. Entre estas apenas 1% foi validada por estudos científicos com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (LIMA et al., 2007).

Os óleos essenciais (OE), também chamados de óleos voláteis, há muito tempo são empregados popularmente por suas diversas propriedades terapêuticas, destacando-se: atividade antiviral e antimicrobiana, antiespasmódica, analgésica, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica, larvicida, vermífuga e antiinflamatória (COSTA et al., 2005; OYEDJI; AFOLAYAN, 2006; LIMA et al., 2006). OE são caracterizados por cheiro forte e são formados por plantas aromáticas, sendo encontrados em suas folhas, resinas, frutos, troncos, dentre outras partes, e são estocados em células secretórias, cavidades, canais ou tricomas glandulares (NUNES et al., 2006; CHATZOPOULOU et al., 2010). Em geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, tendo como principal característica a volatilidade, diferindo assim, dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes (LAI et al., 2007).

O mecanismo de formação de OE é complexo e envolve algumas enzimas no interior das plantas, pois cada componente químico de uma cadeia de centenas deve ser pré-formado para sua fabricação. Sua função, estritamente correlacionada à sua ecologia, é potencializar o sistema de defesa química das plantas e protegê-la dos mais diversos predadores, tais como: bactérias, fungos, insetos e outros (ISMAN, 2006).

Apesar de alguns órgãos acumularem OE, tanto a quantidade como a composição, características físico-químicas e odores, mudam constantemente na planta e, fatores como hora do dia, época do ano, maturidade da planta, clima e outros, podem interferir consideravelmente na sua composição química (CASTRO et al., 2008).

A maioria dos OE é constituída de derivados terpenóides ou fenilpropanóides. Terpenóides originam-se de unidade do isopreno e os fenilpropanóides a partir do ácido chiquímico, responsáveis pelas unidades fundamentais dos ácidos cinâmico e p-cumárico. A composição dos OE varia desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menor teor e alguns em baixíssima quantidade (MERLE et al., 2004).

Nos últimos anos, a crescente resistência dos patógenos aos antimicrobianos e o aumento da população de pacientes imunocomprometidos tem estimulado a busca de compostos terapêuticos alternativos (BERTINI et al., 2005; AMARAL, 2004), tais como os extratos obtidos de diversas espécies dos gêneros *Plectranthus* (CÂMARA, et al., 2003; MARWAH et al., 2007; AGNANIET et al., 2011).

1.5.1 Gênero *Plectranthus*

O gênero *Plectranthus* pertencente à família Lamiaceae possui cerca de 300 espécies presentes na África Tropical, Ásia, Austrália e América do Sul (LUKHOBA et al., 2006; KERNTOPF et al., 2002). Várias espécies dentro do gênero *Plectranthus* possuem propriedades importantes, destacando-se atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiprotozoária. Geralmente possuem folhas espessas e pilosas que apresentam glândulas epidérmicas secretórias de óleos voláteis (CHANG et al., 2005).

A espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, comumente chamada de (malva) ou (malvariço) no nordeste brasileiro, pertence ao filo Angiosperma, classe Magnoliatae, ordem Lamiales, família Lamiaceae (GEMTCHÚJNICOV, 1976). Em outras regiões do Brasil, é conhecida como hortelã-da-folha-grossa, hortelã-da-folha-graúda, malva do reino, malva-santa (SILVA; ANDRADE, 2005) (Figura 3).



Fonte: MENDES, 2011

Figura 3. Folhas de *Plectranthus amboinicus* (malvariço) cultivado no Horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Ceará.

Os dados botânicos revelam que a planta é uma erva grande, perene, ereta ou semi-prostrada, tomentosa, semicarnosa, aromática, de 0,40 cm a 100 cm de altura. O caule é semi-lenhoso na base. Apresenta folhas deltóides-ovais, suculentas, carnosas, verde-pálidas, com disposição oposta cruzada de base truncada e margem dentada, com nervuras salientes no dorso, medindo 4 a 10 cm de comprimento. Suas flores, quando presentes, pois não floresce nas condições edafoclimáticas do nordeste brasileiro, são zigomorfas, espiraladas, azuladas ou róseas, em longos racemos interrompidos (ROSHAN et al., 2010).

A medicina alternativa faz uso da infusão ou xarope para tratar asmas, tosse, dor de garganta e bronquite e há relatos também de propriedade anti-influenza (ROSHAN et al., 2010; CANO; VOLPATO, 2004; VERA et al., 1993). Extrato de folhas secas também é utilizado para tratar eczema e outras infecções epidérmicas, como leishmaniose tegumentar (FRANÇA et al., 1996) e na Índia é utilizado como agente larvicida contra mosquitos transmissores da malária (PERIYANAYAGAM et al., 2008).

A espécie é rica em OE que podem possuir como componentes majoritários carvacrol (SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2010) ou timol (MALLAVARAPU et al., 2005), dependendo do local de coleta. Os OE e extratos dessa espécie apresentam diversas atividades biológicas, destacando-se atividade antioxidante (PALANI et al., 2010), antimalárica, inseticida (SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2010),

repelente (SEYOUM et al., 2002), antifúngica contra fitopatógenos (MURTHY et al., 2009) e antibacteriana frente a bactérias Gram positivas (GURGEL et al., 2009).

Nos estudos de Gurgel et al. (2009) o extrato hidroalcoólico de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng, foi testado contra cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina e demonstrou ser capaz de inibir as cepas testadas, sendo que tais amostras eram resistentes a penicilina, eritromicina, cloranfenicol e alguns íons metálicos. Em outros estudos, Oliveira et al. (2005) e Nogueira et al. (2008) relataram atividade antimicrobiana do OE e extrato bruto de *P. ambonicus* contra vários patógenos bacterianos. Entretanto, não há relatos na literatura de trabalhos que envolvam bacilos Gram negativos anaeróbios testados contra esta planta.

2. JUSTIFICATIVA

A pesquisa de novos agentes antibacterianos se faz necessária devido a grande prevalência de infecções de etiologia bacteriana e a crescente resistência apresentada por algumas estirpes ao longo das últimas décadas, principalmente entre os microrganismos anaeróbios, que em muitos casos, dentro da prática clínica, são negligenciados. Este fato é agravado devido à redução do arsenal terapêutico, associado aos efeitos colaterais e alto preço apresentado por algumas drogas. A bioprospecção de novos agentes farmacológicos a partir de espécies vegetais, apresenta-se como uma solução diante da problemática imposta pela resistência bacteriana, principalmente em países como o Brasil, que apresentam uma vasta biodiversidade vegetal.

Pesquisas demonstram que várias espécies vegetais apresentam bioatividades relevantes, como potencial contra um grande número de bactérias. Desta forma, a pesquisa de novos agentes antimicrobianos a partir do óleo essencial *P. amboinicus* (Lour.) Spreng, pode contribuir significativamente na busca por novas substâncias que apresentem mais eficácia e baixa toxicidade contra anaeróbios implicados em patologias humanas.

3 PERGUNTA DE PARTIDA

O óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng possui ação antibacteriana e anti-biofilme *in vitro* frente a bacilos Gram negativos anaeróbios?

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng inibe o crescimento *in vitro* de bacilos Gram negativos anaeróbios planctônicos e pode apresentar atividade antimicrobiana sobre o biofilme formado por estas bactérias.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng frente a células planctônicas e biofilme de bacilos Gram negativos aneróbios.

5.2 Objetivos Específicos

- Extração do óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng;
- Identificar os componentes químicos presentes no óleo essencial de *P. amboinicus*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial sobre bacilos Gram negativos anaeróbios;
- Avaliar a cinética de crescimento de bacilos anaeróbios Gram negativos frente ao óleo essencial de *P. amboinicus*;
- Estudar os efeitos do óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng sobre a parede celular e membrana plasmática bacteriana;
- Verificar a ação do óleo essencial sobre o biofilme bacteriano de bacilos Gram negativos anaeróbios;
- Avaliar efeito tóxico do óleo essencial de *P. amboinicus*. (Lour.) Spreng

6 ARTIGO

Journal: Phytomedicine – International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

Title: Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. essential oil against anaerobic Gram negative strains

Instructions to Authors: The manuscript submitted following the instructions authors suggested by the journal

Impact Factor: 2.662

Situation: Submitted

Manuscript Number

Title: Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. essential oil against anaerobic Gram negative strains

Article Type: Original Article

Section/Category: Diabetes and Endocrinology

Keywords: *Plectranthus amboinicus*; essential oil; antimicrobial activity; anaerobic bacteria

Corresponding Author: Dr Cibele Barreto Mano Carvalho, Ph.D., M.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Ceará

First Author: Hermínio Mendes

Order of Authors: Hermínio Mendes; Ana Catarina Reis; Camila A Moreira; Janice Silva; Rosemayre S Freire; Cibele Barreto Mano Carvalho, Ph.D., M.D.

Abstract:

The aim of this study was to evaluate the in vitro activity of the *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. essential oil (EO), traditionally used in northeastern Brazil to treat skin infections, against Gram negative anaerobic bacilli. The bactericidal activity of the EO against standard Gram negative strains was assessed using an agar dilution assay and by determining the kill rate kinetics. The killing mechanism was investigated further by means of a crystal violet assay and by confocal laser scanning microscopy. The determination of MIC for the EO against planktonic cells showed values of 32 $\mu\text{g/ml}$ for *F. nucleatum*, 64 $\mu\text{g/ml}$ for *B. fragilis* and 128 $\mu\text{g/ml}$ for *B. tetaiotaomicron*. Bacterial populations of *B. fragilis* were completely inactivated within 60 minutes after exposure to 128 $\mu\text{g/ml}$ and 64 $\mu\text{g/ml}$ concentrations. *B. thetaiotaomicron* was the species that needed the highest concentrations of the *P. amboinicus* EO to suffer its bactericidal effect, followed by *B. fragilis* and *F. nucleatum*, in descending order. The crystal violet uptake was increased by 50% after 1 hour exposure to the EO at 64 and 128 $\mu\text{g/ml}$. The CSLM assay revealed a significant reduction in the number of bacteria and fluorescence, for *B. fragilis*, after 1h exposure to inhibitory concentration of 64 $\mu\text{g/ml}$ of the *P. amboinicus* oil. The *P. amboinicus* essential oil shows bactericidal and bacteriostatic effect against anaerobic strains.

Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho, M.D.
Laboratório de Bacteriologia
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará
Rua Coronel Nunes de Melo 1315
CEP 60430-270
Fortaleza-CE
Brasil

Fortaleza, 2nd February 2012. Phytomedicine

To the Editor-in-chief,

Please find the enclosed manuscript entitled **Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. essential oil against anaerobic Gram negative strains** by Mendes, HBR et al. for your consideration to be published in Phytomedicine as an original research article.

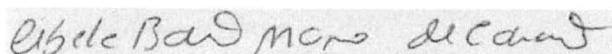
This study evaluated the antimicrobial activity of *P. amboinicus* essential oil against anaerobic Gram negative strains. We determined the essential oil minimal inhibitory concentrations (MIC) and the killing kinetics for selective anaerobic strains. The killing mechanism was investigated further by means of a crystal violet assay and by confocal laser scanning microscopy.

The *P. amboinicus* is commonly used in Northeast of Brazil for the treatment of skin infections. Prior studies have observed its activity against aerobic bacteria but not for anaerobic ones. The authors declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights.

By submitting this manuscript to Phytomedicine, the authors understand that the material presented in this paper has not been published before nor has it been submitted for publication to another scientific journal or is it being considered for publication elsewhere.

Thank you for your consideration and cooperation.

Sincerely,



Cibelle Barreto Mano de Carvalho

Laboratório de Bacteriologia
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará
Rua Coronel Nunes de Melo 1315
CEP 60430-270
Fortaleza-CE
Brasil

Fortaleza, 2nd February 2012.

To the Phytomedicine Editor-in-chief,

We the undersigned declare that this manuscript is original, has not been published before and is not currently being considered for publication elsewhere.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process. He/she is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs.

Signed by all authors as follows:

Herminio Benitez Rabello Mendes

Ana Catarina Reis

Camila Alencar Moreira

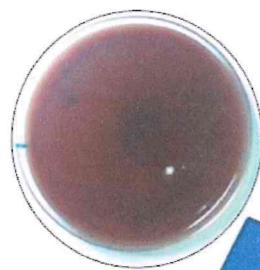
Janice Oliveira Silva

Rosemayre Souza Freire

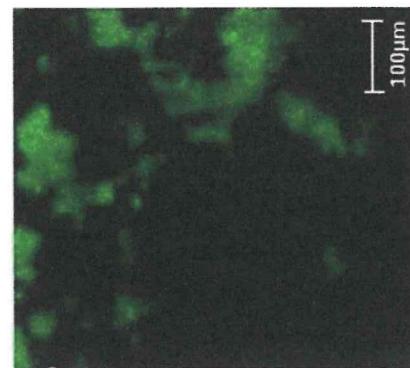
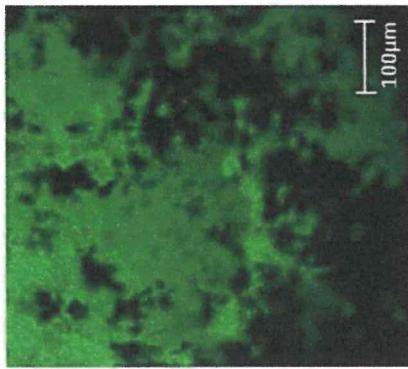
Cibele Barreto Mano de Carvalho

ANAEROBIC BACTERIA

Bacteroides thetaiotaomicron
Bacteroides fragilis
Fusobacterium nucleatum



NOT EXPOSED



Plectranthus amboinicus
(Lour.) Spreng. essential oil



EXPOSED

Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. essential oil against anaerobic Gram negative strains

Hermínio Benítez Rabello Mendes, Ana Catarina Reis, Camila Alencar Moreira, Janice Oliveira Silva, Rosemayre Souza Freire, Cibele Barreto Mano de Carvalho*

Laboratório de Bacteriologia, Centro de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará - Rua Coronel Nunes de Melo 1315, Rodolfo Teófilo, CEP 60430-270, Fortaleza -CE, Brasil

* Corresponding author: Cibele Barreto Mano de Carvalho Tel.: +55-85-33668638 Fax: +55-85-33668002 Email: cibelebmc@yahoo.com.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the in vitro activity of the *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. essential oil (EO), traditionally used in northeastern Brazil to treat skin infections, against Gram negative anaerobic bacilli. The bactericidal activity of the EO against standard Gram negative strains was assessed using an agar dilution assay and by determining the kill rate kinetics. The killing mechanism was investigated further by means of a crystal violet assay and by confocal laser scanning microscopy. The determination of MIC for the EO against planktonic cells showed values of 32 µg/mL for *F. nucleatum*, 64 µg/mL for *B. fragilis* and 128 µg/mL for *B. thetaiotaomicron*. Bacterial populations of *B. fragilis* were completely inactivated within 60 minutes after exposure to 128 µg/mL and 64 µg/mL concentrations. *B. thetaiotaomicron* was the species that needed the highest concentrations of the *P. amboinicus* EO to suffer its bactericidal effect, followed by *B. fragilis* and *F. nucleatum*, in descending order. The crystal violet uptake was increased by 50% after 1 hour exposure to the EO at 64 and 128 µg/mL. The CSLM assay revealed a significant reduction in the number of bacteria and fluorescence, for *B. fragilis*, after 1h exposure to inhibitory concentration of 64 µg/mL of the *P. amboinicus* oil. The *P. amboinicus* essential oil shows bactericidal and bacteriostatic effect against anaerobic strains.

Key words: *Plectranthus amboinicus*; essential oil; antimicrobial activity; anaerobic bacteria

Introduction

Chronic human infections, including chronic wounds such as diabetic foot ulcers, constitute 6080% of all human infectious diseases (Wolcott & Ehrlich, 2011). The chronicity of wounds has been explained by the polymicrobial nature of these infections and by biofilm formation. Many studies have investigated the polymicrobial makeup of such infections; in addition to aerobes, anaerobic bacteria have been frequently isolated and identified, albeit with considerable variation (Brook & Frazier, 1998; Espinosa et al., 1999). In a prospective study with the infected wounds of 25 diabetic patients the authors isolated the following pathogens: *Staphylococcus aureus* -76%; *Enterobacteriaceae* -48%; enterococci -44%; pseudomonads 32%; and anaerobes -40%, of which *B. fragilis* was the most frequent isolate (Goldstein et al., 1996). A Brazilian study in a diabetes treatment center in Fortaleza and at the Federal University of Ceará, which included patients with mild to moderate chronic infections, identified as the most frequently occurring pathogens *Enterobacteriaceae* (83.7%), *S. aureus* (43.3%) and anaerobic Gram negative strains (17%) (Carvalho et al., 2004).

The treatment of chronic wounds is based on the use of both topical and systemic antimicrobial therapy. According to Howell-Jones et al. (2005), the benefit of topical antimicrobials may, theoretically, be due to their ability to deliver high local concentrations of antibiotic, independent of local vascular supply. Further benefits which have been noted include the avoidance of adverse systemic effects and a low incidence of resistance. However, others argue that topical antibiotics are a major driving force behind the development of antibiotic resistance (Shah & Mohanraj, 2003; Nagoba et al., 2008). There are also concerns regarding toxicity to human cells, and sensitization, the incidence of which varies considerably between the many substances investigated (Howell-Jones et al., 2005).

Plectranthus amboinicus, popularly known as “thick-leaved peppermint” is largely grown in northeastern Brazil. Its leaves yield an essential oil (EO) that is largely used in folk medicine for the topical treatment of skin ailments such as purulent wounds, itching lesions, ringworms (Oliveira et al., 2006). The antimicrobial activity of the EO extracted from *P. amboinicus* has been investigated and some studies have reported its activity against Gram positive and Gram negative aerobic bacteria, but not against anaerobic bacteria (Gurgel et al., 2009; Costa et al., 2010; Rice et al., 2011; Sathasivam & Elangovan, 2011). In the present study we analyze the activity of *P. amboinicus* EO against some chronic-wound-associated Gram negative anaerobic bacteria. An assay observing the effect of the EO on mature biofilm was also performed.

2. Material and methods

2.1 Plant Material

Fresh leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. were collected on October, 2010, from the medicinal plants herbarium at the Pharmacy Laboratory of the Federal University of Ceará, after its identification by botanists from the Biology Department of the same institution. A voucher specimen (#25884) was deposited at the Prisco Bezerra Herbarium, Federal University of Ceará, Brazil.

2.2 Essential oil extraction and analysis

One kilogram of fresh *P. amboinicus* leaves were cut in small pieces and hydrodistilled for 4 hours, in a Clevenger-type glass hydrodistillation apparatus, to produce oil in 0.9% yields on fresh weight basis. The sample oil, which had a pale yellow color, was dried over sodium sulfate and stored in sealed glass vials at low temperatures before analysis. The essential oil was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) on the GC-MS Shimadzu QP 5050 (Kyoto, Japan). The fused-silica column (OV-5; 30m x 0.25mm; film thickness 0.25 μ m) temperature was programmed from 60 to 240° C at 3° C/min. The temperatures for the injector and detector were of 250° C and 280° C, respectively. The gas helium carrier had a flow rate of 1 ml/min with split mode. Individual components of the oil were identified by matching their 70eV mass spectra with those of the spectrometer data base using the Wiley L-built library and MS searches at other two computer libraries using retention indexes as a preselection routine, as well as by visual comparison of the fragmentation pattern with those reported in the literature (Adams, 2001).

2.3. Bacterial strains

The bacterial species and strains used in this study were: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. The two first strains were acquired from Microbiologics (St. Cloud, USA). The *F. nucleatum* strain was procured from the INCQS/Brazil culture collection.

2.4. Analysis of planktonic strains

2.4.1. Determination of the minimal inhibitory concentrations of the essential oil The minimal inhibitory concentration (MIC) of the essential oil for anaerobic bacteria was

determined by the agar dilution method, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, 2007. Brucella agar was prepared with serial two fold dilutions of the EO ranging from 0.125 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The bacterial inocula were prepared by adjusting their density to 0.5 McFarland standards in phosphate buffered saline (PBS). It was then inoculated in each Brucella plate with a Steers replicator. The plates were incubated for 5 days at 35° C in anaerobic jars. The anaerobic environment was obtained by using a commercially available gas generator envelope for anaerobiosis (PROBAC, São Paulo, Brazil). Control plates for the viability of the strains and for possible contamination were included at the beginning and end of each series of tests. MICs were defined as the lowest concentration of essential oil inhibiting growth, allowing one discrete colony, a barely visible haze or any distinct change from the growth control.

2.4.2. Determination of kill rate

Kill rates were determined by measuring the reduction in viable bacteria ($\log_{10} \text{CFU}/\text{mL}$), exposed to concentrations of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the essential oil at 0, 2, 4, 6 hours. Experiments were performed in duplicate and at two different times. The bactericidal effects were considered when kill rate values were higher than $2 \log_{10}^{-1}$ CFU/mL. There were bacteriostatic effects when kill rate values were lower than $2 \log_{10}^{-1}$ CFU/mL (Devi et al., 2010; Gurgel et al., 2009).

2.4.3. Crystal violet assay

The variation in membrane permeability was detected by a crystal violet assay (Devi et al., 2010). Suspensions of bacteria were prepared in BHI broth. Cells were harvested at 4600xg for 5 min at 4° C. The cells were washed twice and resuspended in PBS (pH 7.4). *P. amboinicus* EO (128 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and metronidazole (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to the cell suspensions and incubated at 37° C for 30 min. Control samples were prepared similarly without treatment. The cells were harvested at 9300xg for 5 min. After that the cells were resuspended in PBS containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of crystal violet. The cell suspension was incubated for 10 min at 37° C. The suspension was then centrifuged at 13400xg for 15 min and the OD590 of the supernatant was measured by spectrophotometry (HITACHI UV-VIS). The OD value of the pure crystal violet solution originally used in the assay was measured and it was considered as 100%. The percentage of crystal violet uptake of the samples was calculated as described in Devi et al., 2010.

2.4.4. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

A recent culture of *B. fragilis* ATCC 25285 was exposed to a 64 $\mu\text{g/ml}$ concentration of the EO for one hour, and a pure unexposed culture of the same strain was used as control. For the slide preparation, 1 mL of the cultures were centrifuged at 3000xg for 3 min and washed once with PBS. Next, the formed pellet was resuspended in 1 mL of PBS. A drop of this suspension was added to each slide and let to air dried. The slides were stained with Acridine Orange 10mg/mL (INVITROGEN, Carlsbad, USA) and set with cytoseal-60 (SIGMA). Subsequently, images of stained bacteria were captured using the CSLM system FLUOVIEW FV 1000 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) with 60X objective lenses with additional zoon of 3X, using a excitation and emission wave length of 488nm and 525nm respectively.

2.5. Strains in Biofilm

2.5.1 Biofilm preparation Biofilms were grown on sterile cellulose nitrate membrane filters (CNM) of 0.22 μm pore size, 13mm diameter (MILLIPORE, Billerica, USA), handled under sterile conditions. The methodology used for the formation of the biofilm was adapted from those described by Merrit et al. (2005) and Gursoy et al. (2009). The inoculum was prepared in a liquid medium as follows: 20 μl of bacterial culture, freshly grown in BHI broth and adjusted to the turbidity of 6 MacFarland (OD600 -2.27 nm) was inoculated onto each CNM placed on BHI agar with 5% sheep blood plates and incubated for 3 days in anaerobic conditions.

2.5.2. Analysis of the oil effect on mature biofilm at two different exposure periods
After the biofilms were grown of on the CNMs, they were aseptically removed from the agar plates and exposed to different concentrations of the EO (MIC and 2xMIC) in BHI broth for 1 and 2 hours. After that time the solutions underwent serial dilutions of 10to 10in tubes with reduced-medium broth. Inocula of 25 μL for each dilution were incubated in BHI agar with 5% sheep blood and analyzed after 48 hours. The tests were all performed in triplicate for each bacterium.

3. Results

The chemical analyses showed that the major constituent of the *P. amboinicus* EO was carvacrol (90.55%), followed by others terpenoids. The determination of MIC for the EO against planktonic cells showed values of 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *F. nucleatum*, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *B. fragilis* and 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *B. thetaiotaomicron*.

The kill-time analysis provided data about the start time and duration of the EO's antibacterial activity against anaerobic cultures (Figure 1). After exposure to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (supra MIC) and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MIC) concentrations, the bacterial population of *B. fragilis* was completely inactivated within 60 minutes. The concentration of 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ demonstrated bacetriostatic action after 60 and 120 min exposures and bactericidal effect after 4 hours. The concentrations of 128, 64 and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were bactericidal for the planktonic strains of *F. nucleatum* and total inhibition was observed within 120 min at supra MIC concentrations (128 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). For *B. thetaiotaomicron*, the concentration of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MIC) showed total inhibition of strains after 1 hour exposure and the concentrations of 64 and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were bacteriostatic at 60 and 120 minutes. At 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the EO had bacteriostatic action against *B. thetaiotaomicron* only after 4 hours. *B. thetaiotaomicron* was the species that needed the highest concentrations of the *P. amboinicus* EO to suffer its bactericidal effect, followed by *B. fragilis* and *F. nucleatum*, in descending order.

To investigate the mechanism of action of the *P. amboinicus* EO against the cell membranes of these anaerobic bacteria two assays were executed: the crystal violet assay and the analysis of cell surface by CLSM. The initial crystal violet uptake by the tested anaerobic strains was of 29%, in the absence of the EO, but that was increased by 50% after 1 hour exposure to the EO at 64 and 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Metronidazol showed no effect on the crystal violet uptake, while the chelating agent EDTA (0.25M) increased that uptake in over 60% of the initial uptake. The advanced microscopy by CLSM, with the use of the nucleic acid selective fluorescent cationic dye Acridine Orange, revealed a significant reduction in the number of bacteria and measured fluorescence, for *B. fragilis*, after 1h exposure to the inhibitory concentration of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 10 the *P. amboinicus* EO when compared to the non-exposed control.

Suprainhibitory concentrations of the *P. amboinicus* EO (MIC and 2xMIC) showed lack of antibiofilm activity against the tested strains.

4. Discussion and conclusions

Carvacrol, the main component in *P. amboinicus* EO, has attracted considerable attention from researchers, as a result of its wide-spectrum antimicrobial activity (Nostro et al. 2004; Knowles et al. 2005,). According to Ben Arfa et al., 2006 and Nostro et al., 2009, carvacrol acts, like many other EOs, on the cytoplasmic membrane of cells with considerable effects on its structural and functional properties. The membrane becomes increasingly permeable to protons and ions and loses its integrity. Some studies have demonstrated that carvacrol acts against Gram positive and Gram negative aerobic bacteria (Gill & Holley, 2006; Nostro et al., 2004). And it has also been reported that carvacrol can inhibit the growth of Gram positive and Gram negative aerobic bacteria in biofilm (Knowles et al., 2005; Nostro et al., 2009).

Nostro et al (2009) reported that, after in vitro exposure to carvacrol for a period of 3 hours, a major reduction was observed in staphylococcus biofilm aggregated cells. This was similar to results observed after 24 h exposure, suggesting that the carvacrol mainly acted on the biofilm during the first 3 hours, after which it exhibits no further antibacterial activity.

The presently observed bactericidal action of *P. amboinicus* EO over anaerobic Gram negative bacilli occurred within 2 hours of exposure. The most sensitive species was *Fusobacterium nucleatum*, followed by *B. fragilis*, being *B. thetaiotaomicron*, the most resistant. These findings are comparable to what is commonly reported of these bacteria in regards to their susceptibility to antibiotics in general. Within the *B. fragilis* group, *B. thetaiotaomicron* is the species that presents with the largest spectrum of resistance to antimicrobial drugs (CLSI, 2007).

The crystal violet and CLSM assays were carried out just for *B. fragilis* as it is the most frequently isolated and most clinically relevant of the three species investigated. These showed, as other studies have shown, that carvacrol has direct effect on the membrane of bacteria. These results are consistent with earlier studies showing that carvacrol kills aerobic bacteria through a membranolytic mechanism (Ben Arfa et al., 2006 and Nostro et al., 2009). This suggests that both aerobic and anaerobic bacteria share surface features that are target by this EO.

No effect on mature biofilms was observed (bacteriostatic or bactericidal) after exposure to the EO at 2x MIC. It is possible that higher concentrations might show some inhibitory effect, which would need further tests to confirm.

These studies establish that the antibacterial activity spectrum of *P. amboinicus* EO includes the *Bacteroides fragilis* group, thus encouraging further investigations of its therapeutic

potential, especially for topical use in chronic wounds such as diabetic foot, as it is already traditionally and empirically used in the northeast of Brazil.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian agencies FUNCAP and CNPq for their financial support. This research could not have been done without the cooperation of Dr. Aparecida T. Nagao-Dias and her graduate student Thally Braga Gonçalves, the Chemistry department at UFC, and the technical support of José Olavo Moraes.

References

- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy. 3ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43,149-154.
- Brook, I. & Frazier, E.H., 1998. Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers. *Int. J. Dermatol.* 37, 426-428.
- Carvalho, C.B.M.; Motta Neto, R., Aragão, L.P.; Oliveira, M.M.; Nogueira, M.B.; Forti, A., 2004. Pé diabético: análise bacteriológica de 141 casos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 48(3), 398-405.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, seventh edition. M11A7. Wayne, PA.
- Costa, J.G.M., Pereira, C.K.B., Rodrigues, F.F.G., 2010. Chemical composition, antibacterial and fungicidal activities of leaf oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *J. Essent. Oil Res.* 22,183-185.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K., 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* 130,107-115.
- Espinosa, Y., Nieves, B., Quintana, A., 1999. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot disease. *Anaerobe*. 5, 405-407.
- Gill, A.O. & Holley, R.A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 170-174.

Goldstein, E.J., Citron, D.M., Vesbit, C.A., 1996. Diabetic foot infections: Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes Care.* 19, 638-41.

Gurgel, A.P.A.D., Silva, J.G., Grangeiro, A.R.S., Xavier, H.S., Oliveira, R.A.G., Pereira, M.S.V., Souza, I.A., 2009. Antibacterial effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Lat. Am. J. Pharm.* 28(3), 460-464.

Gursoy, U.K., Gursoy, M., Gursoy, O.V., Cakmakci, L., Kononen, E., Uitto, V.J., 2009. Antibiofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe* 15(4), 164-167.

Howell-Jones, R.S., Wilson, M.J., Hill, K.E., Howard, A.J., Price, P.E., Thomas, D.W., 2005. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemoth.* 55, 143-149.

Knowles, J.R., Roller, S., Murray, D.B., Naidu, A.S., 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Appl Environ Microb.* 71, 797-803.

Merrit, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A., 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 1B1.1-1B1.17. (DOI:10.1002/9780471729259.mc01b01s22)

Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Sudano Roccaro, A., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 191-195.

Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R., Cellini, L., Giulio, M.D., Pizzimenti, F., Roccaro, A.S., Bisignano, G., 2009. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *J Med Microbiol.* 58, 791-797.

Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Vieira, W.L., Freire, K.R.L., Trajano, V.N., Lima, I.O., Souza, E.L., Toledo, M.S., Silva-Filho, R.N., 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16(1), 77-82.

Rice, L.J., Brits, F.J., Potgieter, C.J., Van Staden, J., 2011. *Plectranthus*: a plant for the future? *S. Afr. J. Bot.* Article in press. (DOI:10.1016/j.sajb.2011.07.001)

Sathasivam, A. & Elangovan, K., 2011. Evaluation of phytochemical and antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus*. *IJRAP.* 2(1), 292-294.

Shah, M. & Mohanraj, M., 2003. High levels of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatology patients. *Brit J Dermatol.* 148, 1018-1020. Nagoba, B.S., Wadher, B.J., Rao, A.K., Kore, G.D., Gomashe, A.V., Ingle, A.B., 2008 A simple and effective approach for the treatment of chronic wound infections caused by multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. *J Hosp Infect.* 69(2), 177-180.

Wolcott, R.D. & Ehrlich, G.D., 2011. Biofilms and chronic infections. *JAMA.* 299(22), 2682-2685.

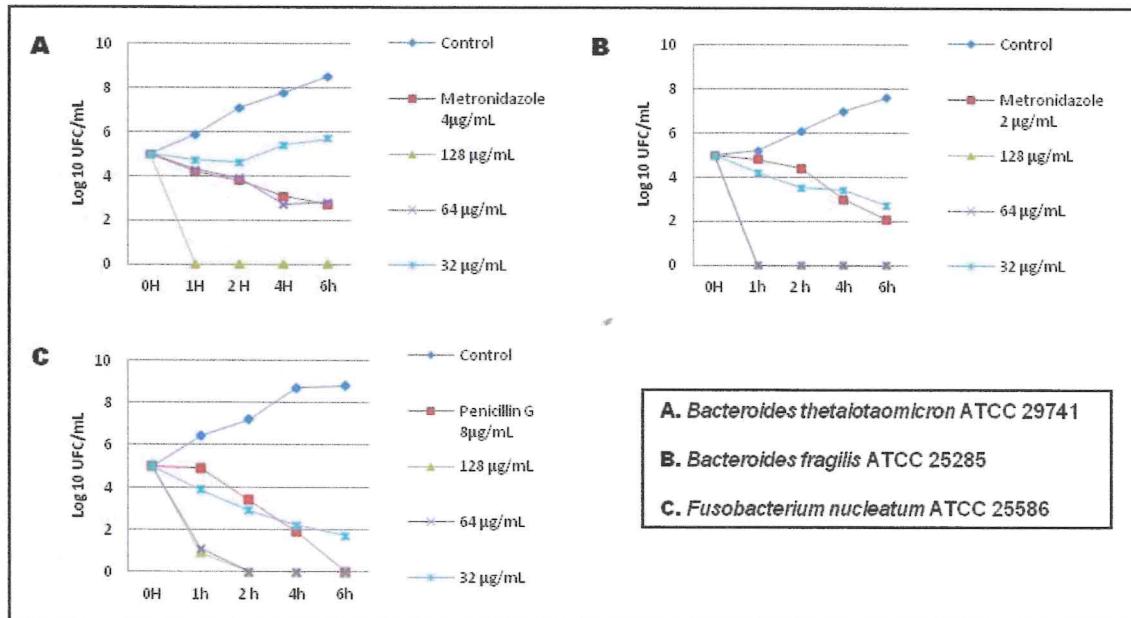


Figure 1. Kinetic analysis of growth for (A) *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, (B) *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 and (C) *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 after exposure to *P. amboinicus* essencial oil for different time periods (0 – 6h) and at three concentrations (32, 64 and 128 µg/ml), compared to a control drug and nonexposed bacteria.

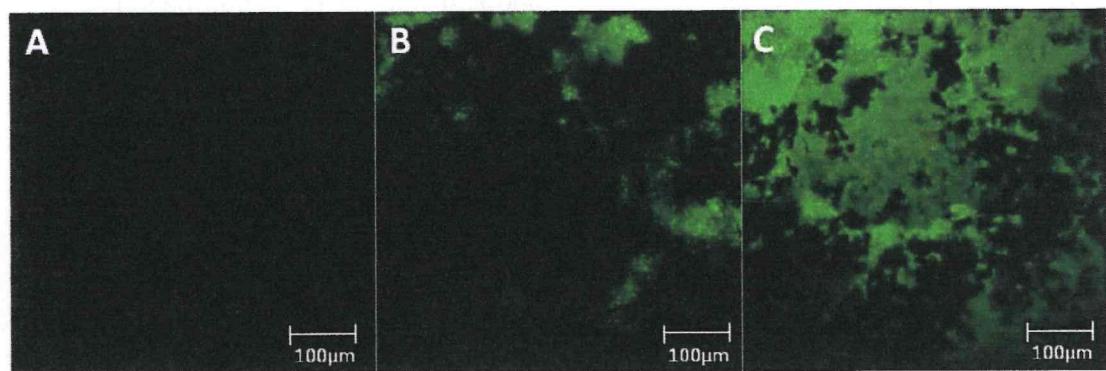


Figure 2. Confocal laser scanning microscopy images of *B. fragilis* ATCC 25285: (A) medium control, (B) culture after exposure to *P. amboinicus* essential oil for 1 hour, and (C) non-exposed culture.

7 CONCLUSÕES

- As folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng forneceram um OE contendo 5 constituintes. O composto majoritário, identificado como carvacrol (90,55%), determina o quimiotipo do material vegetal estudado;
- O óleo essencial de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng apresentou atividade antimicrobiana *in vitro*, frente aos bacilos Gram negativos anaeróbios testados (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Bacteroides thetaiotaomicron*) em forma planctônica, com CIM de 64, 64 e 128 μ g/mL respectivamente. No entanto, para o biofilme destas espécies, concentrações iguais a do CIM e 2 x CIM não foram capazes de inibir seu crescimento;
- Em relação às cepas testadas, o óleo essencial revelou um efeito bactericida em até 2h, demonstrando um efeito inibitório mais eficaz que os apresentados por drogas usuais;
- Em concentrações bactericidas, o óleo essencial foi capaz de causar dano a membrana plasmática, aumentando a permeabilidade bacteriana e consequentemente promovendo morte celular;
- Na avaliação da toxicidade do óleo essencial frente a *Artemia* sp., um valor de CL₅₀ inferior a 1000 μ g/mL permite considerar o composto como tóxico;
- Os resultados obtidos são promissores mas ainda preliminares. Estudos de toxicidade em células sadias e tumorais e ensaios para testar o óleo sobre biofilmes bacterianos utilizando concentrações maiores do OE podem ser realizados. A atividade bactericida do óleo essencial avaliado pode abrir perspectivas, no desenvolvimento de fitofármacos eficazes e de baixo custo, com vistas a serem utilizados no tratamento de infecções bacterianas por organismos anaeróbios no futuro.

REFERÊNCIAS

AGNANIET, H; AGREBI, A; BIKANGA, R; MAKANI, T; LEBIBI, J; CASSABIANCA, H; MORÈRE, A; MENUT, C. Essential oil of *Plectranthus tenuicaulis* leaves from Gabon, source of (R), (E)-6, 7-epoxyocimene. An unusual chemical composition within the genus *Plectranthus*. **Nat. Prod. Commun.**, v. 6, n. 3, p. 409-416, 2011.

AMARAL, JF. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell.** Arg. 2004. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

AYALA, J. Penicillin-binding proteins of *Bacteroides fragilis* and their role in the resistance to imipenem of clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, v 54 (11): p 1055, 2005.

BABB, JL; CUMMINS, CS. Encapsulation of *Bacteroides* species. **Infect. Immun.**, v. 19, n. 3, p. 1088-1091, 1978.

BARTLETT, JG. Anaerobic bacteria. General concepts. In: MANDELL, GL; BENNETT, JE; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious disease**. Churchill Livingstone, 3ed, p.1828, 1989.

BERG, JO; LINDGVIST, L; ANDERSSON, G; NORD, CE. Neuraminidase in *Bacteroides fragilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 75-80, 1983.

BERTINI, LM; PEREIRA, AF; OLIVEIRA, CLL; MENEZES, EA; MORAIS, SM; CUNHA, FA; CAVALCANTI, ESB. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BJARNSHOLT, T; GIVSKOV, M. Ecology of biofilms in chronic wounds. **Adv. Wound care**, v. 1, p. 287-292, 2010.

BOENTE, RF; FERREIRA, LQ; FALCÃO, LS; MIRANDA, KR; GUIMARÃES, PLS; SANTOS-FILHO, J; VIEIRA, JMBD; BARROSO, DE; EMOND, JP; FERREIRA, EO; PAULA, GR; DOMINGUES, RMCP. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. **Anaerobe**, v. 16, p. 190-194, 2010.

BOWLER, PG; DUERDEN, BI; ARMSTRONG, DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin. Microb. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 244-269, 2011.

BRIOUKHANOV, AL; NETRUSOV, AI. Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. **Biochemistry**, v. 69, n. 9, p. 949-962, 2004.

BROOK I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 183-189, 2010.

BROOK, I. Pericarditis caused by anaerobic bacteria. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, n. 4, p. 297-300, 2009.

CÂMARA, CC; NASCIMENTO, NR; MACÊDO-FILHO, CL; ALMEIDA, FB; FONTELES, MC. Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Med.**, v. 69, n. 12, p. 1080-1085, 2003.

CANO, JH; VOLPATO, G. Herbal mixture in the traditional medicine of Eastern Cuba. **J. Etnopharmacol.**, v. 90, p. 293-316, 2004.

CARAVAGGI, C; PIAGGESI, A; MENICHETTI, F. Diabetic foot infections. **Infez Med.**, v. 17, n. 8, p. 77-87, 2009.

CARVALHO, CBM; MOREIRA, JLB; FERREIRA, MCS. Survey of *Bacteroides fragilis* group susceptibility patterns in Brazil. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 8, p. 115-120, 1997.

CARVALHO, CBM; NETO R, ARAGÃO, LP; OLIVEIRA, MM; NOGUEIRA, MB; FORTI, AC. Pé Diabético: Análise Bacteriológica de 141 casos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 3, p. 398-405, 2004

CASTRO, NEA; CARVALHO, GJ; CARDOSO, MG; PIMENTEL, FA; CORREA, RM; GUIMARÃES, LGL. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 10, n. 1, p. 70-75, 2008.

CATO, EP; JOHNSON, JL. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *B. vulgatus*: Designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 26, p. 230-237, 1976.

CHANG, SL; CHANG, YC; YANG, CH; HONG, HS. Allergic contact dermatitis to *Plectranthus amboinicus* masquerading as chronic leg ulcer. **Contact Dermatitis**, v. 53, n. 6, p. 356-357, 2005.

CHATZOPOULOU, FM; MAKRIS, AM; ARGIRIOU, A; DEGENHARDT, J; KANELLIS, AK. EST analysis and annotation of transcripts derived from a trichome-specific cDNA library from *Salvia fruticosa*. **Plant. Cell. Rep.**, v. 29, n. 5, p. 523-534, 2010.

CITRON, D; GOLDSTEIN, EJC. An anaerobe odyssey. **Clin. Infect. Dis**, 35(suppl 1): S1, 2001.

CITRON, DM. Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *Fusobacterium*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, (Suppl 1), p. 22-27, 2002.

COSTA, JGM; RODRIGUES, FFG; ANGÉLICO, EC; SILVA, MR; MOTA, ML; SANTOS, NKA; CARDOSO, ALH; LEMOS, TLG. Estudo químico-biológico dos

óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COSTERTON, JW; GEESEY, GG; CHENG, KJ. How bacteria stick. **Sci. Am.**, v. 238, n. 1, p. 86-89, 1978.

COSTERTON, JW; STEWART, PS; GREENBERG, EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COYNE, MJ; KALKA-MOLL, W; TZIANABOS, AO; KASPER, DL; COMSTOCK, LE. *Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 11, p. 6176-6181, 2000.

DAVIS, SC; RICOTTI, C; CAZZANIGA, A; WELSH, E; EAGLSTEIN, WH; MERTZ, PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. **Wound Repair Regen.**, v. 16, n. 1, p. 23-29, 2008.

DONLAN, RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

FERREIRA, DP; SILVA, LV; GUIMARAES, DA; COELHO, MC; ZAULI, DAG; FARIAS, ML; CARVALHO, MAR; DINIZ, GC. Distribution, detection of enterotoxigenic strains and antimicrobial drug susceptibility patterns of *Bacteroides fragilis* group in diarrheic and non-diarrheic feces from brazilian infants. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 603-611, 2010.

FINEGOLD, SM. Anaerobic infections in humans: an overview. **Anaerobe**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1995.

FRANÇA, F; LAGO, EL; MARSDEN, PD. Plants used in the treatment of grown in Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 14, p. 101-102, 1996.

GAETTI-JARDIM, EC.; MARQUETI, AC.; FAVERANI, LP.; GAETTI-JARDIM, E., JR. Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 18, n. 6, p. 551-9, 2010

GEMTCHÚJNICOV, ID. **Manual de taxonomia vegetal. Plantas de interesse econômico, agrícola, ornamental e medicinal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.

GURGEL, APAD; da SILVA, JG; GRANGEIRO, ARS; XAVIER, HS; OLIVEIRA, RAG; PEREIRA, MSV; de SOUZA, IA. Antibacterial effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Latin Am. J. Pharmacy**, v. 28, p. 460-466, 2009.

HALL-STOODLEY, L; STOODLEY, P . Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends Microbiol** v.13, n. 1, p. 7-10, 2005.

HAO, WL; LEE, YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. **Methods Mol. Biol.**, v. 268, n. 5, p. 491-502, 2004.

HECHT, DW. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. **Anaerobe**, v. 12, n. 3, p. 115-121, 2006.

HOLDEMAN LV, MOORE, WEC. Genus I. *Bacteroides* Castellani e Chalmers 1919. In: BUCHANAN RE; GIBBONS, NE. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8ed. Baltimore: the Williams and Wilkins, p 385-404, 1974.

IMLAY, JA. How obligatory is anaerobiosis? **Mol. Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 801-804, 2008.

ISMAN, MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 51, p. 45-66, 2006.

JACQUES, M; ARAGON, V; TREMBLAY, YD. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 97-121, 2010.

JAMES, GA; SWOGGER, E; WOLCOTT, R; PULCINI, E; SECOR, P; SESTRICH, J; COSTERTON, JW; STEWART, PS. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair Regen**, v. 16, n.1, p.37-44, 2008.

JOUSIMIES-SOMER, HR; SUMMANEN, PH. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. Suppl 1, p. S17-21, 2002.

JOUSIMIES-SOMER HR., SUMMANEN PH., WEXLER H et al. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and other anaerobic Gram-negative bacteria. In: Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., et. al. **Manual of Clinical Microbiology**, 8 ed. Washington, DC: ASM Press, 2003

KERNTOPF, MR; ALBUQUERQUE, RL; MACHADO, MIL; MATOS, FJA; CRAVEIRO, AA. Essential oils from leaves, stems and roots of *Plectranthus barbatus* Andr. (Labiatae) grown in Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v.14, p. 101-102, 2002.

KLAUSEN, M; HEYDORN, A; RAGAS, P; LAMBERTSEN, L; AAES-JØRGENSEN, A; MOLIN, S; TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n. 6, p. 1511-1524, 2003.

KONEMAN, E; WASHINGTON JÚNIOR, W; ALLEN, S; JANDA, W; PROCOP, G; SCHRECKENBERGER, P; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KURITA-OCHIAI, T; OCHIAI, K; FUKUSHIMA, K. Volatile fatty acid, metabolic by-product of periodontopathic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and RAJI B lymphoma cells and splenic B cells. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2587-2594, 1998.

LAI, F; LOY, G; MANCONI, M; MANCA, ML; FADDA, AM. *Artemisia arborescens* L. essential oil loaded beads: preparation and characterization. **AAPS Pharma Sci. Tech.**, v. 8, n. 3, p E1-E7, 2007.

LEMON, KP; EARL, AM; VLAMAKIS, HC; AGUILAR, C; KOLTER, R. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 1-16, 2008.

LIMA, SMG; LIMA, AF; DONAZZOLO, J. Resgate do conhecimento popular e uso de plantas medicinais na promoção da saúde em Sananduva, RS. Porto Alegre, **Rev. Bras. Agroecol.**, v.2, n.1, 2007.

LIMA, IO; OLIVEIRA, RAG; LIMA, EO; FARIAS, NMP; SOUZA, EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LOESCHE, WJ. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. **Appl. Microbiol.**, v. 18, n. 5, p. 723-727, 1969.

LUKHOBA, CW; SIMMONDS, MS; PATON, AJ. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, n. 1, p. 1-24, 2006.

MAH T. F., O'TOOLE G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.** V.9, p. 34–39, 2001.

MALLAVARAPU GR; RAMESH, S; MENGI, N; KALRA, A. Chemical composition of the essential oil of *Plectranthus melissooides* Benth. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, n. 3, p. 259-260, 2005.

MANCUSO, G; MIDIRI, A; BIONDO, C; BENINATI, C; GAMBUZZA, M; MACRÌ, D; BELLANTONI, A; WEINTRAUB, A; ESPEVIK, T; TETI, G. *Bacteroides fragilis* derived lipopolysaccharide produces cell activation and lethal toxicity via toll-like receptor 4. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5620-5627, 2005.

MARSH, PD; MARTIN, MV. **Oral Microbiology**. 5 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, 2009.

MARWAH, RG; FATOPE, MO; DEADMAN, ML; OCHEI, JE; AL-SAIDI, SH. Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, n. 4, p. 1220-1226, 2007.

MEEHAN, BM; MALAMY, MH. Fumarate reductase is a major contributor to the generation of reactive oxygen species in the anaerobe *bacteroides fragilis*. **Microbiol.**, v.158(2), p 539, 2011.

MERLE, H; MORÓN, M; BLÁZQUEZ, AM; BOIRA, H. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. **Biocheml. Systematic Eco.**, v. 32, p. 491-497, 2004.

MURPHY, TF; KIRKHAM, C. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. **BMC Microbiol.**, v. 2, p. 7, 2002.

MURTHY, PS; RAMALAKSHMI, K; SRINIVASP. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. **Food Chem.**, v 114, p. 1014-1018, 2009.

NAGOBA, BS; WADHER, BJ; RAO, AK; KORE, GD; GOMASHE, AV; INGLE, AB. A simple and effective approach for the treatment of chronic wound infections caused by multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. **J. Hosp. Infect.**, v. 69, n. 2, p. 177-180, 2008.

NEWTON, H. Using sugar paste to heal postoperative wounds. **Nurs Times**, v. 96, n. 36, p. 15-16, 2000.

NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O. In vitro antimicrobial activity of plants in acute otitis externa. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 74, n. 1, p. 118-124, 2008.

NUNES, XP; MAIA, GLA; ALMEIDA, JRGS; PEREIRA, FO; LIMA, EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Braz. J. Pharmacogn.** v. 16, p. 642-644, 2006.

OH, YJ; LEE, NR; JO, W; JUNG, WK; LIM, JS. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**. v. 109, n. 8, p. 874-880, 2009.

OKUDA, T; KOBUBU, E; KAWANA, T; SAITO, A; OKUDA, K; ISHIHARA, K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella* species. **Anaerobe**. v. 18, p. 110-116, 2011.

OLIVEIRA, R.A; TORRES AR; DINIZ, MFFM; ARAÚJO, EC. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios **Brazil. J. Pharmacogn.** v.15, p. 373-80, 2005.

OLSEN, I; DAHLÉN, G. Salient virulence factors in anaerobics bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. **Endodontic Topics**, v. 9, n. 1, p. 15-26, 2004.

OUSEY, K; MCINTOSH, C. Tropical antimicrobial agents for the treatment of chronic wounds. **Br. J. Community Nurs.** v. 14, n. 9, p. S6-S10, 2009.

OYEDJI, OA; AFOLAYAN, AJ. Chemical composition an antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. **J. Essent. Oil Res.** v. 18, p. 57-59, 2006.

OYSTON, PC; HANDLEY, PS. Surface components of *Bacteroides fragilis* involved in adhesion and haemagglutination. **J. Med. Microbiol.** v. 34, n. 1, p. 51-55, 1991.

PALANI, S; RAJA, S; NARESH, R; KUMAR, BS. Evaluation of nephroprotective, diuretic and antioxidant activities of *Plectranthus amboinicus* on acetaminophen-induced nephrotoxic rats. **Toxicol. Mech .Methods.**, v. 20, n. 4, p. 213-21, 2010.

PAPAIOANNOU, W; PANAGOPOULOS, A; KOLETSI-KOURNARI, H; KONTOU, E; MAKOU, M. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and biofilm formation on different types of orthodontic brackets. **Int. J. Dent.** v. 2012, p. 50-56, 2011

PASTERNAK, J. **Biofilmes: um inimigo (in)visível**. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. p. 36-38, 2009

PERCIVAL, SL; BOWLER, PG. Biofilms and their potential role in wound healing. **Wounds.**, v.16, n. 7, p. 234–240, 2004.

PERIYANAYAGAM, K; NIRMALA DEVI, K; SUEELA, L; UMA, A; ISMAIL, M. In vivo antimalarial activity of leaves of *Plectranthus amboinicus* (lour) spreng on *Plasmodium berghei* yoelii. **J. Commun Dis.**, v. 40, n. 2, p. 121-125, 2008.

PESCI, EC; PEARSON, JP; SEED, PC; IGLEWSKI BH. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 179: p. 3127-3132, 1997.

PUMBWE, L; SKILBECK, CA; NAKANO, V; AVILA-CAMPOS, MJ; PIAZZA, RM; WEXLER, HM. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. **Microb. Pathog.**, v. 43, n. 2-3, p. 78-87, 2007.

PUMBWE, L; SKILBECK, CA; WEXLER, HM. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. **Microb. Ecol.**, v. 56, n. 3, p. 412-419, 2008.

REISNER, A; HAAGENSEN, JAJ; SCHEMBRI, MA; ZECHNER, EL; MOLIN, S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 933-946, 2003.

REYSENBACH, AL; CADY, SL. Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 79–86, 2001.

ROSHAN, P.; NAVEEN, M; MANJUL, PS; GULZAR, A; ANITA, S; SUDARSHAN, S. *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng: a overview. **Pharma Res.**, v. 4, p. 1-15, 2010.

SANTOS, SG. **Resposta ao estresse oxidativo em *Prevotella intermedia*: alterações fisiológicas e moleculares e implicações na virulência bacteriana** 2007. Dissertação (Mestrado). Belo Horizonte, UFMG, 2007.

SEARS, CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbionts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n. 2, p. 349-369, 2009.

SEBALD, M. **Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria**. Springer-Verlag New York, Inc, 1993.

SENTHILKUMAR, A; VENKATESALU, V. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. **Parasitol. Res.**, v. 107, n. 5, p. 1275-1278, 2010.

SEYOUM, A; PALSSON, K; KUNG'A, S; KABIRU, EW; LWANDE, W; KILLEEN, GF; HASSANALI, A; KNOLS, BG. Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, n. 3, p. 225-231, 2002.

SILLEY, P; STEPHAN, B; GREIFE, HA; PRIDMORE, A. Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 60, n. 5, p. 999-1003, 2007.

SILVA, AJR; ANDRADE, LHC. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 45-60. 2005.

SIMOES, M; SIMOES, LC; VIEIRA, MJ. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 128, n. 2, p. 309-316, 2008.

SINGER, E; CALVET, L; MORY, F; MULLER, C; CHOMARAT, M; BÉZIAN, MC; BLAND, S; JUVENIN, ME; DRUGEON, H; FOSSE, T; GOLDSTEIN, F; JAULHAC, B; MONTEIL, H; MARCHANDIN, H; JEAN-PIERRE, H; DUBREUIL, L. Monitoring of antibiotic resistance of gram negative anaerobes. **Med. Mal. Infect.**, v. 38, n. 5, p. 256-263, 2008.

SNYDMAN, DR; JACOBUS, NV; McDERMOTT, LA; RUTHAZER, R; GOLAN, Y; GOLDSTEIN, EJ; FINEGOLD, SM; HARELL, LJ; HECHT, DW; JENKINS, SG; PIERSON, C; VENEZIA, R; YU, V; RIHS, J; GORBACH, SL. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51, n. 5, p. 1649-1655, 2007.

SNYDMAN, DR; JACOBUS, NV; MCDERMOTT, LA. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data. **Clin. Infect. Dis.** v.50, 2010.

SÓKI, J; GONZALEZ, SM; URBÁN, E; NAGY, E; AYLA, JA. Molecular analysis of the effector mechanism of cefotxin resistance among *Bacteroides* strains. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 66 (11), p. 2492-2500, 2011.

STOODLEY, P; SAUER, K; DAVIES, DG; COSTERTON, JW. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUMMANEN, P. Recent taxonomic changes for anaerobic gram-positive and selected gram-negative organisms. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, Suppl 4, p. S168-174, 1993.

SUN, Y; SMITH, E; WOLCOTT, R; DOWD, SE. Propagation of anaerobic bacteria within an aerobic multi-species chronic wound biofilm model. **J. Wound Care**, v. 18, n. 10, p. 426-431, 2009.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3-9, 2001.

TUIN, A; HUIZINGA-VAN DER VLAG, A; VAN LOENEN-WEEMAES, AM; MEIJER, DK; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 290, n. 2, p. G377-385, 2006.

TZIANABOS, AO; ONDERDONC, AB; ROSNER, B; CISNEROS, RL; KASPER, DL. Structural features of polysaccharides that induce intraabdominal abscesses. **Science**, v. 262, p. 416-419, 1993.

VEILLON, A; ZUBER, A. Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. **Arch. Med. Exp.**, v. 10, p. 517-545, 1898.

VERA, R; MONDON, JM; PIERIBATTESTI, JC. Chemical composition of the essential oil and aqueous extract of *Plectranthus amboinicus*. **Plant. Med.**, v. 59, n. 2, p. 182-183, 1993.

VISWANATHAN, V; JASMINE, JJ; SNEHALATHA, C; RAMACHANDRAN, A. Prevalence of pathogens in diabetic foot infection in South Indian type 2 diabetic patients. **J. Assoc. Physicians India**, v. 50, p. 1013-1016, 2002.

XIE, H; KOZLOVA, N; LAMOUNT, RJ. *Porphyromonas gingivalis* genes involved in fimA regulation. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 651-658, 2004.

WALDEN, WC; HENTGES, DJ. Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. **Appl. Microbiol.**, v. 30, n. 5, p. 781-785, 1975.

WEINACHT, GK; ROCHE, H; KRINOS, CM; COYNE, MJ; PARKHILL, J; COMSTOCK, LE. Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affecting the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*. **Molecular Microbiol.**, v. 53, n. 5, p. 1319-1330, 2004.

WEXLER, HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 4, p. 593-621, 2007.

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. **Microbiol.**, v. 153, p. 3923-3938, 2007.

YILMAZ, O. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbe, the human oral epithelium and their interplay. **Microbiol.**, v. 154, n. Pt 10, p. 2897-2903, 2008.

ZAMOCKY, M; FURTMÜLLER, PG; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxid Redox Signal.**, v. 10, n. 9, p. 1527-1548, 2008.

APÊNDICES

1 Metodologia Complementar

1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) Pela Técnica da Diluição em Ágar (CLSI, 2007)

1.1.1 Antimicrobianos

Foi testado o OE de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng, os compostos isolados, carvacrol e timol e os antimicrobianos metronidazol e penicilina G, obtidos da Sigma-Chemical (EUA). As concentrações utilizadas variaram de 128 µg/ml a 0,125 µg/ml. Na preparação das soluções estoques dos antimicrobianos foi utilizada água destilada estéril como diluente e para o OE foi utilizado DMSO 3% como solvente. Após o preparo, as soluções foram distribuídas em alíquotas de 5 mL e estocadas a - 20° C (Quadro 1).

Quadro 1 – Preparo das soluções de antimicrobianos.

TUBO	SOLUÇÃO ESTOQUE DO ANTIMICROBIANO	DILUENTE	CONCENTRAÇÃO
			FINAL DA SOLUÇÃO (µg ou U/mL)
1	1 vol. 1280	-----	1280
2	1 vol. 1280	1 volume	640
3	1 vol. 1280	3 volumes	320
4	1 vol. 1280	7 volumes	160
5	1 vol. 160	1 volume	80
6	1 vol. 160	3 volumes	40
7	1 vol. 160	7 volumes	20
8	1 vol. 20	1 volume	10
9	1 vol. 20	3 volumes	5
10	1 vol. 20	7 volumes	2,5

1.1.2 Meio de cultura e preparo das placas

O meio de cultura utilizado neste estudo, bem como o preparo das placas pode ser visualizado no quadro 2.

O meio de cultura foi o agar Brucella suplementado e adicionado 5% de SDC, para inoculação das amostras em placas de Petri (100 x13mm).

Com o objetivo de detectar uma possível contaminação com bactérias aeróbias e avaliar a viabilidade das amostras estudadas, foram utilizadas quatro placas controle, sendo duas no início e duas no final de cada experimento. Duas placas controles foram incubadas anaerobicamente e duas em atmosfera convencional.

Placas controle: 18 mL do meio agar Brucella + 1 mL de SDC + 1,0 mL do diluente (água destilada estéril).

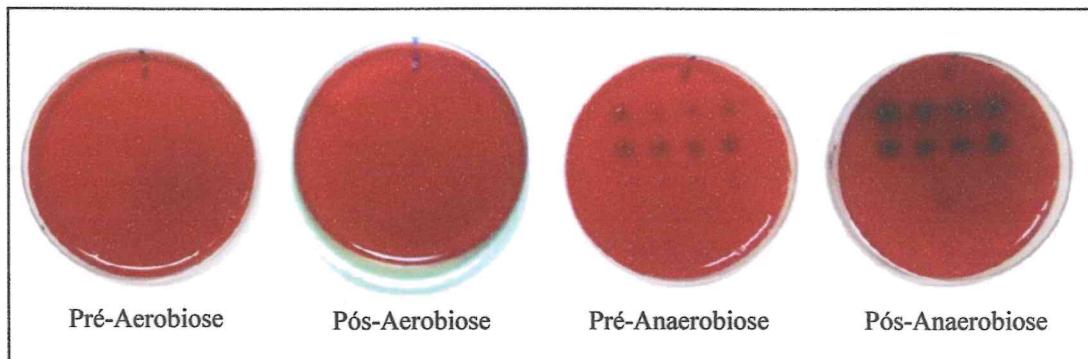
Quadro 2 – Meio de cultura e preparo das placas.

PLACA	BRUCELLA ÁGAR (mL)	SANGUE DESFIBRINADO DE CARNEIRO (mL)	ANTIMICROBIANO (mL)	CONCENTRAÇÃO FINAL NA PLACA (μ g ou U/mL)
1	17	1	2 ml Tubo 1	128
2	17	1	2 ml Tubo 2	64
3	17	1	2 ml Tubo 3	32
4	17	1	2 ml Tubo 4	16
5	17	1	2 ml Tubo 5	8
6	17	1	2 ml Tubo 6	4
7	17	1	2 ml Tubo 7	2
8	17	1	2 ml Tubo 8	1
9	17	1	2 ml Tubo 9	0,5
10	17	1	2 ml Tubo 10	0,25

1.1.3 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura das placas inoculadas foi realizada após 48h de incubação. Foram utilizados como padrão de crescimento os controles de anaerobiose, ou seja, placas sem antimicrobianos, que foram comparadas com o crescimento das culturas nas placas inoculadas e com agente antimicrobiano. Foi considerada a CIM do antimicrobiano para cada cepa testada, a menor concentração do antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento da cepa ou quando foi observada a presença de crescimento apenas discreto no local da inoculação ou ainda, uma fina película de crescimento visível a olho nu.

As placas controle de aerobiose foram examinadas antes da determinação da CIM. Qualquer crescimento nessas placas era indicativo de contaminação, dessa forma, a descontaminação da cultura e repetição do teste era realizada (Figura 4).



Fonte: MENDES, 2011

Figura 4. Placas controle pré e pós-aerobiose e pré e pós- anaerobiose.

1.2 Análise microscópica de força atômica

Uma suspensão do microrganismo foi preparada a partir de uma cultura *overnight* em BHIS a 37 °C sob condições estáticas. Uma alíquota desta solução foi coletada, lavada com tampão PBS, centrifugada e sua turbidez ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A partir de então, um inóculo do organismo foi adicionado a 4,5 mL de PBS contendo as diluições seriais do MIC (128, 64 e 32 μ L/mL). Após incubação a 37 °C por 1 a 2 horas, 2 mL da suspensão foi coletado e centrifugado a 2600 rpm por 1 hora, o *pellet* obtido foi dividido em uma lâmina de microscopia, onde uma parte foi secada ao ar e outra parte foi fixada com glutaraldeído 2,5% por 10 minutos e desidratada com etanol graduado (25% - 100%) por 20 minutos.

Após a preparação, as amostra foram conduzidas ao Microscópio de Força Atômica Multimode Nanoscope III-a (Digital Instruments, Santa Barbara - CA). Para a caracterização morfológica das mesmas foram obtidas imagens topográficas e de amplitude em modo de contato intermitente, utilizando-se um cantilever de silício cristalino com constante de mola nominal de 40 Nm^{-1} e frequência de ressonância de 242.38 kHz. Áreas de 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ e 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ das amostras foram varridas em condições ambientais, com frequência constante e igual a 0.5 Hz e com resolução de 512x512 pixels. As imagens foram processadas com auxílio do software Nanoscope V5.31r1.

1.3 Determinação da Toxicidade e da Concentração Letal (CL₅₀) do Óleo Essencial de *Plectranthus amboinicus* (Spreng.) Lour (Lamiaceae)

Para determinação da toxicidade do óleo essencial foram utilizadas larvas de *Artemia* sp. nas fases de metanáuplio II e III (Figura 5). Segundo Veiga e Vital (2002), nesse estágio as larvas já iniciaram a atividade de filtração, possibilitando o contato do epitélio do trato digestivo com o meio externo.



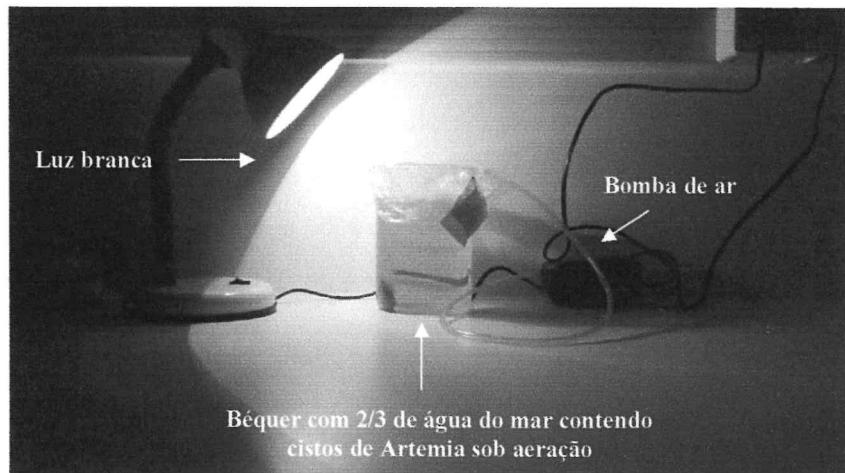
Fonte: MENDES, 2011

Figura 5. Larva de *Artemia* sp. durante a fase de metanáuplio II.

A avaliação da toxicidade para *Artemia* sp. seguiu basicamente o método descrito por Meyer et al. (1982), com modificações efetuadas por Fontenele et al. (1988) e Veiga e Vital (2002), sofrendo algumas adaptações para o presente estudo.

Para o teste de toxicidade foram necessários três dias: o primeiro dia iniciou-se o processo de eclosão dos cistos de *Artemia* sp., após 48 horas a preparação das concentrações do óleo-teste, sendo introduzidas as artemias em cada concentração do óleo e no último dia foi realizada a leitura do óleo testado e anotação dos dados para posterior análise através de um programa estatístico.

No primeiro dia, um total de 0,5g de cistos de *Artemia* sp. foram colocados num vidro de relógio, pesados em uma balança semi-analítica e, em seguida, foram colocados em um béquer com capacidade para 600 mL contendo água filtrada para fazer a lavagem dos cistos durante uma hora. Logo após, retirou os cistos dessa água filtrada, e os transferiu para um béquer contendo água salgada devidamente tratada com salinidade de 28% a 32%, sendo então, submetido à iluminação artificial (luz branca, para a diminuição do calor emitido pela luz) e aeração abundante durante um período de 36 a 48 horas até eclosão dos cistos (Figura 6).



Fonte: MENDES, 2011

Figura 6. Esquema do aquário utilizado para eclosão dos cistos de *Artemia* sp.

O óleo foi preparado com acréscimo do solvente, DMSO 3%, para auxiliar na homogeneização deste com a água salgada natural devidamente tratada, com concentração entre 28% a 32%, formando assim, a solução-mãe. A partir da densidade do óleo foram realizados cálculos para a solução-mãe atingir um volume final de 25 mL e concentração de 1000 µg/mL (óleo/água). A partir da solução-mãe foram feitas várias diluições para determinar as várias concentrações do óleo testado. As concentrações do teste foram 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 µL/mL, utilizando assim, uma faixa de concentração em que muitos organismos sobrevivem até a concentração onde a mortalidade é de 100%.

Uma vez as concentrações preparadas, estas foram transferidas para tubos de ensaio, realizado em triplicata e com quantidades iguais. Em seguida, 10 artemias foram adicionadas em cada tubo de ensaio (réplica) com auxílio de uma pipeta Pasteur. Após a preparação das soluções e a adição das artemias em cada tubo de ensaio, era necessário cobrir os tubos para minimizar a evaporação e não permitir a entrada de insetos, que comprometeriam o resultado do teste, pois os tubos com as concentrações ficavam mantidos em temperatura ambiente ($29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) sob iluminação artificial (luz branca) por um período de 24 horas. Um grupo controle também foi preparado com as mesmas condições dos tratamentos, mas sem a presença da substância teste. Foram realizados três repetições para cada grupo controle. Grupos controles não tratado, tratado apenas com o veículo e tratado com o solvente (DMSO 3%), sendo adicionados ao estudo com a finalidade de comparação.

Após o tempo estipulado, foi realizada a contagem das larvas sobreviventes nos diferentes tratamentos e no grupo controle.

O número de mortes nos diferentes tratamentos foi verificado 24h após o início dos testes. A concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀ - 24 h) com intervalo de confiança de 95% foi determinada para o OE ou seus constituintes de acordo com o método descrito por Litchfield e Wilcoxon (1949).

O teste foi considerado válido nas seguintes condições: percentual de mortalidade do organismo testado superior a 10%; e quando a CL₅₀ - 24h do OE e seus constituintes estiverem na faixa de concentração estabelecida.

1.4 Análise Estatística

Para a determinação da toxicidade e da concentração letal (CL₅₀) do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* foi feita a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, adotando-se um nível de significância estatística de 5%, ou seja, $p \leq 0,05$. Enquanto para o ensaio de detecção de alteração da permeabilidade bacteriana utilizou-se o pós-teste de Dunnett, que compara todos os grupos de tratamento e o controle, com nível de significância de 5%.

2 Resultado Complementar

2.1 Caracterização Química do Óleo Essencial das Folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

O processo de hidrodestilação resultou em OE de aspecto amarelo claro. Os rendimentos obtidos foram de aproximadamente 1,30% para as folhas de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng.

A análise da composição química do OE de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplado a um Espectrômetro de Massa (CG/EM), como pode ser visualizado na Figura 7.

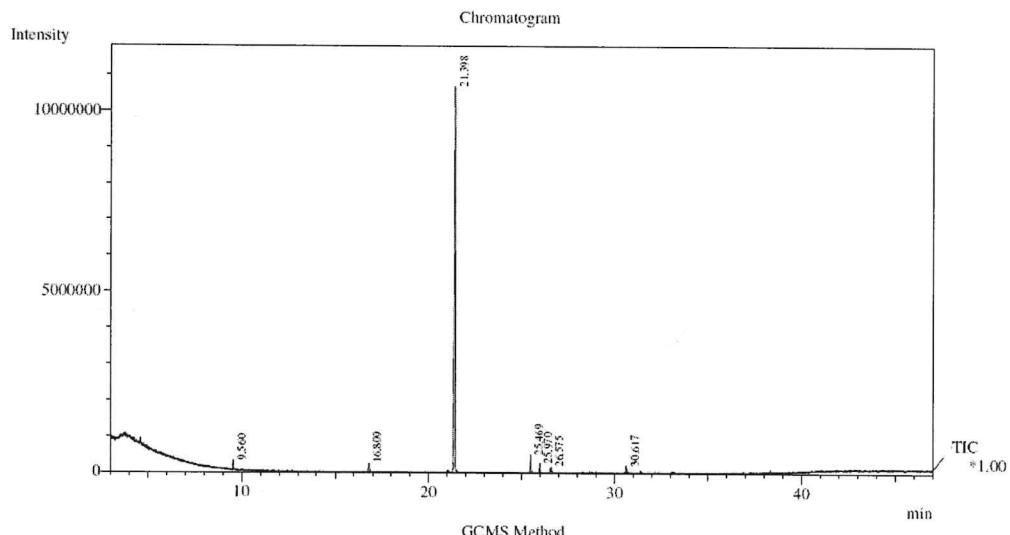


Figura 7. Cromatograma (CG/EM) do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus*.

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massa com os espectros existentes no banco de dados do equipamento (NIST 21 e NIST 107) e na literatura (ADAMS, 2001) e comparação dos índices de retenção. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₁₈) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz. Sendo assim, foi possível a identificação de 98,1% dos constituintes do óleo, o composto majoritário foi o carvacrol com 90,55% (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

IR ^{bc} (tempo/min)	Compostos ^a	(%)	Índice de Kovats
16,80	4-Terpineol	1,34	1177
21,39	Carvacrol	90,55	1298
25,46	β-Cariofileno	3,09	1417
25,97	α-Bergamoteno	1,78	1433
30,97	Óxido de cariofileno	1,36	1583
	Total	98,12	

Legenda: ^a Compostos listados em ordem de eluição na coluna; ^b Identificação: IR, índice de retenção, GC-MS, cromatografia gasosa-espectrometria de massas; ^c Índice de retenção determinado na coluna apolar (250-280°C; 3°C min⁻¹)

A técnica de impacto eletrônico de 70 elétron-volts (eV) forneceu espectros de massa de cada constituinte identificado, como pode ser visualizado nas figuras 8 a 12 (ANEXO III).

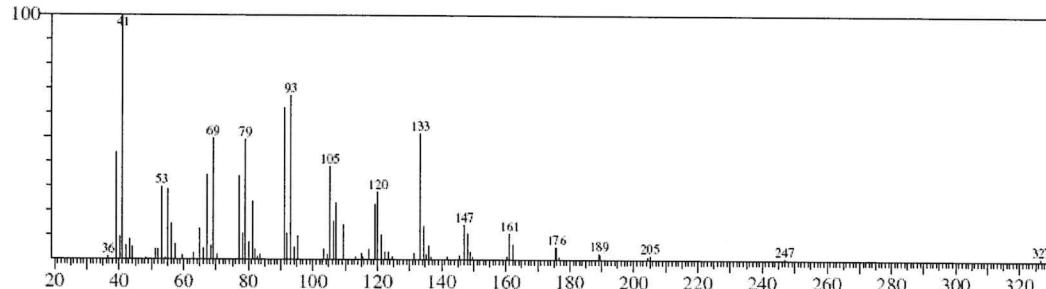


Figura 8. Espectro de massas do 4-terpineol.

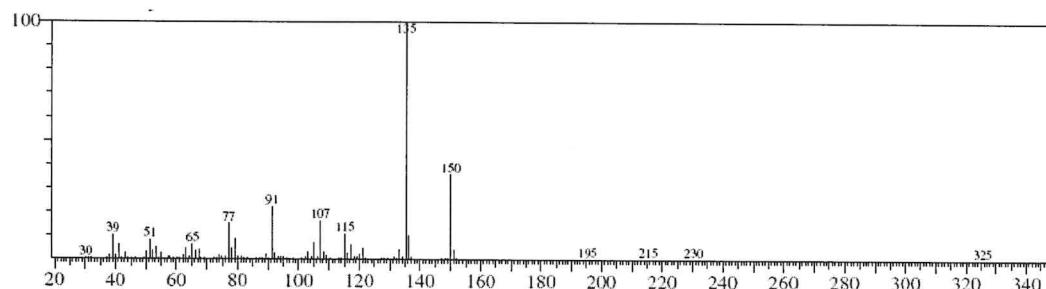


Figura 9. Espectro de massas do Carvacrol.

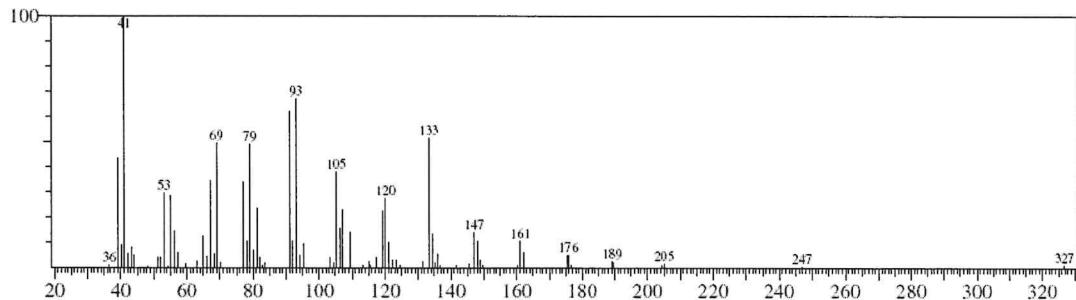


Figura 10. Espectro de massas do β -cariofileno.

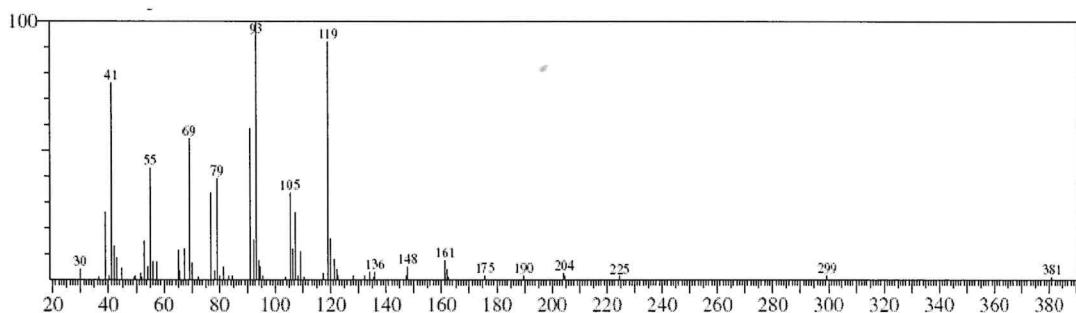


Figura 11. Espectro de massas do α -Bergamoteno.

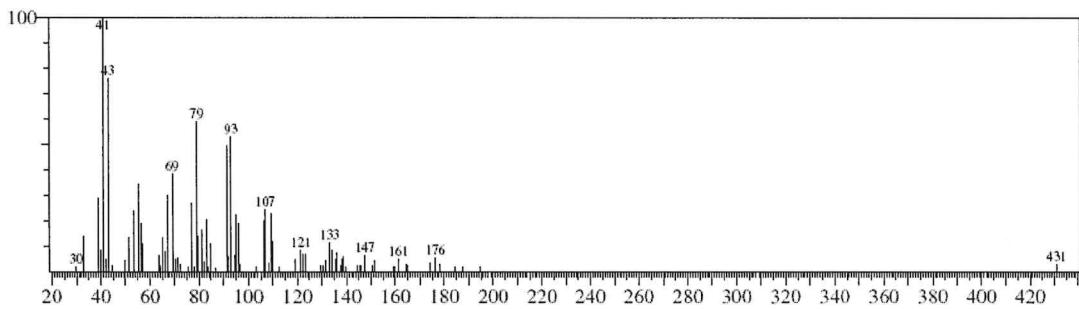


Figura 12. Espectro de massas do Óxido de Cariofileno.

2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do OE de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng foi realizada pelo método Wadsworth (Diluição em Agar) de acordo com o protocolo do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Os seus respectivos valores, bem como os referentes aos controles realizados encontram-se sumarizados na tabela 2.

As amostras padrão apresentaram CIM para o metronidazol e penicilina G dentro dos parâmetros publicados no manual CLSI 2007.

Tabela 2 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol e Carvacrol + Timol sobre as cepas bacterianas testadas.

Microrganismos	Óleo Essencial (µg/mL)	Timol + Carvacrol (µg/mL)	Carvacrol (µg/mL)	Controles				
	CIM	CIM	CIM	Pré-Aerobiose	Pós-Aerobiose	Pré-Anaerobiose	Pós-Anaerobiose	DMSO 3%
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	64	64	64	-	-	+	+	+
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741			128	-	-	+	+	+
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	64	64	64	-	-	+	+	+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	64	64	64	-	-	+	+	+
<i>P. intermedia</i> ATCC 49046	64	64	64	-	-	+	+	+

+ : presença de crescimento do microrganismo

- : ausência de crescimento do microrganismo

2.3 Ensaio de Detecção de Alteração da Permeabilidade Bacteriana

O ensaio com cristal violeta foi utilizado para verificar alteração da permeabilidade da membrana bacteriana das cepas testadas. A porcentagem de absorção para *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, revelou uma taxa de absorção de CV pelas células bacterianas, diante das concentrações utilizadas do OE de 51 e 55%, inferior a apresentada pelo controle positivo, EDTA (0,25M) (Figura 13).

Este ensaio quando realizado com *B. fragilis* ATCC 25285 foi 29% sem a presença do OE, porém aumentou para 42% e 43% após tratamento com as concentrações de 64 e 128 µg/mL (p/v) do OE por 1 hora, respectivamente. O metronidazol não demonstrou nenhum efeito que revelasse alteração na sua permeabilidade, pois este antibiótico não possui ação sobre a parede bacteriana. O EDTA (0,25M), agente quelante, forneceu significativo aumento da absorção de CV pelas células (Figura 14).

Os resultados para *F. nucleatum* ATCC 25586 revelaram que após tratamento com essas mesmas concentrações do OE por 1h, as taxas de absorção de cristal violeta foram 40% e 46%, respectivamente (Figura 15).

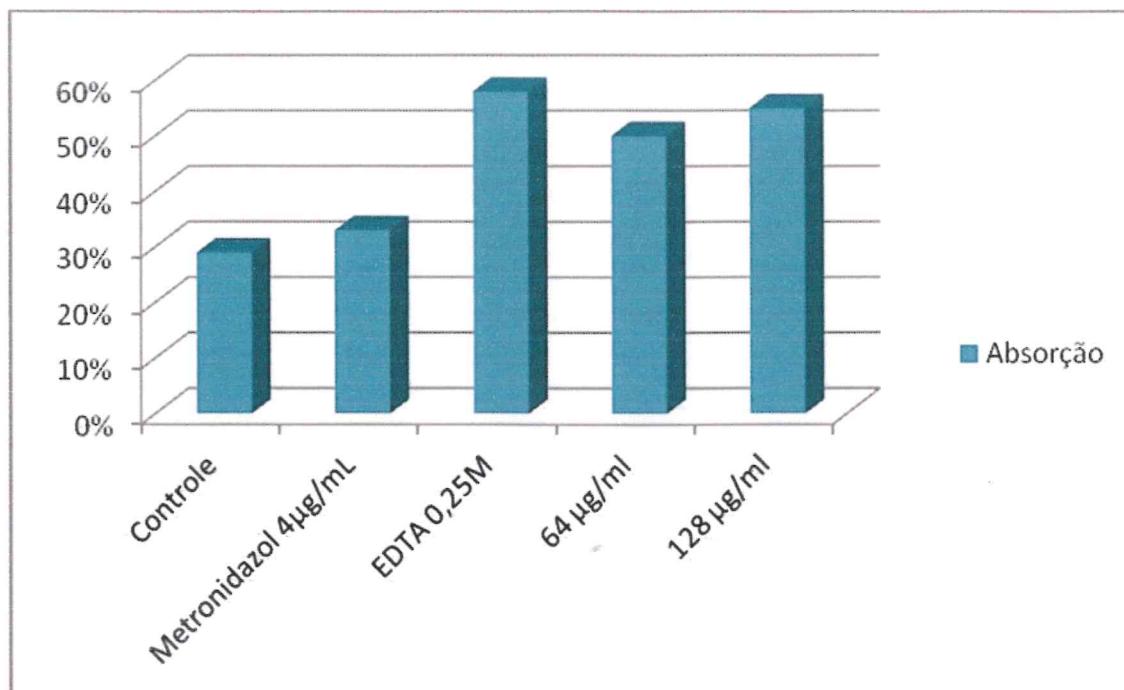


Figura 13. Porcentagem de absorção do cristal violeta por *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 após exposição a concentrações de 128 e 64 µg/mL do OE de *P. amboinicus* por 1 hora.

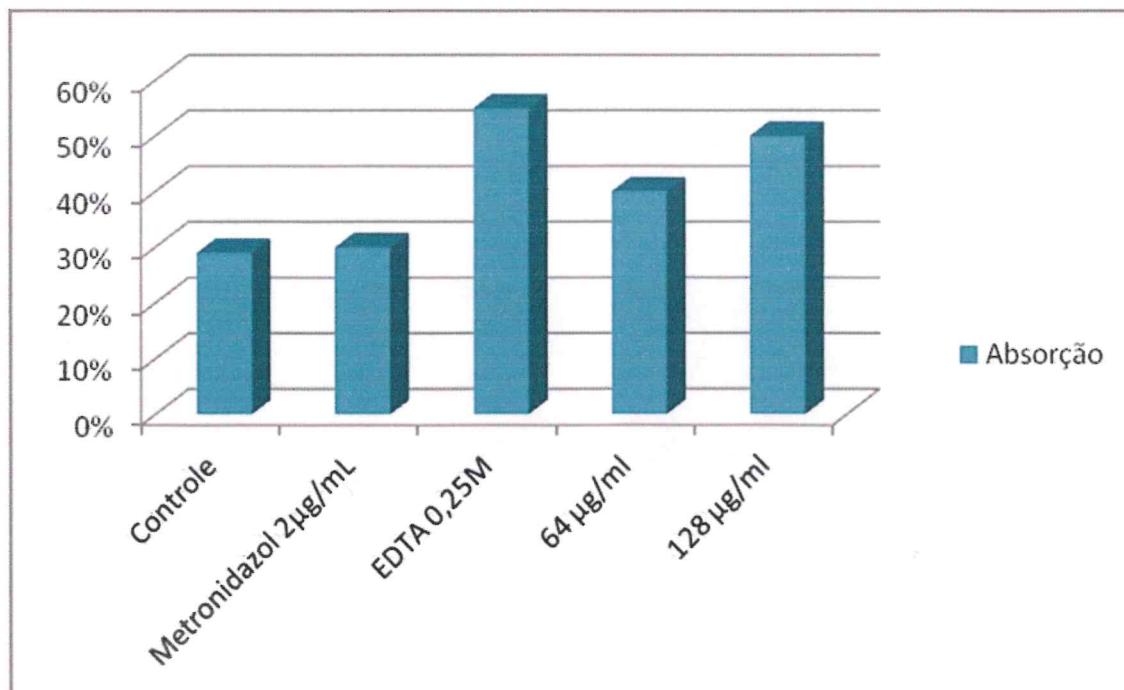


Figura 14. Porcentagem de absorção do cristal violeta por *B. fragilis* ATCC 25285 após exposição a concentrações de 128 e 64 µg/mL do OE de *Plectranthus amboinicus* por 1 hora.

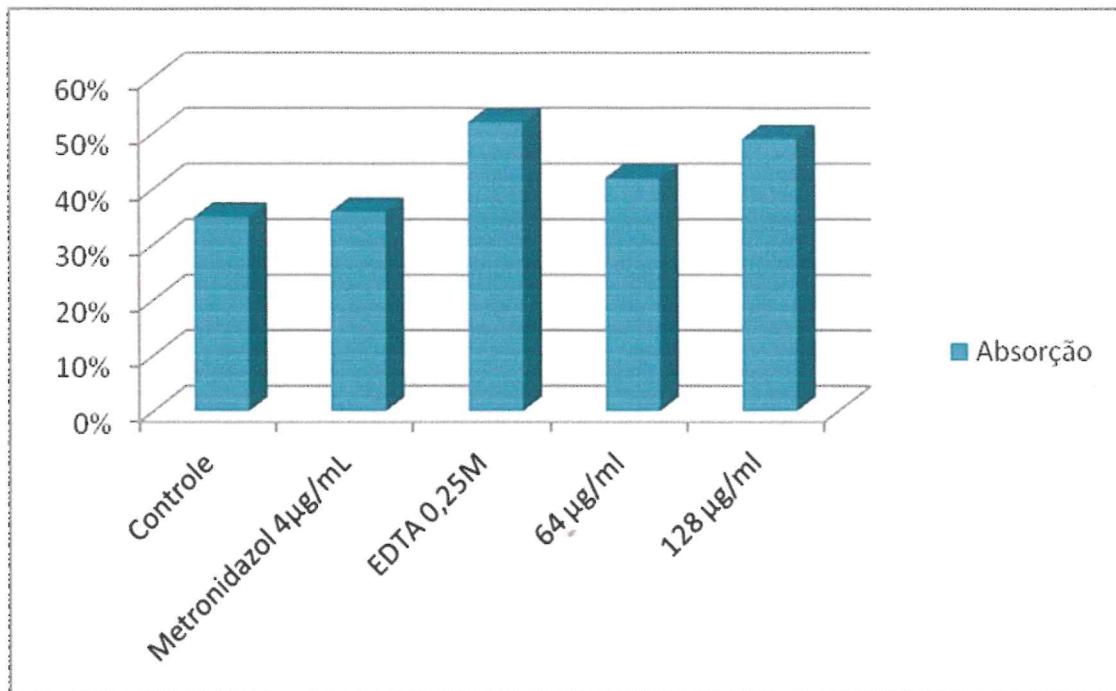


Figura 15. Porcentagem de absorção do cristal violeta por *F. nucleatum* ATCC 25586 após exposição a concentrações de 128 e 64 µg/mL do OE de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng por 1 hora.

2.3 Microscopia de força atômica

A análise por microscopia atômica de *B. fragilis* frente a concentração inibitória (64µg/mL) por 1 hora, revelou células bacterianas modificadas e com conteúdo citoplasmático extravasado (Figura 16).

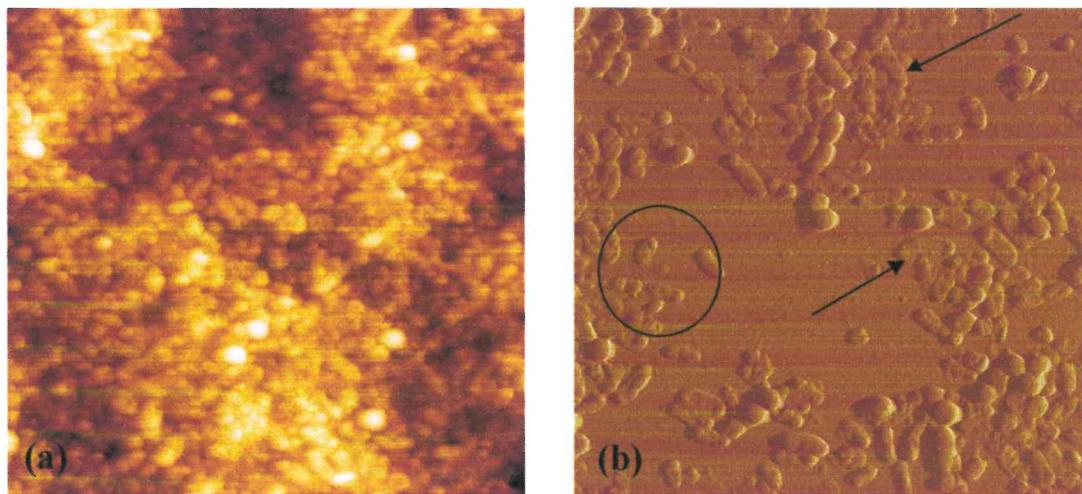
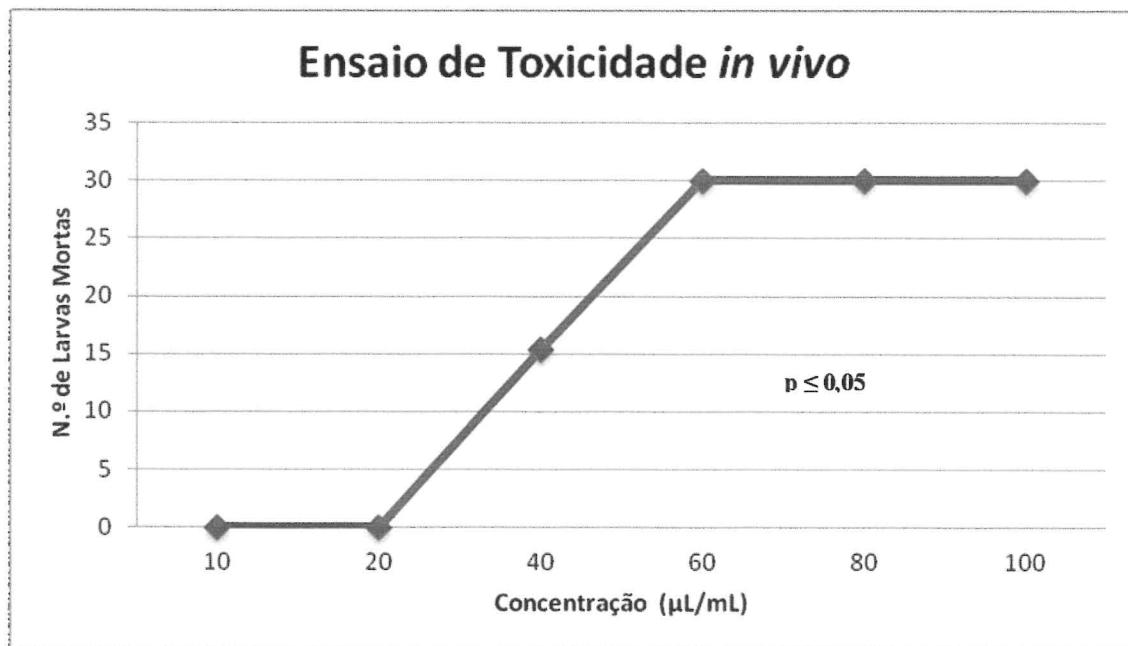


Figura 16. Imagens de Microscopia de Força Atômica de *Bacteroides fragilis* ATCC25285. (a) Cultura anaeróbia controle (b) Cultura anaeróbia após exposição a concentrações inibitórias (64µg/mL) do OE de *P. amboinicus* por 1 hora, mostrando células lisadas.

2.6 Determinação da Toxicidade e da Concentração Letal (CL_{50}) do Óleo Essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

O teste de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia* sp. foi realizado em triplicata e teve como controle negativo o solvente utilizado na dissolução do OE (DMSO 3%).

Após 24h foi determinada a porcentagem de mortalidade para cada concentração e a concentração letal 50% (CL_{50}) foi determinada plotando-se a porcentagem em função do log da dose. O OE foi testado nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo teve 0% de mortos. O OE de *P. amboinicus* apresentou $CL_{50} = 36,55 - 37,91$ com intervalo de confiança de 95% (IC_{95}) (Figura 20). Sendo a CL_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ esta é considerada tóxica (MEYER et al., 1982).



Substância	Nº Testes	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$IC_{95\%}$ ($\mu\text{g/mL}$)
OE. <i>P. amboinicus</i>	3x3	36,55 a 37,91	33,07 a 41,90

Figura 17. Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. mortas em relação ao aumento da concentração do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.), evidenciada pelos pontos no gráfico. A CL_{50} é observada entre 36,55 a 37,91 $\mu\text{g/mL}$ do óleo.

3 Referência Complementar

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, seventh edition. M11A7. Wayne, PA.

FONTENELE, AF; CARVALHO, U; MELO, VMM; BRAGA, LM; AGUIAR, A; MATOS, FJA. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaios com *Artemia salina* Leach. **Ciênc. Cult.**, v. 40, n. 11, p. 1109-1111, 1988.

LITCHFIELD, JT; WILCOXON, FA. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 96, n. 2, p. 99-133, 1949.

MEYER, BN; FERRIGNI, NR; PUTNAM, JE; JACOBSON, LB; NICHOLS, DE; McLAUCHIN, JL. Brine shrimp: a conveniently general bioassay for active plant constituents. **J. Med. Plan. Res.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

VEIGA, LF; VITAL, N. Testes de toxicidade água com o microcrustáceo *Artemia* sp. In NASCIMENTO, IA; SOUSA, ECPM; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia aquática: aplicações no Brasil**. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda. 111-122 p, 2002.

ANEXOS

ANEXO I



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Laboratório de Microrganismos de Referência Semente de bactéria de referência

22-out-10

MICRORGANISMO: *Porphyromonas gingivalis*

INCQS: 00555

ORIGEM: ATCC 33277

LOTE: 1205555

HISTÓRIA: (Bacteroides gingivalis)

ISOLAMENTO:

MEIO DE CULTURA INDICADO: Agar Sangue Suplementado
BHI ou TSB-----14,8g
Extrato de Levedura-----5g
Agar-----20g
Água Destilada-----1000mL
Autoclavar a 121o C por 15 min
Adiconar:
1) Sol. de Hemina (0,5mg/mL)-----1mLp/ 100mL de meio
2) Sol. de Menadiona (Vit. K1 a 1mg/mL)-----0,024mL p/ 100mL de meio
3) Sangue desfibrinado de carneiro-----5mL p/ 100ml de meio

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 37

TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas): 48

RESPIRAÇÃO: Anaerobiose

APLICAÇÃO: Cepa para controle da qualidade do Vitek

SOROLOGIA:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS:

PRODUÇÃO DE TOXINAS:

VALIDADE: Indeterminada se mantida entre -10C e -20 °C.

Ministério da Saúde

FIOTRIZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Coratório de Microrganismos de Referência

Arme de bactéria de referência

22-out-10

OBSERVAÇÕES:

O lote é constituído de sete dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa INCQS.

REFERÊNCIAS:



Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de bactéria de referência

22-out-10

MICRORGANISMO: *Fusobacterium nucleatum*

INCQS: 00555

ORIGEM: ATCC 25586

LOTE: 1205552

HISTÓRIA:

ISOLAMENTO:

MEIO DE CULTURA INDICADO: BHI SUPLEMENTADO COM HEMINA E VITAMINA K

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 37

TEMPO DE INCUBAÇÃO: 48

RESPIRAÇÃO: Anaerobiose

APLICAÇÃO: Cepa para controle da qualidade do Vitek

SOROLOGIA:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS:

PRODUÇÃO DE TOXINAS:

VALIDADE: Indeterminada se mantida entre -10 °C e -20°C

ANEXO II

IDENTIFICAÇÃO DO EMISSOR


**Comercio Importacao e Exportacao
BIO-SCAN Ltda.**

 Endereço: Rua da Silveira DELboux, 96 - Alto da Vila Nova - Cj. 2
13309-330 Itu - SP
Fone (011) 4022-9797

DANFE
 DOCUMENTO AUXILIAR
 DA NOTA FISCAL
 ELETRÔNICA

 0 - ENTRADA
 1 - SAÍDA

1

 Nº 000.007.601
 SÉRIE 1
 FOLHA 1/1

 CHAVE DE ACESSO
 3510 1005 4270 0600 0163 5500 1000 0076 0100 0007 6010

 Consulta de autenticidade no portal nacional da NF-e
www.nfe.fazenda.gov.br/portal
 ou no site da Sefaz Autorizadora

 PROTOCOLO DE AUTORIZAÇÃO DE USO
 135100552676769 25/10/2010 09:08:17

 DA OPERAÇÃO
MERC.ADV.TERC. A NAO CONTRIBUINTE

ESTADUAL

387.163.016.119

INSCRIÇÃO ESTADUAL DO SUBST. TRIBUT.

CNPJ

05.427.006/0001-63

DO / REMETENTE

AO SOCIAL LIO COSTA SIDRIM - CNPQ 620160-2008-0 3570	CNPJ / CPF 210.578.343-00	DATA DA EMISSAO 25/10/2010
RONEL NUNES DE MELO, 1315	BAIRRO / DISTRITO RODOLFO TEOFILO	CEP 60430-270
CEZA	UF CE	FONE / FAX (085) 3366-8303

PLICATA

VENCIMENTO 22/11/2010	VALOR 1.830,00
--------------------------	-------------------

O IMPOSTO

CALCULO DO ICMS 1.830,00	VALOR DO ICMS 329,40	BASE DE CALCULO DO ICMS S.T. 0,00	VALOR DO ICMS SUBSTITUIÇÃO 0,00	VALOR TOTAL DOS PRODUTOS 1.780,00
RETE 0,00	VALOR DO SEGURO 0,00	DESCONTO 0,00	OUTRAS DESP. ACESSORIAS 0,00	VALOR TOTAL DO IPI 0,00

ADOR / VOLUMES TRANSPORTADOS

AO SOCIAL GISTICA LTDA	FRETE POR CONTA 0-EMIT 2-TERC. 1-DESTIN 9-S/RETE	CÓDIGO ANTT 0	PLACA DO VEIC	UF	CNPJ / CPF 04.884.082/0001-35
SSA SENHORA DO O, 1453 LIMAO	MUNICIPIO SAO PAULO			UF SP	INSCRIÇÃO ESTADUAL 149.744.148.111
E ESPECIE CAIXA(S)	MARCA JOSE JULIO SIDRIM	NUMERAÇÃO 1/1	PESO BRUTO 3,000		PESO LÍQUIDO 0,040

PRODUTOS / SERVIÇOS

DESCRIPÇÃO DO PRODUTO / SERVIÇO	NCM/SH	CST	CFOP	UNID	QUANT	VALOR UNIT	VALOR TOTAL	B.CÁLC ICMS	VALOR ICMS	VALOR IPI	ALÍQ. ICMS	ALÍQ. IPI
BACTEROIDES FRAGILIS ATCC 25285 LYFO DISKL Lote:320366-01-05-2011-1.00	38220090	100	6108	FR	1	890,00	890,00	890,00	160,20	0,00	18	0
BACTEROIDES THETAIOTAOMICRON ATCC 29741 LYFO DISK Lote:319711-04-12-2011-1.00	38220090	100	6108	FR	1	890,00	890,00	890,00	160,20	0,00	18	0

IONAIS

 ES COMPLEMENTARES
 ido: 007162

RESERVADO AO FISCO

 DE COMERCIO IMPORTACAO E EXPORTACAO BIO-SCAN LTDA. OS PRODUTOS E/OU SERVIÇOS CONSTANTES DA NOTA FISCAL ELETRÔNICA
 O LADO. EMISSÃO: 25/10/2010 VALOR TOTAL: 1.830,00 DESTINATÁRIO: JOSE JULIO COSTA SIDRIM - CNPQ 620160-2008-0 3570 - RUA CORONEL
 MELO, 1315, RODOLFO TEOFILO, FORTALEZA-CE

 NF-e
 Nº 000.007.601
 SÉRIE 1

CEBIMENTO IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO RECEBEDOR

ANEXO III



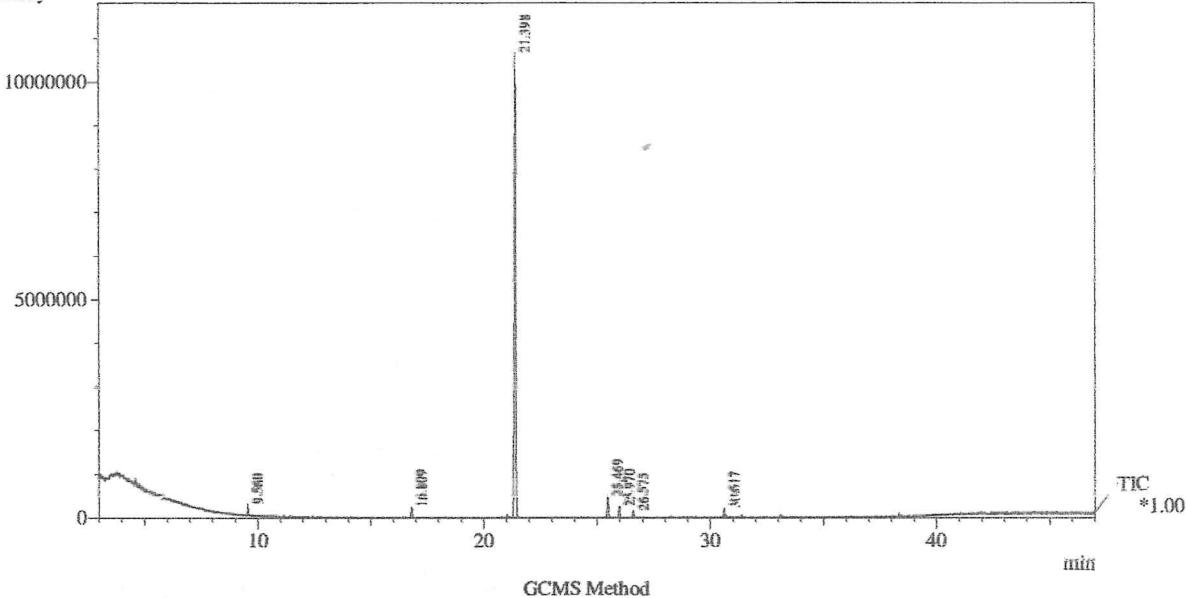
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA
LABORATÓRIO DE CG/EM - PGQO - DQOI - UFC
SISTEMA GC/MS - SHIMADZU QP5050**

GCMS Sample Information

Sample Name : PA1
 Operator : Admin
 Acquisition Date : 1/7/2009 17:07:46
 Method File : C:\GCMSsolution\Sample\MET.OLEOESS.qsm
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune\1\26.05.09.qgt
 Modified : 1/7/2009 17:54:47

Chromatogram

Intensity



Column Information: DB-1 (30 m x 0.25 mm id x 0.25 um film)

Inj. Initial Temp. :250.00 °C Interface Temp. :280.00 °C Control Mode :Split Column Inlet Pressure :48.7 kPa
 Column Flow :1.0 mL/min Linear Velocity :36.0 cm/sec Split Ratio :48 Total Flow :50.0 mL/min Equilibrium Time :1.00 min
 Oven Temp. Program :Rate Temperature(°C) Keep Time(min)
 40.0 0.00
 4.0 180.0 0.00
 20.0 280.0 7.00

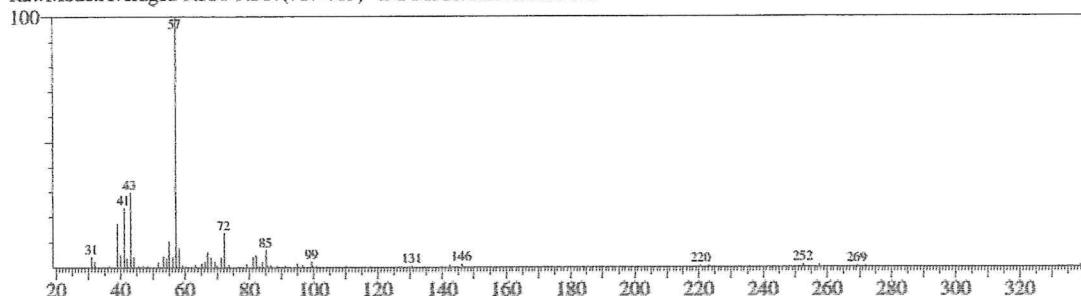
GCMS Peak Report

Peak#	R.Time	I.Time	Area	Height	A/H	Mark	%Total	Name	Base m/z
1	9.560	9.517	564220	255636	2.20		1.19		57.10
2	16.809	16.758	636237	235717	2.69		1.34		71.05
3	21.398	21.267	43003579	10640535	4.04		90.55		135.20
4	25.469	25.408	1465833	473256	3.09		3.09		41.10
5	25.970	25.917	844335	252030	3.35		1.78		93.20
6	26.575	26.542	335151	131882	2.54	MI	0.71		93.10
7	30.617	30.525	644532	186774	3.45	MI	1.36		40.95
			47493886	12175830			100.00		

GCMS Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:9.550(Scan#:788) MassPeaks:57 BasePeak:57.10(76405)
 RawMode:Averaged 9.550-9.567(787-789) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:15361 Library:WILBY229.LIB
 SI:93 Formula:C8 H16 O CAS:3391-86-4 MolWeight:128 RetIndex:0
 CompName:1-OCTEN-3-OL \$\$

Hit#:2 Entry:15266 Library:WILBY229.LIB
 SI:93 Formula:C8 H16 O CAS:53907-72-5 MolWeight:128 RetIndex:0
 CompName:7-Octen-4-ol (CAS) 1-OCTEN-5-OL \$\$

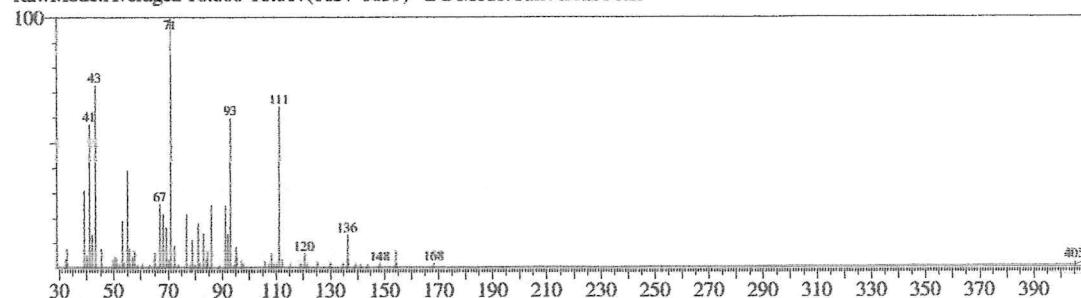
Hit#:3 Entry:15388 Library:WILEY229.LIB
 SI:89 Formula:C8 H16 O CAS:0-0-0 MolWeight:128 RetIndex:0
 CompName:1-OCTEN-3-OL \$\$

Hit#:4 Entry:5491 Library:WILEY229.LIB
 SI:88 Formula:C6 H12 O CAS:4798-45-2 MolWeight:100 RetIndex:0
 CompName:1-Penten-3-ol, 4-methyl (CAS) 4-PENTEN-3-OL, 2-METHYL- \$\$

Hit#:5 Entry:23264 Library:WILEY229.LIB
 SI:87 Formula:C9 H18 O CAS:21964-44-3 MolWeight:142 RetIndex:0
 CompName:1-Nonen-3-ol (CAS) N-HEXYL VINYLALCOHOL \$\$ 1-Vinylheptanol \$\$ Hexylvinylcarbinol \$\$

<< Target >>

Line#:2 R.Time:16.808(Scan#:1658) MassPeaks:74 BasePeak:71.05(24709)
 RawMode:Averaged 16.800-16.817(1657-1659) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:31603 Library:WILEY229.LIB
 SI:88 Formula:C10 H18 O CAS:562-74-3 MolWeight:154 RetIndex:0
 CompName:terpinene-4-ol \$\$

Hit#:2 Entry:31831 Library:WILEY229.LIB
 SI:82 Formula:C10 H18 O CAS:0-0-0 MolWeight:154 RetIndex:0
 CompName:4-TERPINONEOL \$\$

Hit#:3 Entry:31640 Library:WILEY229.LIB
 SI:82 Formula:C10 H18 O CAS:17699-16-0 MolWeight:154 RetIndex:0
 CompName:trans Sabinene hydrate \$\$

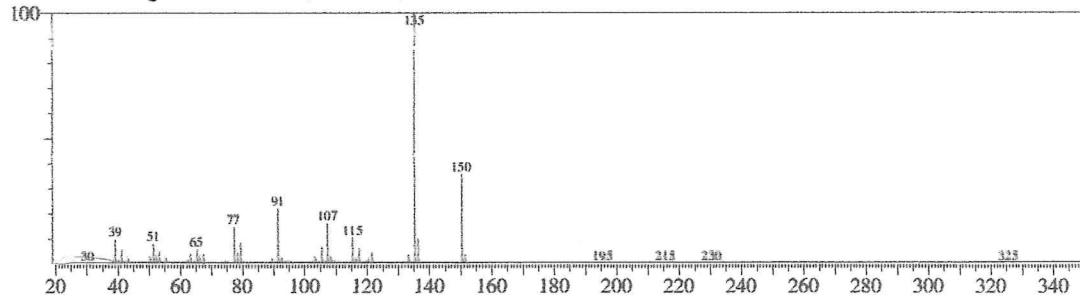
Hit#:4 Entry:31826 Library:WILEY229.LIB
 SI:82 Formula:C10 H18 O CAS:0-0-0 MolWeight:154 RetIndex:0
 CompName:Linalool \$\$

Hit#:5 Entry:31241 Library:WILEY229.LIB
 SI:82 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 CompName:Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 5,7-dimethyl- (CAS) Linalool \$\$.beta.-Linalool \$\$ Linalyl alcohol \$\$ 3,7-Dimethyl-1,6-

<< Target >>

Line#3 R.Time:21.400(Scan#:2209) MassPeaks:118 BasePeak:135.20(2889512)

RawMode:Averaged 21.392-21.408(2208-2210) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:27759 Library:WILEY229.LIB

SI:94 Formula:C10 H14 O CAS:499-75-2 MolWeight:150 RetIndex:0

CompName:Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- (CAS) Carvacrol \$\$ 2-HYDROXY-4-ISOPROPYL-1-METHYLBENZENE \$\$ 1L

Hit#:2 Entry:27745 Library:WILEY229.LIB

SI:92 Formula:C10 H14 O CAS:89-83-8 MolWeight:150 RetIndex:0

CompName:Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)- (CAS) Thymol \$\$ m-Thymol \$\$ p-Cymen-3-ol \$\$ Thyme camphor \$\$ 3-Hydroxy-

Hit#:3 Entry:28145 Library:WILEY229.LIB

SI:90 Formula:C10 H14 O CAS:0-0-0 MolWeight:150 RetIndex:0

CompName:CARVACROL \$\$

Hit#:4 Entry:28142 Library:WILEY229.LIB

SI:89 Formula:C10 H14 O CAS:0-0-0 MolWeight:150 RetIndex:0

CompName:THYMOL \$\$

Hit#:5 Entry:27732 Library:WILEY229.LIB

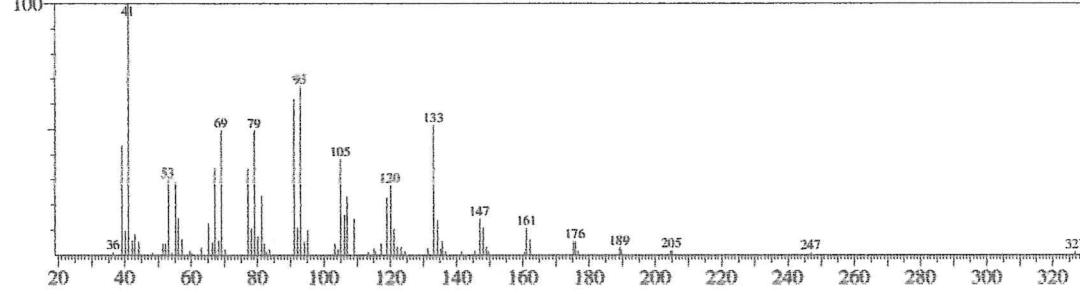
SI:88 Formula:C10 H14 O CAS:88-18-6 MolWeight:150 RetIndex:0

CompName:Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)- (CAS) α -tert-Butylphenol \$\$ 2-T-BUTYL PHENOL \$\$ Phenol, α -tert-Butyl- \$\$ 2-T-B-

<< Target >>

Line#4 R.Time:25.467(Scan#:2697) MassPeaks:77 BasePeak:41.10(42844)

RawMode:Averaged 25.458-25.475(2696-2698) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:71237 Library:WILEY229.LIB

SI:93 Formula:C15 H24 CAS:87-44-5 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:beta-CARYOPHYLLENE \$\$

Hit#:2 Entry:70849 Library:WILEY229.LIB

SI:90 Formula:C15 H24 CAS:118-65-0 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:ISOCARYOPHYLLEN \$\$.gamma.-caryophyllene \$\$ isocaryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimeth-

Hit#:3 Entry:71299 Library:WILEY229.LIB

SI:87 Formula:C15 H24 CAS:0-0-0 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE \$\$

Hit#:4 Entry:71041 Library:WILEY229.LIB

SI:86 Formula:C15 H24 CAS:25246-27-9 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:Alloaromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, | laR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.al-

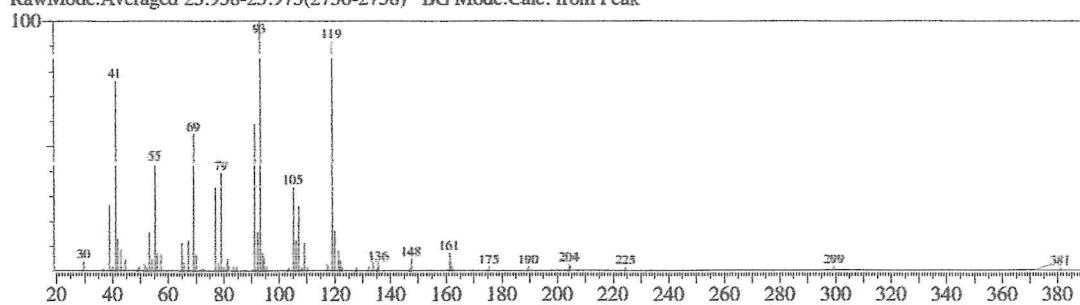
Hit#:5 Entry:70795 Library:WILEY229.LIB

SI:86 Formula:C15 H24 CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:.alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,10-CYCLOUNDECATRIENE

<< Target >>

Line#:5 R.Time:25.967(Scan#:2757) MassPeaks:67 BasePeak:93.20(28782)
 RawMode:Averaged 25.958-25.975(2756-2758) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:71012 Library:WILEY229.LIB

SI:90 Formula:C15 H24 CAS:13474-59-4 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:TRANS-ALPHA-BERGAMOTENE \$\$ Bergamotene \$\$ trans-.alpha.-Bergamotene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-

Hit#:2 Entry:71011 Library:WILEY229.LIB

SI:88 Formula:C15 H24 CAS:17699-5-7 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:alpha-Bergamotene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)- (CAS) 2-Norpinenene, 2,6-dimethyl-

Hit#:3 Entry:70751 Library:WILEY229.LIB

SI:87 Formula:C15 H24 CAS:495-60-3 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:Zingiberene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]- (CAS) 1-Zingiberene \$\$ (-)-Zin-

Hit#:4 Entry:71175 Library:WILEY229.LIB

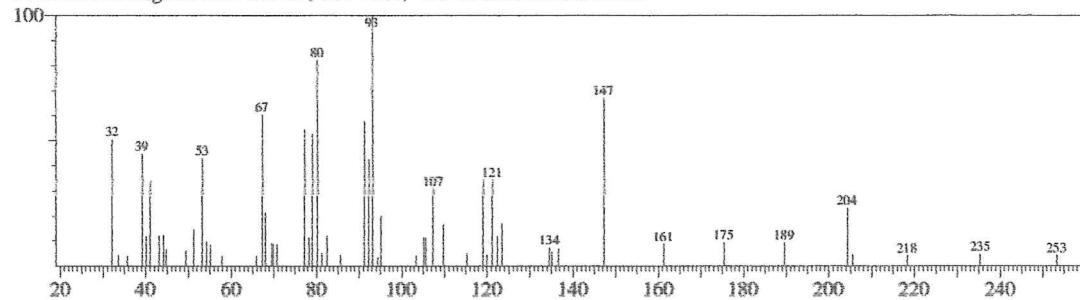
SI:84 Formula:C15 H24 CAS:64727-43-1 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:(Z)-CIS-ALPHA-BERGAMOTENE \$\$

Hit#:5 Entry:70840 Library:WILEY229.LIB

SI:84 Formula:C15 H24 CAS:87-44-5 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[1.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylen-, [1R-(1R*,4E,9E)]- (CAS) 1-Cary-

<< Target >>

Line#:6 R.Time:26.575(Scan#:2830) MassPeaks:57 BasePeak:93.10(8686)
 RawMode:Averaged 26.567-26.583(2829-2831) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:70791 Library:WILEY229.LIB

SI:77 Formula:C15 H24 CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:alpha-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,10-CYCLOUNDECATRIENE

Hit#:2 Entry:71183 Library:WILEY229.LIB

SI:76 Formula:C15 H24 CAS:24703-35-3 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:BICYCLOGERMACRENE \$\$

Hit#:3 Entry:59059 Library:WILEY229.LIB

SI:75 Formula:C14 H22 CAS:0-0-0 MolWeight:190 RetIndex:0
 CompName:SPIRO[2.9]DUODECA-3,7-DIENE, 11,11-DIMETHYL- \$\$

Hit#:4 Entry:71191 Library:WILEY229.LIB

SI:75 Formula:C15 H24 CAS:515-13-9 MolWeight:204 RetIndex:0
 CompName:BEATA ELEMENTE \$\$

Hit#:5 Entry:59058 Library:WILEY229.LIB

SI:75 Formula:C14 H22 CAS:62338-54-9 MolWeight:190 RetIndex:0
 CompName:1,5-Cycloundecadiene, 8,8-dimethyl-9-methylene- (CAS)