



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica

Paulo Eduardo Budri

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de parasitas e micro-organismos.

Vera Lúcia Mores Rall.

**Botucatu – SP
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Syzygium aromaticum* E
Cinnamomum zeylanicum E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NA
PRODUÇÃO DE BIOFILME EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus*,
ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

Paulo Eduardo Budri

Vera Lúcia Mores Rall

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada, área de concentração Biologia de parasitas e
micro-organismos.

**Botucatu – SP
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Budri, Paulo Eduardo.

Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica / Paulo Eduardo Budri. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21201005

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite. 3. *Cinnamomum zeylanicum*. 4. Eugênia (Planta). 5. Essências e óleos essenciais. 6. Agentes anti-infecciosos. 7. Biofilme. 8. *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Bap; Biofilme; Mastite; Óleo essencial; *Staphylococcus aureus*.

Aos meus eternos amores Aglécia e Sofia...

Aos pilares da minha vida Paulo e Vera...

Ao meu irmão, companheiro inseparável, Paulo Henrique...

**Dedico esse trabalho a essas pessoas que me apoiaram e compartilharam comigo
essa importante etapa de minha vida. Obrigado.**

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Vera Lúcia Mores Rall, que cumpriu o perfeito papel de professor, me ensinou não apenas a fazer pesquisa, mas me ensinou a ser uma pessoa melhor e será sempre minha inspiração profissional e pessoal.

À minha princesa Sofia, minha razão de viver e de acordar alegre todos os dias. Sempre ao meu lado com sorriso maravilhoso e único. Querida, você é o principal motivo que me faz querer sempre mais, e por você eu chego ao fim desta etapa com a certeza de que sou o pai mais feliz do mundo. Papai te ama!

À minha amiga, companheira, namorada, esposa, Aglécia pelo apoio de todos os momentos, nada seria de mim sem os seus abraços sempre a me acalmar e a me fazer seguir em frente. Você é uma pessoa muito especial que entrou na minha vida para me completar, muito obrigado por tudo. Eu te amo!

Aos melhores pais do mundo, Paulo e Vera. Vocês me ensinaram tudo que eu precisava para enfrentar esse mundo, sempre me deram total apoio em minhas decisões, nunca me deixaram um minuto sequer sem amor e carinho. Meu pai Paulo, você é minha inspiração, se sou um bom pai hoje o mérito é todo seu, sempre será meu espelho e sempre agradecerei por você ter sido meu eterno “Amigão”. Minha mãe, pessoa de coração mais belo e humilde que já vi, sua presença me alegra e seu carinho é algo fantástico que sempre levarei comigo, sem você não teria ido tão longe. Muito obrigado, sou apaixonado por vocês!

Ao meu irmão Paulo Henrique e minha tia Cecília, pessoas maravilhosas que sempre me apoiaram e me ajudaram a completar essa etapa, obrigado!

Aos professores e funcionários do departamento que possibilitaram todo meu aprendizado. Especialmente ao Prof. Dr. Ary Fernandes e ao Prof. Dr. Júlio Toshimi Doyama que me auxiliaram na execução desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório que proporcionaram um ambiente maravilhoso e divertido de trabalho, muito obrigado pelo auxílio de todas as horas e por causa de vocês descobri o que é ter prazer em acordar cedo e ir trabalhar.

À CAPES/CNPQ pela bolsa de estudo concedida.

Epígrafe

“Estranha é a nossa situação aqui na Terra. Cada um de nós vem para uma curta passagem, sem saber por quê, ainda que algumas vezes tentando adivinhar um propósito. Do ponto de vista da vida cotidiana, porém, de uma coisa sabemos: o homem está aqui pelo bem de outros homens – acima de tudo daqueles de cujos sorrisos e bem-estar nossa própria felicidade depende”

Albert Einstein

Sumário

1. Introdução	8
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. Referência	20
4. CAPÍTULO 1	30
5. Resumo	32
6. Abstract.....	33
7. Introdução.....	34
8. Materiais e métodos	36
8.1. Amostras e isolamento bacteriano.....	36
8.2 PCR para detecção de genes ligados a produção de biofilme	37
8.3. Extração do OESA e OECZ e análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)	39
8.4. Determinação do MIC _{90%} para detecção da dose sub-letal.....	39
8.5. Produção do biofilme pelas cepas de <i>S. aureus</i> na presença e ausência dos OEs e de seus compostos majoritários	40
8.5.1. Análise dos OEs e compostos majoritários na formação de biofilme em poliestireno	40
8.5.2. Análise dos OEs e compostos majoritários na formação de biofilme em aço inox	41
8.6. Análise Estatística.....	42
9. Resultados	43
9.1. Análise genotípica quanto a presença dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i>	43
9.2. Análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM).....	45
9.3. Concentração inibitória mínima dos OEs e dos compostos majoritários..	46
9.4. Análise dos OE's e compostos majoritários na formação de biofilme em microplaca de poliestireno e fichas de aço inox.	47
10. Discussão.....	49
11. Conclusão.....	52
12. Agradecimento	52
13. Referências	53

1. Introdução

Mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária no gado leiteiro, geralmente causado por infecção bacteriana, causando grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e morte dos animais (MELCHIOR et al., 2006). As perdas econômicas podem atingir valores próximos a 2 bilhões de dólares (VASUDEVAN et al., 2003). Existem muitos micro-organismos responsáveis pela mastite bovina, mas *Staphylococcus aureus* é o mais comumente isolado, em casos de mastites clínicas, subclínicas e crônicas (MELCHIOR et al., 2006, CLUTTERBUCK et al., 2007).

Em 2001, Motta et al. encontraram 39,7% de positividade de *S. aureus* em mastite subclínica. Valores semelhantes foram observados por De Freitas e Magalhães (1990), no Rio de Janeiro, com 37,7%. Frequências menores foram observados em Minas Gerais, por Ribeiro (1991), que encontraram 15,6% das amostras positivas e Nader Filho et al. (1988), com 11,9%, em São Paulo.

S. aureus pode apresentar um importante fator de virulência nos quadros de mastite: a capacidade de formação de biofilme. Esse fator é considerado a maior causa de recorrência e dificuldade na erradicação de infecções em glândulas mamárias (MELCHIOR, 2006). O biofilme permite a adesão das células bacterianas em superfícies e tecidos animais, seguindo de multiplicação. O resultado é uma complexa estrutura com multicamadas bacterianas envoltas por uma matriz polissacarídica capsular. (LASA & PENADÉS, 2006).

Essa estrutura permite que a bactéria se proteja da ação de células fagocitárias da resposta imune, da ação de antimicrobianos e da ação de

produtos sanitizantes, pela baixa difusão através da matriz. Essa capacidade de proteção facilita a colonização do epitélio mamário e o estabelecimento de uma infecção persistente. (FOX et al., 2005; HARRAGHY et al., 2006; CLUTTERBUCK et al., 2007).

Falhas nos processos de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potenciais fontes de contaminação. Os micro-organismos podem se aderir a essas superfícies, e iniciar a multiplicação celular (OLIVEIRA et al., 2006). Quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, o biofilme está estabelecido (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

A formação de biofilmes microbianos pode gerar estragos em equipamentos da indústria alimentícia através da biocorrosão, contaminação de produtos, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão (JASS; WALKER, 2000). Além disso, a formação de tal matriz pode atuar como um substrato para outros micro-organismos menos propensos a formação de biofilme, aumentando a probabilidade da sobrevivência destes e sua disseminação (LAPIDOT et al. 2006).

O biofilme começou a ser estudado no século 17 quando Anton van Leeuwenhoek construiu um microscópio, através do qual observou uma placa de biofilme formada em seus dentes, denominando-a de "animalculi", unidades capazes de produzir uma comunidade microbiana. No entanto, somente na década de 1970, foi desenvolvida a ideia de que bactérias sésseis poderiam

existir sob a forma de biofilme, constituindo um dos principais componentes da biomassa bacteriana em muitos ambientes (COSTERTON et al., 1978).

A partir dos anos 80, surgiu a concepção de que bactérias associadas entre si organizavam-se de forma elaborada (LAWRENCE et al., 1991). Desde então, soube-se que micro-organismos podem existir no ambiente como células planctônicas ou em comunidades formando biofilmes. Na forma de tal matriz, as células podem estar ligadas a uma superfície de forma compacta, incluídas nessa rede hidrofóbica predominantemente composta por polissacarídeos (DONLAN, 2002). Caiazza e O'Toole (2004) sugeriram que as bactérias, em resposta às mudanças das condições ambientais, são capazes de alternar entre um estado de vida livre, virulenta e um estado aderido, menos virulento. Outros estudos indicaram que essa mudança de estado de vida livre para o modo de biofilme coincide com mudanças no metabolismo (HAMILTON et al., 2009). Além disso, a formação de biofilme é influenciada pela presença de glicose, ferro, Ca^{2+} , Mn^{2+} , pH, concentrações de oxigênio e carbono (MELCHIOR, 2006).

O tempo de formação do biofilme depende da frequência de limpeza e dos processos de desinfecção. Superfícies de contato com o alimento devem ser higienizadas várias vezes por dia, enquanto as superfícies do ambiente, como paredes, geralmente, são limpas somente uma vez. Gibson et al. (1995) relataram que um biofilme recentemente aderido a uma superfície em uma rede de processamento de alimentos foi proveniente de um biofilme antigo formado anteriormente em superfícies ambientais.

Para que o biofilme se desenvolva, deve ocorrer a interação entre as células bacterianas, a superfície a qual elas vão se aderir e a composição do

meio (STOODLEY et al., 2002). Quanto mais hidrofóbica e áspera a superfície, melhor o desempenho de condicionamento do material e, conseqüentemente, a adesão de bactérias. O aumento da concentração de nutrientes favorece a formação da matriz polissacarídica (SIMÕES et al., 2007).

Biofilmes podem se formar diversos setores da indústria alimentícia, como por exemplo: em tubulações do sistema de água, equipamentos industriais e em instalações de processamento de alimentos. Com isso pode ocorrer contaminação em superfícies de manipulação de alimentos ou áreas onde o alimento é armazenado e transportado (WONG, 1998; DONLAN, 2002).

Pela facilidade de formação dessa matriz, a indústria de alimentos tem usado aço inoxidável em seus equipamentos de processamento. A preferência por esse material para as superfícies de trabalho e pias de cozinha se deve à sua força mecânica, resistência à corrosão e longevidade. Além disso, é relativamente resistente ao ataque químico por oxidação e outros agentes sanitizantes (HOLAH; THORPE, 1990). Os sistemas de tubulação nos aviários normalmente são feitos de PVC e aço inoxidável. Foi relatado que a tubulação de PVC e os bicos dos bebedouros das aves podem abrigar biofilmes (TRACHOO et al., 2002). Em açougues, revestindo reservatórios e nas residências, constituindo superfícies de corte e potes, o vidro é amplamente utilizado.

Atualmente para ser considerado biofilme, a população bacteriana deve estar entre 10^6 e 10^7 UFC/cm², pois valores inferiores a estes poderiam ser indícios apenas de adesão (MARQUES et al. 2005). É importante ressaltar que essa concentração bacteriana é tratada de forma global e cada espécie em cada ambiente apresenta uma medição específica, pois se sabe que, em

determinados momentos, os biofilmes sofrem dispersão, liberando micro-organismos que podem colonizar novos ambientes, diminuindo momentaneamente essa população. Esse evento é ativo e regulado fisiologicamente. (STOODLEY et al., 2002).

Em *S. aureus*, a produção do polissacarídeo é mediada pelo *locus ica* (intercelular adhesion), constituídos pelos genes *icaA icaD icaB icaC*, (McKENNEY, et al., 1998) e os genes que parecem ter maior relevância são o *icaA* e *icaD*. A co-expressão desses dois genes resulta em um aumento significativo na atividade e na expressão fenotípica dos polissacarídeos capsulares (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaA* é responsável pela produção da enzima N-acetilglicosaminiltransferase, envolvida na síntese de N-acetilglicosamina (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaD* influi na expressão dessa enzima, responsável pela expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998).

Outro gene importante envolvido na produção de biofilme em *S.aureus* é o *bap* (biofilm associated protein). Localizado em uma ilha de patogenicidade móvel, sintetiza a proteína de superfície Bap, que apresenta 2.276 aminoácidos e promove a ligação primária a superfícies abióticas e a adesão intercelular, ao contrário da adesina intercelular polissacarídica (PIA), que parece estar envolvida somente na adesão intercelular (UBEDA et al., 2003; CUCARELLA et al., 2004; LASA; PENADÉS, 2006). Segundo Cucarella et al. (2004), cepas de *S. aureus* *bap* positivas, com inativação ou ausência do operon *ica* continuaram a apresentar síntese de biofilme *in vitro* sem alterações, sugerindo que somente o gene *bap* pode suprir a deficiência da produção de PIA. Tormo et al. (2005) observaram que cepas de *Staphylococcus* que apresentaram o gene

bap eram fortemente produtoras de biofilme mesmo não apresentando os genes *icaABCD*.

Cucarella et al. (2001) observaram que cepas de *S. aureus bap* positiva não foram isoladas de humanos, somente de casos de mastite clínica e subclínica. Entretanto esse gene não está restrito à espécie *S. aureus*, pois genes ortólogos foram encontrados em ECNs como *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hycus* (TORMO et al., 2005). É interessante notar que, inicialmente, a presença de Bap reduz a infectividade, bloqueando a adesão dos compoimentos do sistema MSCRAMM (Microbial Surface Componentes Recognising Adhesive Mathrix Molecules) às células do hospedeiro. Em contraste, essa proteína exerce um efeito oposto nos passos posteriores da adesão, permitindo uma maior persistência da adesão, provavelmente, pela produção do biofilme (CUCARELLA et al., 2001; UBEDA et al., 2003).

O *quorum-sensing* é um sistema de comunicação entre células bacterianas, que afeta a expressão de vários fatores de virulência. Um dos elementos genético envolvido nesse tipo de comunicação é o sistema *agr* (acesory gene regulator). Esse *locus* genético parece estar envolvido também com a regulação do biofilme e consiste de 4 genes (*agrA*, *agrC* *agrD* *agrB*). Esse *locus* é ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a fase estacionária (JEFFERSON et al., 2004). Quando ativado, esse sistema parece inibir a formação de biofilme, nas células de *S. aureus* (VOUNG et al., 2000; UBEDA et al., 2003).

Outro sistema genético que interfere na produção de biofilme em *S. aures* é o sistema *sar* (staphylococcal acessory regulator). Composto por um único

gene (*sarA*), transcrito pelos promotores P1, P2 e P3, resultando nos mRNAs *sarA*, *sarB* e *sarC*. A proteína SarA age inibindo ou aumentando a transcrição de vários genes. Beenken et. al. (2003) observaram que cepas de *S. aureus* com mutação no *locus sarA* apresentaram menor capacidade em formar biofilme, ao contrário do que acontece com o *locus agr*, cuja perda parece aumentar a capacidade de formação de biofilmes (VUONG et al. 2000).

A descrição da produção de biofilmes por cepas de *S. aureus* causadores de mastites clínicas ou subclínicas é bem variável. Em 1993, Baselga et al. encontraram uma baixa porcentagem de cepas produtoras, de 12%. Entretanto trabalhos posteriores como de Arciola et al (2001) relataram positividade maiores, de 60,8%, semelhante à encontrada por Vasudevan et al. (2003), de 68,5%. Fox et al. (2005) encontraram 41%, enquanto Oliveira et al (2006) e Vautor et al. (2007) observaram 37,5% e 39%, respectivamente.

A formação do biofilme pode ser verificada por diferentes métodos. A técnica de microplaca é quantitativa, por leitura em espectrofotômetro (VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Existem alguns métodos qualitativos, como a utilização de ágar vermelho Congo (CHRISTENSEN et al., 1982; BASELGA et al., 1993), para identificar estafilococos produtores e baseia-se no cultivo de estafilococos sobre o ágar sólido, suplementado com o corante vermelho Congo. Outra metodologia qualitativa é a verificação da produção de biofilme em tubo de borossilicato, corado com azul de tripan (CHRISTENSEN et al., 1982). Ainda, pode-se avaliar a habilidade dos micro-organismos em produzir biofilme sobre superfície abiótica, por meio do microscópio eletrônico de varredura (PIZZOLITTO, 1997). Embora cada

método apresente vantagens e desvantagens, o da microplaca foi descrito como sendo de alta especificidade e sensibilidade (MATHUR et al., 2006).

Tendo em vista a complexidade estrutural do biofilme, sua capacidade de dispersão e a grande ocorrência de *S. aureus* produtor de biofilme em casos de mastite, tem-se aumentado o investimento em programas de desinfecção em equipamentos na indústria de laticínios (GIBSON et al, 1999). Uma nova alternativa para o uso de desinfetantes e compostos antimicrobianos sintéticos tem sido a busca por compostos naturais ativos contra bactérias e formação de biofilmes (OLIVEIRA et al, 2010).

Os óleos essenciais (OE) de compostos aromáticos podem vir a ser uma excelente alternativa, pois já foi demonstrada sua eficiência contra bactérias (ALEXOPOULOS et al., 2011), parasitas (PANDEY et al., 2000; PESSOA et al. 2002), fungos (MARI et al., 2003), vírus (BISHOP, 1995) e até mesmo contra insetos (KARPOUHTSIS et al., 1998).

Dessa forma, OEs de condimentos aromáticos e de plantas medicinais estão sendo testados quanto a sua atividade sobre biofilme. Nostro et al . (2007) relataram uma inibição parcial da formação de biofilme em cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* na presença de concentrações subletais (0.125–0.500%) de óleo essencial de orégano, carvacrol e tomilho. Resultados similares foram relatados para as estirpes de *Salmonella typhimurium* na presença de concentrações subletais (0.006- 0.012%) de óleo de tomilho, orégano e carvacrol por Soni et al. (2013). Szczepanski et al (2014) demonstrou a ação inibitória total (100%) da formação de biofilme utilizando óleo de orégano na concentração de 0,002% em bactérias como *Sphingomonas* spp, *Acinetobacter* spp e *Stenotrophomonas* spp.

Burt et al . (2007) demonstraram a inibição da produção de flagelos em *E. coli* O157 : H7 em concentrações subletais de carvacrol. Para *E. coli* a formação dos flagelos é essencial para a formação de biofilme (Pratt & Kolter, 1998). O efeito de óleo essencial de capim-limão se mostrou ativo para *Listeria monocytogenes*, em 60 minutos de tratamento houve remoção de 88,13% do biofilme formado em 3 horas, e a mistura de óleos essenciais de capim-limão com citronela foram responsáveis pela remoção de 100% do biofilme formado a 240 horas (OLIVEIRA et. al. 2010). O estudo de Valeriano et. al., (2012) também demonstrou eficácia dos óleos essenciais de hortelã e capim-limão, para remoção do biofilme previamente formado, com apenas 20 minutos de tratamento foi suficiente para a remoção total do biofilme de *S. enterica* Enteritidis em fichas de aço inoxidável.

Até mesmo contra biofilme fúngicos os óleos essenciais apresentaram bom desempenho, Braga et. al. (2008) observaram a redução de até 90% da atividade metabólica das células sésseis de *Candida albicans* em contato com óleo essencial de tomilho, interferindo assim nas fases iniciais de formação do biofilme.

A ação de OEs em biofilme pode atingir diferentes mecanismos celulares, como por exemplo, inibindo a síntese de peptidoglicano (OGUNLANA et al., 1987), modificando a hidrofobicidade da membrana bacteriana, causando partição nos lípidos da membrana da célula bacteriana, perturbando as estruturas celulares (COX et al., 2000, ULTEE et al , 2002) e modulando o *quorum sensing*, que é a modelagem da expressão gênica em resposta a variabilidade de condições ambientais (GAO et al., 2003).

A maior utilização de OE na União Europeia (UE) é em alimentos (como aromatizantes), perfumes (fragrâncias) e produtos farmacêuticos (por suas propriedades funcionais) (Van de Braak e Leijten, 1999). Entretanto, as propriedades antibacterianas já são explorados comercialmente como cimentos endodônticos dentárias (MANABE et al, 1987) , anti-sépticos (COX et al., 2000) e suplementos alimentares para animais (ILSLEY et al. , 2002).

A composição dos OE, a partir de uma determinada espécie de planta, pode ser diferente entre as estações de colheita e entre as fontes geográficas (FALEIRO et al., 2002). A grande maioria dos óleos apresenta um composto majoritário.

O Eugenol é o principal componente do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) e tem demonstrado propriedades analgésicas, anti-inflamatória e anti-bacteriana. É um composto natural considerado seguro pela FDA (Food and Drug administration) (HEMAISWARYA & DOBLE 2009). Doses sub-letais de Eugenol inibiram a produção de amilase e proteases em *Bacillus cereus*, deterioração da parede celular e um elevado grau de lise celular também foram observados (THOROSKI et al., 1989). Em *Enterobacter aerogenes* o grupo hidroxila do eugenol se liga a proteínas, impedindo a ação de enzimas (WENDAKOON & SAKAGUCHI, 1995). Em relação ao biofilme, He et al. 2007 demonstrou o efeito inibitório do eugenol, em diferentes concentrações (0, 20, 200 e 2,000 mg/L) na adesão celular e formação de biofilme, comprovando que a formação de biofilme, nesse caso, foi dependente da concentração do eugenol. Packiavathy et. al. (2012) demonstraram que o eugenol inibiu a formação de biofilme em *Chromobacterium violaceum* em 80% quando aplicado uma concentração de 10 µl/ml. Zhou et al. 2013

demonstraram também a capacidade inibitória do eugenol nos sistemas *laq* e *pqs* do *quorum sense* de *Escherichia coli*, assim como a inibição de fatores de virulência como: violaceína (antimicrobiano natural), elastase (protease), piocianina (molécula oxidativa funcional na competição bacteriana), e principalmente a formação de biofilme.

O cinamaldeído, composto majoritário do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), é um aldeído α - β -insaturado, não atua na membrana externa, mas se liga à proteínas, impedindo a ação de descarboxilases em aminoácidos (WENDAKOON e SAKAGUCHI, 1995). Sua ação antibiofilme foi estudada por Amalaradjou et. al. (2010) em *E. coli* e os resultados demonstraram grande prevenção quanto a produção de biofilme por esse micro-organismo em cateteres e placas utilizadas em procedimentos médicos. Foi sugerida pelos autores a utilização desse composto para proteção de equipamentos contra biofilme de *E. coli*.

Tendo em vista toda a complexidade da produção de biofilme por *S. aureus* e todo o potencial anti-biofilme dos óleos essenciais e seus compostos majoritários o presente estudo objetivou a avaliação do efeito dos O.E. de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus respectivos compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de produção de biofilme por cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, na presença e na ausência de óleos essenciais e seus compostos majoritários.

2.2. Objetivos Específicos

Pesquisa da presença dos genes produtores de biofilme nas cepas de *Staphylococcus aureus*.

Determinar a composição química dos óleos essenciais, por cromatografia gasosa-espectrometria de massa.

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e de seus compostos majoritários, eugenol e cinamaldeído.

3. Referência

ALEXOPOULOS, A.; KIMBARIS, A. C.; PLESSAS, S.; MANTZOURANI, I.; THEODORIDOU, I.; STAVROPOULOU, E.; POLISSIOU, M.G.; BEZIRTZOGLU, E. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Anaerobe**, p.1-4, 2011.

AMALARADJOU M. A.; NARAYANAN A.; BASKARAN S. A.; VENKITANARAYANAN K. Antibiofilm effect of trans-cinnamaldehyde on uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal Urol.**, v.184(1), p.358-63, 2010.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.

BASELGA, R., ALBIZU, I., DE LA CRUZ, M., DEL CACHO, E., BARBERAN, M., AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4857-.4862, 1993.

BEENKEN, K.E.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4206- 4211, 2003.

BISHOP, C.D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 641 – 644, 1995.

BRAGA P. C.; CULICI M.; ALFIERI M.; DAL SASSO M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilmformation and mature biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, p.472–477, 2008.

BURT, S. A.; VAN DER ZEE, R.; KOETS, A. P.; DE GRAAFF, A. M.; VAN KNAPEN, F.; GAASTRA, W. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73(14), p.4484-4490, 2007.

CAIAZZA, N.C.; O'TOOLE, G.A. SadB Is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.4476-4485, 2004.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p.1–17, 2007.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.435–64, 1978.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.170–175, 2000.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L.; BEACHEY, E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, p. 318- 26, 1982.

CUCARELLA, C.; COLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, P. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

CUCARRELA, C.; TORMO, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, JR. Role of film-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2177-2185, 2004.

DE FREITAS, M.A.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 315-319, 1990.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p.881- 890, 2002.

FALEIRO, M.L.; MIGUEL, M.G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J.C.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.35– 40, 2002.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.295–299, 2005.

GAO, M.; TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J. B.; BAUER, W. D. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.16, p. 827–834, 2003.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the *N-acetylglucosaminyltransferase* activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 273, p. 18586-93, 1998.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Biofilms and their detection in the food industry. Chipping Campden, UK: **Campden and Chorleywood Food Research Association**, 1995.

GIBSON, H.; TAYLOR, J. H.; HALL, K. E.; HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.41–49, 1999.

HAMILTON, S.; BONGAERTS, R.J.; MULHOLLAND, F.; COCHRANE, B.; PORTER, J.; LUCCHINI, S.; LAPPIN-SCOTT, H.M. ; HINTON, J.C. The

transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. **Biomed Central Genomics**, v. 10, p. 599, 2009.

HARRAGHY, N.; SEILER, S.; JACOBS, K.; HANNIG, M.; MENDER, M.D.; HERRMANN, M. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **International Journal of Artificial Organ**, v. 29, p.368–378, 2006.

HEMAISWARYA S.; DOBLE M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v.16, p.997–1005, 2009.

HOLAH, J.T.; THORPE, R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, p. 599- 608, 1990.

ILSLEY, S., MILLER, H., GREATHEAD, H., KAMEL, C. Herbal sow diets boost pre-weaning growth. **Pig Progress**, v.18(4), p.8 –10, 2002.

JASS, J., WALKER, J.T. Biofilms and biofouling. In: **Industrial biofouling - detection, prevention and control**. WALKER, J.T.; SURMAN, S.; JASS, J. New York, John Wiley & Sons, 2000.

JEFFERSON, K.K.; PIER, D.B.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesion locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2449- 2456, 2004.

KARPOUHTSIS, I.; PARDALI, E.; FEGGOU, E.; KOKKINI, S.; SCOURAS, Z.G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1111 – 1115, 1998.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 229- 233, 2006.

LASA, I.; PENADE, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99–107, 2006.

LAWRENCE, J.R.; KORBER, D.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W.; CALDWELL, D.E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.20, p. 6558-6567, 1991.

MANABE A.; NAKAYAMA S.; SAKAMOTO K.. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. **Jpn J Pharmacol**, v.44(1), p.77-84, 1987.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 761 – 766, 2003.

MARQUES, C. S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2005.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.J.; FATMA, T.; RATTAN, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci* an evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, p. 25- 29, 2006.

McKENNEY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesion. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4711-4720, 1998.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary and Medical Bacteriology**, v. 53, p.326–332, 2006.

MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M.; SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 27-31, 2001.

NADER FILHO, A.; ROSSI JR. O.D.; ITURRINO, R.P.S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. **Reviews of Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 369-373, 1988.

NOSTRO, A.; ROCCARO S.; BISIGNANO A.; MARINO G.; CANNATELLI A., M. A.; PIZZIMENTI, F. C. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 519-523, 2007.

OGUNLANA, E. O.; HOEGLUND S.; ONAWUNMI G.; SKOELD O. Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. **Microbios.**, v.50, p.43–59, 1987.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, pp 187–191, 2007.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E., HILSDORF, R. P. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control** , v.21, p.549–55, 2010.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates **Veterinary Microbiology**, v. 118, pp 133–140, 2006.

PANDEY, R.; KALRA, A.; TANDON, S.; MEHROTRA, N.; SINGH, H.N.; KUMAR, S. Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 501 – 502, 2000.

PACKIAVATHY I. A. S. V.; AGILANDESWARI P.; MUSTHAFA K. S.; PANDIAN S. K., RAVI A. V. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. **Food Research International**, v.45, p.85–92, 2012.

PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 59 – 63. 2002.

PIZZOLITTO, E.L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia: modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997. Tese (Doutorado) – UNESP/ Araraquara, 1997.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v.30(2), p.285-293, 1998.

RIBEIRO, M.T. **Caracterização de *Staphylococcus* isolados de quartos mamários de bovinos inicialmente reagentes a prova do “Califórnia Mastitis Test”**. 1991, 62p. Tese (Mestrado) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1991.

SIMÕES, M.; SILLANKORVA, S.; PEREIRA, M.O.; AZEREDO, J.; VIEIRA, M.J. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **Biofouling**, v. 24, p. 249- 258, 2007.

SONI, K. A.; OLADUNJOYE, A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; SILVA, J. L.; MIKEL, B. Inhibition and inactivation of *Salmonella typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 76(2), p. 205-212, 2013.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

Szczepanski S.; Lipski A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v.36, p.224-229, 2014.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C.; Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.52 (6), p. 399– 403, 1989.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GOTZ, F.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v. 151, p. 2465-2475, 2005.

TRACHOO, N.; FRANK, J.F.; STERN, N.J. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1110-1116, 2002.

UBEDA, C.; TORMO, M. A.; CUCARELLA, C.; TROTONDA, P.; FOSTER, T. J.; LASA, I.; PENADES, J. R. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 193–210, 2003.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68 (4), p.1561–1568. 2002

VALERIANO C. T.; OLIVEIRA L. C.; CARVALHO S. M.; CARDOSO M. G.; ALVES E.; PICCOLI R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella* entérica serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v.25, p.673-677, 2012.

VAN DE BRAAK, S.A.A.J.; LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. **CBI**, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116, 1999.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G; PEPIN, M; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v 72, p. 197–199, 2007.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p.179–185, 2003.

VUONG, C.; SAENZ, H.L.; GOTZ, F.; OTTO, M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **J. Inf. Disease**, v.182, p.1688–1693, 2000.

ZHOU L.; ZHENG H.; TANG Y.; YU W.; GONG Q. Eugenol inhibits quórum sensing at sub-inhibitory concentrations. **Biotechnol Lett.**, v.35(4), p.631-7, 2013.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.

WENDAKOON, C.N.; SAKAGUCHI, M.; Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v.58 (3), p.280– 283, 1995.

WONG, A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2765- 2770, 1998.

4. CAPÍTULO 1

Esse trabalho deu origem ao artigo “Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica.”

Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica

**Budri, P. E.¹; Silva, N. C. C.³; Bonsaglia, E. C. R.¹; Fernandes Júnior, A.¹;
Doyama, J. T.²; Rall, V. L. M.¹;**

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual.
2. Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual.
3. Departamento de Microbiologia. Universidade de São Paulo, USP – ESALQ.

Autor para correspondência:

Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP-
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.
Caixa-Postal 510

CEP 18618-970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil.

Telefone: (14)38116240 ramal 215, e-mail: vlmores@ibb.unesp.br

5. Resumo

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária das vacas, causando perdas econômicas na bovino-cultura leiteira e *Staphylococcus aureus* é um dos micro-organismos mais comumente isolado nesse tipo de doença. A produção de biofilmes por *S. aureus* constitui um importante fator de virulência e contaminação desse micro-organismo, envolvendo a adesão da bactéria em superfícies sólidas. Neste trabalho foram testados os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (OESA) e *Cinnamomum zeylanicum* (OECZ) e seus compostos majoritários, eugenol e cinamaldeído, quanto à atividade sobre a formação de biofilmes em cepas de *S. aureus*, em diferentes superfícies. Os resultados demonstraram inibição significativa ($p < 0,05$) da produção de biofilme pelo OESA em superfície de poliestireno e aço inox (69,4% e 63,6%, respectivamente). Entretanto, seu composto majoritário, o eugenol, não apresentou a mesma eficácia, reduzindo a formação em apenas 52,8% em poliestireno e 19,6% em aço inox ($p > 0,05$). Por outro lado, o OECZ e seu composto majoritário, cinamaldeído, reduziram significativamente a capacidade de produção de biofilme, tanto em superfícies de poliestireno (74,7% e 69,6%, respectivamente) quanto em superfície de aço inox (45,3% e 44,9%, respectivamente). Pela significativa redução da produção de biofilme por OESA, OECZ e cinamaldeído, em baixa concentração, estas substâncias podem ser consideradas, como princípio ativo, na produção de sanitizantes na indústria de alimentos.

Palavras chaves: Mastite, biofilme, *Staphylococcus aureus*, *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum*.

6. Abstract

Bovine Mastitis is an inflammation of the mammary gland of cows causing economic losses in dairy cattle and *Staphylococcus aureus* is one of the microorganisms most commonly isolated in this kind of disease. The production of biofilms by *S. aureus* is an important virulence factor and spread of this microorganism, involving the adhesion of bacteria on solid surfaces. In this work we tested the essential oils of *Syzygium aromaticum* (OESA) and *Cinnamomum zeylanicum* (OECZ) and their major compounds, eugenol and cinnamaldehyde, as the activity on biofilm formation in strains of *S. aureus* on different surfaces. The results showed a significant inhibition ($p < 0.05$) for the biofilm production on the by OESA on polystyrene and stainless steel surface (69.4% and 63.6 %, respectively). However, its major compound, eugenol, did not show the same effectiveness, reducing in only 52.8 % and 19.6 % in polystyrene stainless steel ($p > 0.05$). On the other hand, OECZ and its major compound, cinnamaldehyde, reduced significantly the capacity of biofilm production, both in polystyrene (74.7% and 69.6%, respectively) and on the of stainless steel surfaces (45.3% and 44.9%, respectively). Due to the significant reduction of biofilm production by OESA, OECZ and cinnamaldehyde, at low concentration, these substances may be considered as active ingredient, in the production of sanitizers in the food industry.

Key words: mastitis, biofilm *Staphylococcus aureus*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum*.

7. Introdução

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária no gado leiteiro, geralmente causada por bactérias, levando a grandes perdas econômicas devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e morte dos animais (Melchior et al., 2006). Uma das principais bactérias envolvidas em quadros de mastite clínica, subclínica ou crônica é o *Staphylococcus aureus* (Vasudevan et al., 2003; Clutterbuck et al., 2007).

S. aureus pode apresentar um importante fator de virulência: a capacidade de formar biofilme, que permite a adesão de células bacterianas em superfícies e tecidos animais, seguido de multiplicação bacteriana. O resultado é uma complexa estrutura com multicamadas bacterianas envoltas por uma matriz polissacarídica capsular, permitindo que a bactéria se proteja da ação de células fagocitárias da resposta imune e da ação de antimicrobianos e desinfetantes, pela baixa difusão através da matriz. Essa proteção fornecida pelo biofilme poderia facilitar a colonização do epitélio mamário, com o estabelecimento de uma infecção persistente. (Fox et al., 2005; Harraghy et al., 2006; Lasa e Penadés, 2006).

Em *S. aureus*, a produção do polissacarídeo é mediada pelo *locus ica* (intercelular adhesion), compostos pelos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* (McKenney, et al., 1998), sendo *icaA* e *icaD*, os mais relevantes. A co-expressão desses dois genes resulta em um aumento significativo na expressão fenotípica dos polissacarídeos capsulares (Arciola et al., 2001). Outro gene importante envolvido na produção de biofilme em *S. aureus* é o *bap*

(biofilm associated protein), que sintetiza a proteína Bap, promotora da ligação primária às superfícies e à adesão intercelular. (Lasa e Penadés, 2006).

Tendo em vista a complexidade estrutural do biofilme, sua capacidade de dispersão e a grande ocorrência de *S. aureus* produtor de biofilme em casos de mastite, há muito tempo vem-se aumentando o investimento em programas de desinfecção de equipamentos industriais (Gibson et al., 1999). Atualmente, uma nova alternativa para o uso de desinfetantes e compostos antimicrobianos sintéticos tem sido a busca por compostos naturais ativos contra bactérias e a produção de biofilmes (Oliveira et al., 2010). Já foi demonstrada, por diversos pesquisadores, a eficiência de óleos essenciais (OEs) contra bactérias (Alexopoulos et al., 2011), parasitas (Pandey et al., 2000; Pessoa et al. 2002), fungos (Mari et al., 2003), vírus (Bishop, 1995) e até mesmo contra insetos (Karpouhtsis et al., 1998) Mais recentemente, os OEs de condimentos aromáticos e de plantas medicinais também estão sendo testados quanto a sua atividade sobre biofilmes (Kwiecinski et. al. 2009). A ação desses OEs pode atingir diferentes mecanismos celulares, como a inibição da síntese de peptidoglicano (Ogunlana et al., 1987), a modificação da hidrofobicidade da membrana bacteriana (Cox et al., 2000) e a modulação do *quorum sensing*, que é a modelagem da expressão gênica em resposta a variabilidade de condições ambientais (Gao et al., 2003).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) (OESA), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (OECZ) e seus compostos majoritários (eugenol e cinamaldeído respectivamente) na capacidade de produção de biofilme por cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica.

8. Materiais e métodos

8.1. Amostras e isolamento bacteriano

Foram utilizadas 64 cepas de *S. aureus*, isoladas previamente, a partir de leite de vacas com mastite subclínica. A identificação das cepas armazenadas foi reconfirmada através da coloração de Gram e testes de catalase, coagulase e DNase, de acordo com Koneman et al. (2008). A confirmação molecular foi feita por reação em cadeia da polimerase (PCR), com amplificação do gene espécie-específico nuclease staphylococcal (*nuc*), conforme Tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizadas na detecção de genes produtores de biofilme e confirmação de identificação das cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica.

gene	primer	sequencia	Produto	Ta (°C)	Referências
<i>bap</i>	bap-F	ccctatatcgaaggtgtagaattg	971 pb	65	Cucarella et al. (2001)
	bap-R	gctgttgaagttaatactgtacctgc			
<i>icaA</i>	icaA-F	cctaactaacgaaggtag	1315 pb	49,5	Vadesuvan et al. (2003)
	icaA-R	aagatatagcgataagtgc			
<i>icaD</i>	icaD-F	aaacgtaagagaggtgg	381 pb	50	Vadesuvan et al. (2003)
	icaD-R	ggcaatatgatcaagatac			
<i>nuc</i>	nuc-F	cgtaaatagcacttgcttcagg	257 pb	55	CRL (UE)
	nuc-R	tcagcaaatgcatcacaacag			

Ta (°C): temperatura de anelamento; pb: pares de bases

8.2 PCR para detecção de genes ligados a produção de biofilme

As 64 cepas de *S. aureus* foram analisadas pela técnica de PCR, selecionando-se 26 que apresentavam concomitantemente os três principais genes para a produção de biofilmes (*icaA*, *icaD* e *bap*). Os primers utilizados e suas propriedades estão listados na Tabela 1.

A extração do DNA foi realizada com auxílio do kit Minispin (GE, healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL num volume total de

25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 2,0 µM de Cloreto de Magnésio, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer*, água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.®) em gel de agarose 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Sybr Green (2µl 10x/0,8µl de amostra - Invitrogen®). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation®). Para o cluster *ica*, foram utilizados *S. aureus* ATCC 35.983 foi utilizado como controle positivo e *S.epidermidis* ATCC 12.228, como controle negativo, na reação da PCR. Para o *bap*, foi utilizada uma cepa positiva, sequenciada, mas não padrão.

8.3. Extração do OESA e OECZ e análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)

Os OESA e OECZ foram extraídos por arraste de vapor em destilador para produção de OEs (modelo MA480 - Marconi). Para o cálculo da densidade dos OEs, tubos do tipo *ependorfs* foram pesados (P_1) em balança analítica, com posterior adição de 1mL (V) do OE, sendo pesado novamente (P_2). A densidade foi calculada utilizando a formula adaptada de Fonseca e Librand (2008). $D = \frac{P_2 - P_1}{V}$. Os compostos majoritários do OESA, e do OECZ, o eugenol e o cinalmaldeído foram adquiridos comercialmente (Sigma).

A caracterização química foi obtida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) (modelo QP5050A - Shimazu), com a utilização de coluna capilar CBP-5 de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25 μ m de espessura do filme. As condições cromatográficas previstas foram definidas em função do óleo essencial analisado. A identificação dos componentes do OE foi feita com base na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology, MD,USA) para análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura.

8.4. Determinação do MIC_{90%} para detecção da dose sub-letal

Os ensaios de sensibilidade foram realizados em triplicata para o OESA, OECZ e seus respectivos compostos majoritários, utilizando a metodologia da microdiluição em microplacas de ELISA em meio Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid) acrescido de 0,5% de Tween 80, nas concentrações de 0,025%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,20%, 0,40%, 0,80%, em volumes finais de 200 μ l

(CLSI, 2009). Foram utilizados controles positivos, negativos e da esterilidade dos OEs (meio BHI acrescido dos óleos).

O inóculo bacteriano foi padronizado em solução salina 0,85% estéril na escala 0,5 de MacFarland, com o auxílio do Densichek (BioMérieux), obtendo-se uma suspensão bacteriana de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, a partir de cultura obtida após 35° C/24 horas de incubação, em caldo BHI. Foram inoculados volumes de 2µL da suspensão bacteriana padronizada, obtendo-se, no volume de 200µL, uma concentração de 10^5 UFC/ml. Após incubação a 35°C/24h, a leitura foi realizada com a adição do indicador redox (resazurina 0,01%), sendo que a coloração azul em cada concentração indicou resultado negativo e a coloração rosa, resultado positivo para o crescimento bacteriano. Nesse caso, a CIM foi considerada aquela em que não houve crescimento bacteriano. Para comprovar a ação bactericida e não bacteriostática, uma alíquota de 100 µL do poço que não revelou crescimento foi espalhada em uma placa de ágar sangue e depois de incubada em 35° C/24horas não apresentou crescimento. A dose sub-letal utilizada para os ensaios de produção de biofilme foi de 0,106 mg.mL⁻¹.

8.5. Produção do biofilme pelas cepas de *S. aureus* na presença e ausência dos dos OEs e de seus compostos majoritários

8.5.1. Análise dos OEs e compostos majoritários na formação de biofilme em poliestireno

Cada cepa foi semeada em caldo tripticase soja (TSB, Oxoid) e incubada a 37° C/24h, sendo diluídas a 10^8 UFC utilizando 200 µl do mesmo diluente, com

o auxílio do Densichek (BioMérieux). A seguir, o OE ou o eugenol foram adicionados numa concentração sub-letal de 0,106 mg.mL⁻¹. O plaqueamento foi feito em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato.

As cepas de *S. aureus* foram incubadas a 35° C/48horas, sem agitação. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corado com violeta genciana 1%. Após lavagens com água destilada, a placa, foi colocada em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), com leitura a 570 nm. O caldo TSB não inoculado foi utilizado como branco, para corrigir o valor da absorbância, sendo realizada a média dos quatro poços. (Mack et al., 2000, Vasudevan et al., 2003; Oliveira et al., 2007). *S. aureus* ATCC 35.983 foi utilizado como controle positivo e *S.epidermidis* ATCC 12.228, como controle negativo da produção de biofilme (Vasudevan et al., 2003; Oliveira et al., 2007). Todas as cepas foram testadas sem o óleo, como controle positivo do teste.

8.5.2. Análise dos OEs e compostos majoritários na formação de biofilme em aço inox

Fichas de aço inox estéreis, com diâmetro de 1 cm, foram depositadas no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e com tampa. A diluição das cepas foi realizada como descrito em 3.5.1. A seguir, alíquotas de 300 µL dessas diluições foram distribuídas, em triplicata, nos poços e incubadas a 35°C/48horas, na ausência e na presença de cada OE e de cada composto majoritário. Em seguida, as fichas foram transferidas para uma nova placa. Esse passo teve como objetivo evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no plástico, ao redor das fichas de diferentes

materiais. Uma vez na placa nova, as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS, pH 7,4), para a remoção das células não fixadas e coradas com violeta cristal 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa, novamente lavada. Em seguida, o biofilme foi ressuspendido em 300 µl de ácido acético glacial, por 15 minutos, que assegurou a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µL foi transferido para um microplaca de 96 poços, lida em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), em 570 nm.

8.6. Análise Estatística

Para comparar o efeito na produção de biofilme na ausência e na presença dos OEs e compostos majoritários, foi realizada a análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso seguido do teste de Tukey, para comparações entre as médias, sendo que o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

9. Resultados

9.1. Análise genotípica quanto a presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap*

A partir de 64 cepas de *S.aureus*, 26 (37,5%) apresentaram simultaneamente os três genes de maior importância na produção de biofilme, *icaA*, *icaD* e *bap*. (Figuras 1, 2 e 3). O cluster *ica* foi observado com maior frequência que o gene *bap*, pois *icaA* ocorreu em 85,9% e o *icaD* em 84,3% das cepas analisadas.

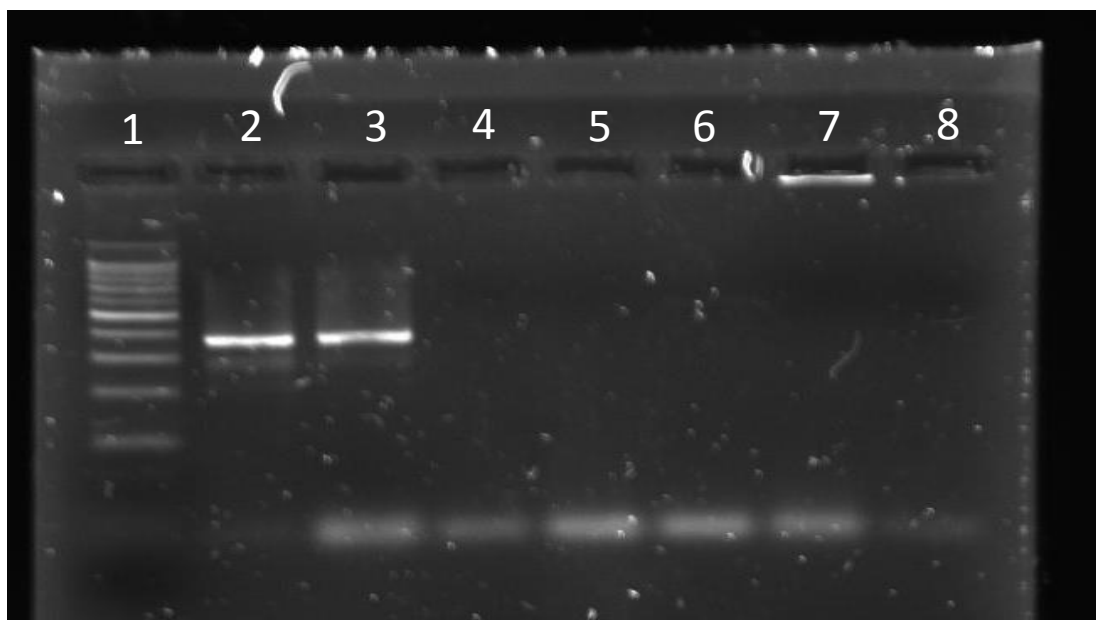


Figura 1 Gel de agarose. Coluna 1: marcador molecular 100pb; coluna 2: gene *icaD* (381pb) das cepas de *S. aureus*; coluna 3: controle positivo (ATCC 35.983); coluna 8: controle negativo.

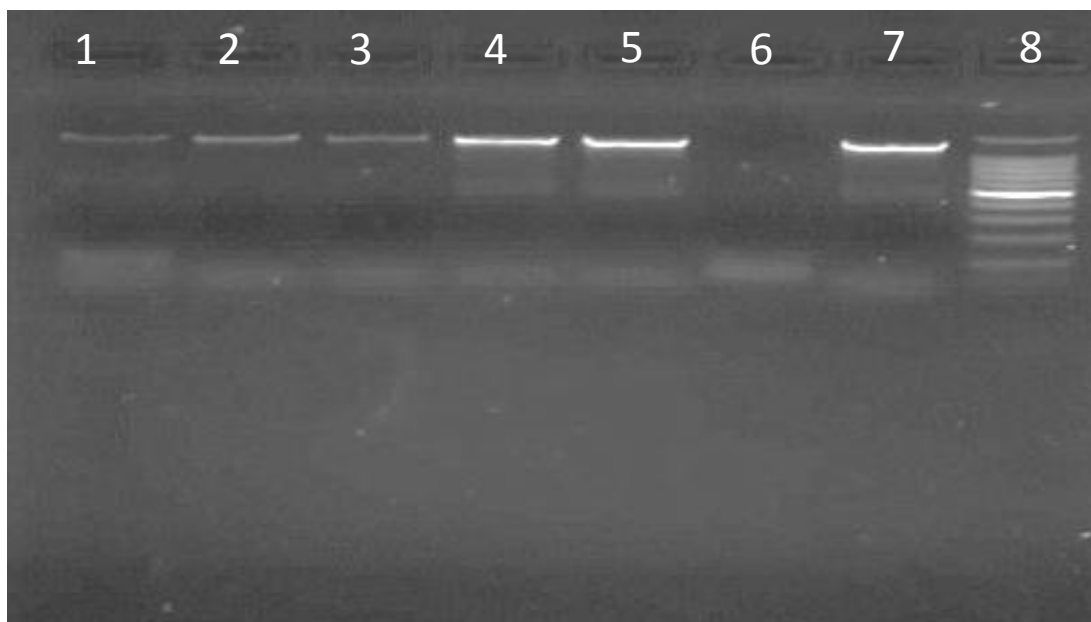


Figura 2. Gel de agarose. Colunas 1-5: *icaA* (1315pb) das cepas de *S. aureus*; coluna 6: controle negativo; coluna 7: controle positivo; coluna 8: marcador molecular (100pb).

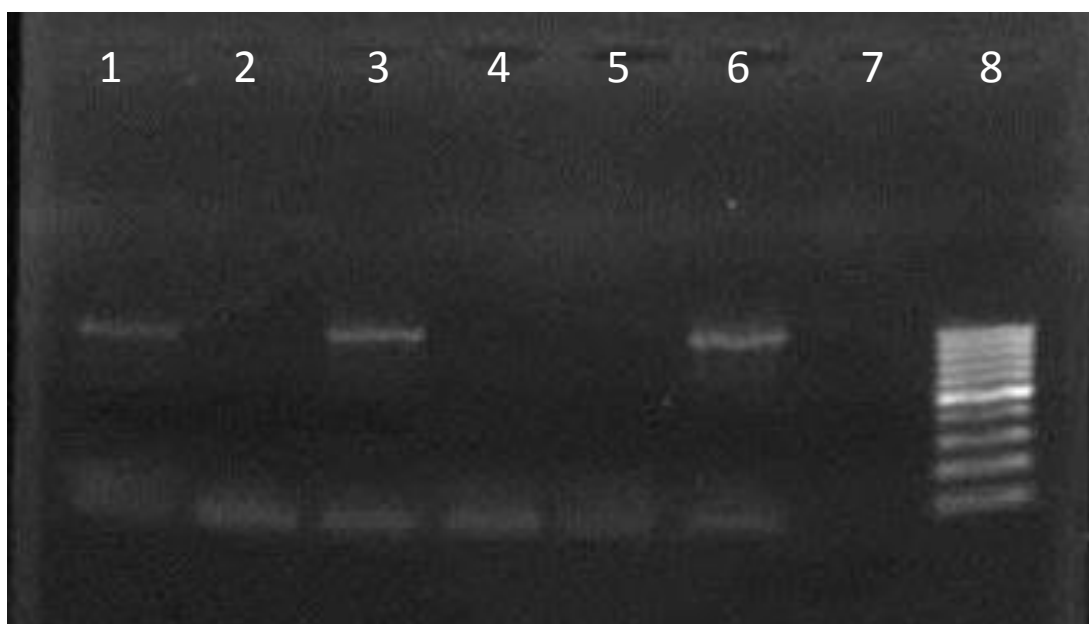


Figura 3. Gel de agarose. Colunas 1-5: gene *bap* (971pb) das cepas de *S. aureus*; coluna 6: controle positivo; coluna 7: controle negativo; coluna 8: marcador molecular (100pb).

Algumas amostras dos amplicons de *bap*, *icaA* e *icaD* foram sequenciados e sequencias parciais foram confirmadas no GeneBank, pelos acessos AY220730.1, CP006838.1 e JN226155.1, respectivamente

9.2. Análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)

Os resultados obtidos na análise química por cromatografia gasosa de espectrometria de massa (CG-EM) assim como a densidade, o rendimento da extração do OESA, OECZ, eugenol e do cinamaldeído estão apresentados na Tabela 2. O composto majoritário do OESA foi o eugenol com 90,21% (Figura 4). Também, o composto majoritário do OECZ foi o cinamaldeído com 86,59% (Figura5).

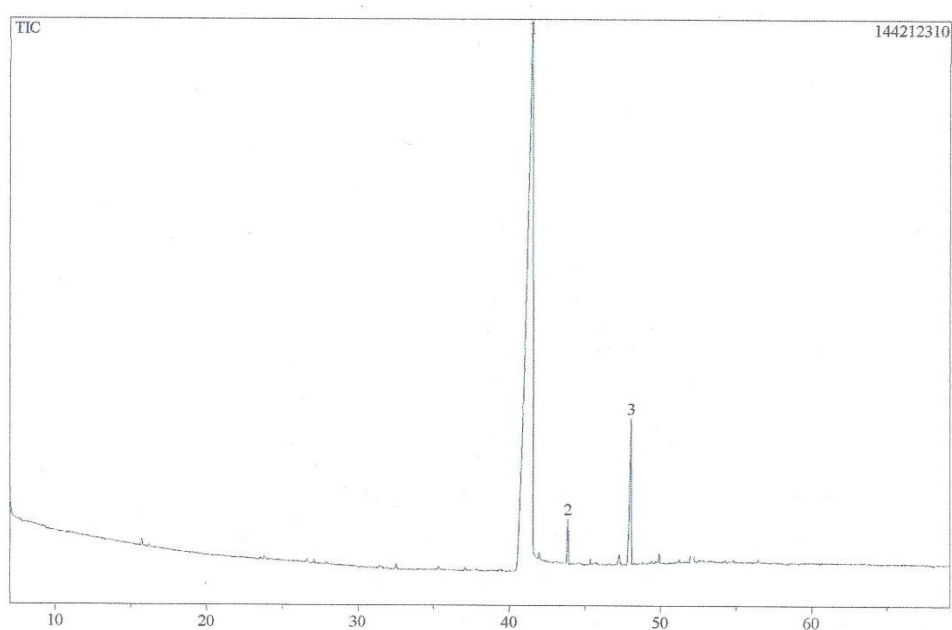


Figura 4. Cromatografica do OESA(A), com os compostos eugenol (1), β -cariofileno (2) acetato de eugenol (3).

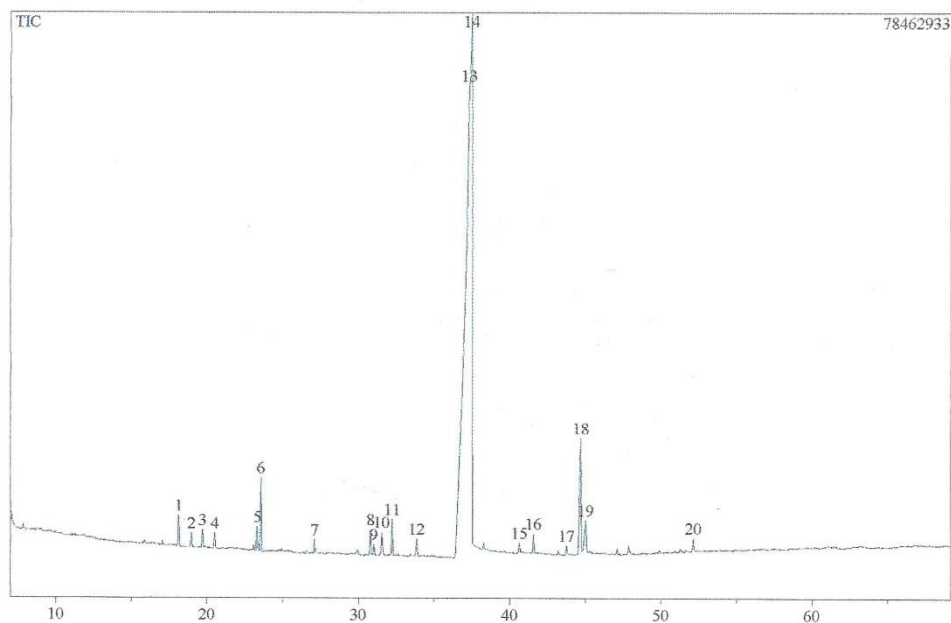


Figura 5. Cromatografia do EOCZ com os principais compostos cinamaldeído (13 e 14), benzaldeído (18) e cineol (6).

9.3. Concentração inibitória mínima dos OEs e dos compostos majoritários

A concentração inibitória mínima do OESA e do eugenol foram de $0,3922 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,2373 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. O OECZ e o cinamaldeído apresentaram concentração inibitória mínima de respectivamente $0,243 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,1987 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Tabela 2. Análises físico-químicas e MIC do OESA, OECZ e seus compostos majoritários.

Espécie ou composto	Densidade (mg.mL ⁻¹)	MIC _{90%} (mg.mL ⁻¹)	Composição (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	1060	0,3922	eugenol (90,2%), acetato de eugenol (6,5%), β-cariofileno (1,3%), outros (1,9%)
eugenol	1050	0,2373	eugenol (100%)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	1075	0,243	cinamaldeído (86,5%), benzaldeído (4,2%), cineol (1,7%), ácido cinâmico (1,5%), α-l
			(0,6%), eugenol (0,1%), outros (5,42%)
cinamaldeído	1080	0,1987	cinamaldeído (100%)

MIC: Concentração Inibitória Mínima; mg.mL⁻¹: miligramas por mililitro; OESA: óleo essencial de cravo; OECZ: óleo essencial de canela

9.4. Análise dos OE's e compostos majoritários na formação de biofilme em microplaca de poliestireno e fichas de aço inox.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos referentes à formação de biofilme das cepas de *S. aureus* em superfície de poliestireno e aço inox, na ausência e presença dos compostos em estudo. Essa tabela traz os valores das densidades ópticas, obtidos na presença dos compostos naturais, seguido da porcentagem de redução em relação à produção de biofilme das mesmas cepas em um ambiente controle, sem adição de compostos naturais. Os valores obtidos na condição controle foram de 0,415 (100%) para poliestireno e 1,07 (100%) em aço inox.

Houve diferença significativa na produção de biofilme entre as cepas controle em relação às cepas em ambiente com o OESA (p<0,001) e OECZ

($p < 0,001$) tanto em poliestireno quanto em aço inox. Entre os compostos majoritários, ambos apresentaram diferença significativa na redução da produção de biofilme ($p < 0,001$) em poliestireno. No aço inox, o eugenol ($p > 0,05$) não apresentou diferença significativa em relação às cepas controle.

Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre o OECZ e seu composto majoritário, o cinamaldeído, em ambas as superfícies testadas. Por outro lado, o OESA foi mais eficiente na redução da produção de biofilme, em poliestireno e aço inox, o que não ocorreu quando seu composto majoritário foi testado isoladamente.

Tabela 2. Resultado da leitura em espectrofotômetro referente à formação de biofilme, na ausência e na presença de OE e seus compostos majoritários e diferentes superfícies.

	Poliestireno	Aço Inox	p value (Pol./aço inox)
controle	0,415 (100%) a	1,07 (100%) ab	
OESA	0,127(69,4%) b	0,390 (63,5%) c	$p < 0,01$ e $p < 0,01$
Eugenol	0,196 (52,8%) c	0,860 (19,2%) b	$p < 0,01$ e $p > 0,05$
OECZ	0,105 (74,7%) b	0,585 (45,3%) c	$p < 0,01$ e $p < 0,01$
cinamaldeído	0,126 (69,4%) b	0,589 (44,9%) c	$p < 0,01$ e $p < 0,01$

Tratamentos seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente. OESA: óleo essencial de cravo; OECZ: óleo essencial de canela; pol: poliestireno.

10. Discussão

Entre as 64 cepas isoladas, 37,5% apresentaram os genes *icaA*, *icaD* e *bap* concomitantemente. A presença dos genes *icaA* e *icaD* é mais frequente em cepas provenientes de vacas com mastite (Rohde et al., 2001, Knobloch et al., 2002, Atshan and Shamsudin, 2011), mas em relação ao gene *bap*, essa frequência foi bem mais expressiva, uma vez que diversos autores não encontraram esse gene em cepas de *S. aureus*, isoladas de vacas com mastite (Vasudevan et al., 2003; Vancraeynest et al., 2004; Nitzsche et al., 2007; Vautor et al. 2008). Apenas Cucarella et al. (2001) encontraram 5% de positividade para o gene *bap* em 350 cepas testadas. Vautor et al. (2008) chegaram a propor que a aquisição do gene *bap* por cepas de *S. aureus* seria um fato recente e ainda não teria ocorrido a transmissão horizontal desse gene.

A composição química dos OE's apresentou compostos em quantidades semelhantes às observadas em outros trabalhos. Os principais componentes do OESA foram o eugenol (90,21%) e acetato de eugenol (6,5%). Bauer (2001) observou os mesmos componentes, em concentrações próximas 75-85% e 8-15% respectivamente. Já a composição do OECZ apresentou o cinamaldeído (86,5%) e benzaldeído (4,2%) como principais compostos, Unlu et al., (2010) apresentaram composição semelhante ao OECZ usado nesse trabalho, onde o cinamaldeído foi encontrado em concentração de 68,9% e o benzaldeído, de 9,9%. Ocorreu uma diferença somente pela presença de acetato de cinamaldeído (7,4%), que no presente trabalho se mostrou em quantidades ínfimas. Burt et al. (2004) discutiram que as variações da composição de OEs de mesma espécie podem ocorrer devido variação genética, sazonalidade, localização geográfica, horário de colheita e partes da planta utilizada no

preparo do óleo. Devido a essa variabilidade, também foram testados os respectivos compostos majoritários isolados e de composição química conhecida, com a finalidade de padronizar um composto ativo na proteção contra formação de biofilme por *S. aureus*.

As concentrações inibitórias mínima dos OE's e dos compostos majoritários demonstraram ação antimicrobiana em células planctônicas de *S. aureus*, como já observado em trabalhos anteriores (Farag, 1989; Kim 1995; Hammer et al., 1999, Unlu, 2010). A partir dos valores de MIC_{90%}, a dose subletal utilizada para a verificação de uma possível ação anti biofilme foi de 0,106 mg.mL⁻¹. Esse valor padronizado não foi a primeira dose subletal dos óleos e sim a menor diluição onde não ocorreu a corrosão das placa de poliestireno, pelos OEs ou pelos seus compostos majoritários. A corrosão observada em concentrações maiores levava a uma impregnação do corante violeta genciana no fundo das placas, ocorrendo a leitura de falsos-positivos.

A formação de biofilme em superfícies de poliestireno apresentou redução de 69,4% na presença de OESA. Nesse material, a redução foi ainda maior, de 74,7%, quando se utilizou o OECZ. O composto cinamaldeído também foi responsável por alta redução, 69,6%, na formação de biofilme. O composto que menos causou redução, mas, ainda assim significativa, foi o eugenol com 52,8%. Já a proteção do eugenol, contra formação de biofilme, em superfície de aço inox não demonstrou diferença significativa em relação ao controle, ficando apenas em 19,6%, entretanto, o cinamaldeído causou uma redução significativa ($p < 0,05$) de 44,95%. O OESA e OECZ, assim como o cinamaldeído, causaram significativa redução na formação de biofilme de *S. aureus* em aço inox, 63,5% e 45,3% respectivamente.

Os dados demonstram que a eficiência do OESA contra formação do biofilme não ocorreu, exclusivamente, pelo composto majoritário, o eugenol, mas sim pela interação entre ele e os demais componentes do óleo. Lebert et al. (2007) observaram redução de biofilme pelo eugenol, em cepas de *S. aureus*, quando misturado com sal de amônia quartenária. Por outro lado, podemos inferir que a eficiência do OECZ está intimamente ligada a seu composto majoritário, cinamaldeído, uma vez que a eficiência do óleo e do composto isolado não foram estatisticamente diferentes.

A ação protetora baseia-se no fato de que as primeiras fases da formação do biofilme são atividades complexas de processos celulares altamente específicos e a alteração de qualquer componente celular pode interferir em todo o restante da produção e fixação do biofilme (Karatan e Watnick, 2009).

Diversos trabalhos tem mostrado a ação de compostos naturais na célula bacteriana como, por exemplo, a ação em camadas lipídicas, em membranas, aumento da permeabilidade bacteriana, vazamento de íons e conteúdos celulares e coagulação de elementos citoplasmáticos. (Helander et al., 1998; Ultee et al., 1999; Lambert et al., 2001; Ultee e Smid, 2001) Entretanto, a ação que pode estar mais próxima à produção de biofilme, em fases iniciais, é o dano a proteínas de membranas (Juven et al., 1994; Ultee et al., 1999). Com proteínas de membrana danificadas, as de adesão e de adsorção das células à superfície ficariam impossibilitadas, decorrendo a redução na produção de biofilme.

Outros óleos essenciais e seus compostos majoritários também apresentam inibição da formação inicial de biofilme. O carvacrol inibiu o

crescimento de biofilme de espécies de *S. aureus* e *S. Typhimurium* em fase inicial de crescimento e impediu a formação de biofilmes maduros (Knowles, et al., 2005). Nostro et al. (2007) relataram baixa formação de biofilme por várias estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, na presença de concentrações subletais de OE de orégano, carvacrol e timol. Resultados similares foram obtidos para cepas de *S. Typhimurium*, na presença de concentrações sub-letais de OE de tomilho, orégano e carvacrol (Soni et al., 2013).

Foi observada uma forte atividade do OESA, OECZ e cinamaldeído contra produção de biofilme por *S. aureus*. Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que baixas concentrações de vários OEs podem aumentar a atividade metabólica bacteriana em relação à produção de biofilme devido ao stress ambiental causado pelo OE (Kwiecinski, 2009; Niu e Gilbert, 2004).

11. Conclusão

Apesar do baixo rendimento na extração de OESA, OECZ e cinamaldeído, o resultado positivo atingido, utilizando-se baixas concentrações dessas substâncias, indica o grande potencial protetor anti-biofilme desses compostos, principalmente em equipamentos de aço inox e poliestireno.

12. Agradecimento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo suporte financeiro.

13. Referências

- ALEXOPOULOS, A.; KIMBARIS, A. C.; PLESSAS, S.; MANTZOURANI, I.; THEODORIDOU, I.; STAVROPOULOU, E.; POLISSIOU, M.G.; BEZIRTZOGLU, E. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Anaerobe**, v.17, p.1-4, 2011.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.
- ATSHAN, S.S.; SHAMSUDIN, M.N. Evaluation of phenotypic and genotypic detection methods for biofilm-forming methicillinsensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Ann. Microbiol.** 2011.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 4ª edição. **Wiley-VCH**, Weinheim p. 293, 2001.
- BISHOP, C.D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **J. Essential Oil Res.**, v. 7, p. 641 – 644, 1995.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 94, p.223- 253, 2004.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard** - Eighth Edition. *CLSI M7-A8*, 2009b.
- CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Vet. Microbiol.**, v. 121, p.1–17, 2007.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.170–175, 2000.
- CUCARELLA, C.; COLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, P. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

FONSECA, P.; LIBRAND, A. P. L. Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam*). **Braz J Pharm Sci.**, v.44, p. 271-77, 2008.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **J. Food Protec.**, v.52 (9), p.665–667, 1989.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Vet. Microbiol.**, v.107, p.295–299, 2005.

GAO, M.; TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J. B.; BAUER, W. D. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.16, p. 827–834, 2003.

GIBSON, H.; TAYLOR, J. H.; HALL, K. E.; HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **J. Appli. Microbiol.**, v.87, p.41–49, 1999.

HARRAGHY, N.; SEILER, S.; JACOBS, K.; HANNIG, M.; MENDER, M.D.; HERRMANN, M. Advances in *in vitro* and *in vivo* models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **Int. J. Artif. Organ**, v. 29, p.368–378, 2006.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J. Appli. Microbiol**, v.86, p.985– 990, 1999.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.3590–3595, 1998.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **J. Appli. Microbiol**, v.76, p.626– 631, 1994.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.73 (2), p.310-47, 2009.

KARPOUHTSIS, I.; PARDALI, E.; FEGGOU, E.; KOKKINI, S.; SCOURAS, Z.G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 1111 – 1115, 1998.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.-I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.2839– 2845, 1995.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.797-803, 2005.

KONEMAN, E. W.; ALLEN S. D.; JANDA W. M.; SCHRECKENBERGER P. C.; WINN Jr W. C. 2008. Diagnostico Microbiológico—Texto e Atlas Colorido. 6th ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil.

KNOBLOCH, J.K.M.; HORSTKOTTE, M.A.; ROHDE, H.; MACK, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Med. Microbiol. Immunol**, v.191, p.101–106, 2002.

KWIECINSKI, J.; EICKB, S.; WOJCIKA, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **Inter. J. Antim. Agents**, v.33, p.343–347, 2009.

LEBERT, T.I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiol.**, v.24, p.281-287, 2007.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J.E.. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, v.91, p.453–462, 2001.

LASA, I.; PENADES, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 99–107, 2006.

MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J.K.; ELSNER, H.; FEUCHT, H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infec. Immun.**, v.68, p.3799-3807, 2000.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p. 761 – 766, 2003.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **Vet. J.**, v.171, p. 398–407, 2006.

MCKENNEY, D.; HÜBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 10, p. 4711-4720, 1998.

NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Vet. Microbiol.**, v.120, p.292–299, 2007.

NIU, C.; GILBERT, E. S. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70(12), p.6951-6956, 2004.

NOSTRO, A.; SUDANO, R. A.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.519-523, 2007.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 124, pp 187–191, 2007.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E., HILSDORF, R. P. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control** , v.21, p.549–55, 2010.

OGUNLANA, E. O.; HOEGLUND S.; ONAWUNMI G.; SKOELD O. Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. **Microbios.**, v.50, p.43–59, 1987.

PANDEY, R.; KALRA, A.; TANDON, S.; MEHROTRA, N.; SINGH, H.N.; KUMAR, S. Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds. **J. Phytopathol.**, v. 148, p. 501 – 502, 2000.

PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.**, v. 109, p. 59 – 63. 2002.

ROHDE, H.; KNOBLOCH J.K.M.; HORSTKOTTE M.A.; MACK, D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p.4595–4596, 2001.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, p.199-204, 1957.

SONI, K. A.; OLADUNJOYE, A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; SILVA, J. L.; MIKEL, B. Inhibition and inactivation of *Salmonella* Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **J. Food Prot.**, v.76(2), p.205-212. 2013.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65 (10), p.4606– 4610, 1999.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Inter. J. Food Microbiol.**, v.64, p.373–378, 2001.

Unlu, M.; Ergene, E.; Unlu, G. V.; Zeytinoglu, H. S.; Vural N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food Chem. Toxicol.**, v.48, p. 3274–3280, 2010.

VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. **Vet. Microbiol.**, v.103, p. 241–247, 2004.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p.179–185, 2003.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; PONT, A.; THIERY, R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. **Vet. Microbiol.**, v.127, p.407–411, 2008.

,