

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
CAMOMILA ROMANA (*Chamaemelum nobile*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCELO PIRES BARBOSA

**Santa Maria, RS, Brasil
2019**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
CAMOMILA ROMANA (*Chamaemelum nobile*)**

por

Marcelo Pires Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2019

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
CAMOMILA ROMANA (*Chamaemelum nobile*)**

elaborada por
Marcelo Pires Barbosa

como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Pauline Cordenonsi Bonéz, Dra. (URI-Santiago)

Paulo Guilherme Markus Lopes, Dr. (UFCSPA)

Santa Maria, 11 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu graças ao auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- a meu orientador Roberto Christ Vianna Santos, pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada, e pelos inúmeros ensinamentos e sábia orientação;

- aos meus pais Ayrton Fernando Barbosa e Carmem Regina Pires Barbosa pela criação carinhosa e responsável que me deram, além de todo o amor, apoio e companheirismo ao longo de toda minha vida:

- a meu irmão Fernando Pires Barbosa pelo amor e amizade ao longo da vida e por servir de inspiração para fazer mestrado;

- aos demais familiares e amigos, que sempre me apoiaram

- aos colegas do laboratório de pesquisa em microbiologia oral – LAPEMICRO – que muito me ajudaram e me ensinaram;

- aos integrantes do Núcleo de Tecnologia em Alimentos – NTA – pela contribuição inestimável na análise química da amostra com a qual trabalhamos

- a Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de continuar meus estudos;

- ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e subsídios necessários para que pudesse conduzir meus experimentos;

- aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por contribuírem de uma forma ou de outra pela conquista desse título;

- aos colegas de trabalho no Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM – que me incentivaram a apoiaram ao longo deste trabalho;

- a Pauline Cordenonsi Bonez e Paulo Guilherme Markus Lopes, por gentilmente aceitarem dedicar parte do seu tempo para avaliarem este trabalho;

Enfim a todos àqueles que fazem parte da minha vida e que são essenciais para eu ser, a cada dia nessa longa jornada, um ser humano melhor.

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAMOMILA ROMANA (*Chamaemelum nobile*)

AUTOR: Marcelo Pires Barbosa
ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos

O aumento da prevalência de infecções por micro-organismos multirresistentes chamou a atenção da comunidade científica para a necessidade de novos fármacos antimicrobianos. Ao mesmo tempo, a percepção da inevitabilidade do desenvolvimento de resistência a esses agentes, levou a uma busca por métodos alternativos de combate a infecções, como o uso de agentes sem atividade antimicrobiana direta, mas capazes de impedir a expressão de fatores de virulência e potencializar a ação de antimicrobianos. Metabólitos secundários de plantas são ricos em moléculas biologicamente ativas e se tornaram alvo de intensas pesquisas nesse sentido. O presente estudo teve como objetivo avaliar tais ações no óleo essencial de *Chamaemelum nobile*, popularmente conhecida como camomila romana. Os componentes do óleo foram identificados por GC-FID e GC-MS, a atividade antimicrobiana foi avaliada por microdiluição em caldo e por teste de sinergismo com amicacina. A inibição de fatores de virulência foi verificada com testes de inibição da formação de biofilme, inibição de motilidade e interferência em sistema de *quorum sensing* através do teste de inibição da produção de violaceína. O óleo analisado apresentou α -pineno e β -pineno como componentes majoritários e uma fraca ação antimicrobiana frente a algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella* sp. e *Staphylococcus* sp. com CIMs de 227 e 455 mg/mL. Concentrações do óleo de 14,2 e 7,1 mg/mL foram capazes de inibir a produção de violaceína em *Chromobacterium violaceum* e concentrações de 227 e 113 mg/mL inibiram as motilidades dos tipos *swarming* e *twitching*, porém induziram um aumento da formação de biofilme em *P. aeruginosa* PA01. O óleo apresentou forte atividade moduladora da atividade de amicacina em *P. aeruginosa* PA01, reduzindo em 128 vezes a CIM desse antimicrobiano.

Palavras-chave: *Chamaemelum nobile*; camomila romana; sinergismo; motilidade

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROMAN CHAMOMILE (*Chamaemelum nobile*) ESSENTIAL OIL

AUTHOR: Marcelo Pires Barbosa
ADVISER: Roberto Christ Vianna Santos

The increased prevalence of infections by multiresistant microorganisms has drawn the attention of the scientific community to the need for new antimicrobial drugs. At the same time, the perception of the inevitability of the development of resistance to these agents led to a search for alternative methods to treat infections, such as the use of agents without direct antimicrobial activity, but capable of preventing the expression of virulence factors and potentializing the action of antimicrobials. Secondary plant metabolites are rich in biologically active molecules and have become the subject of intense research in this area. The present study aimed to evaluate such activity in the essential oil of *Chamaemelum nobile*, popularly known as Roman chamomile. The components of the oil were identified by GC-FID and GC-MS, the antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution and by antimicrobial synergism test with amikacin. Inhibition of virulence factors were verified with tests of inhibition of biofilm formation, inhibition of motility and interference in the quorum sensing system through the inhibition test of violacein production. The analyzed oil presented α -pinene and β -pinene as major components and a weak antimicrobial action against some strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella* sp. and *Staphylococcus* sp. with MICs of 455 and 227 mg/mL. Oil concentrations of 14,2 and 7,1 mg/mL were able to inhibit the production of violacein in *Chromobacterium violaceum* and concentrations of 227 and 113 mg/mL inhibited the swarming and twitching types of motility, but induced an increase in biofilm formation in *P. aeruginosa* PA01. The oil showed strong modulatory activity of the amikacin activity in *P. aeruginosa* PA01 reducing the MIC for this antimicrobial by 128-fold.

Keywords: *Chamaemelum nobile*; Roman chamomile; synergism; motility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação de Biofilme.....	16
Figura 2 – Tipos de motilidade bacteriana.....	20
Figura 3 - Sistemas <i>quorum sensing</i> em <i>P. aeruginosa</i>	23
Figura 4 – <i>Chamaemelum nobile</i>	26
Figura 5 – Placa de <i>checkerboard</i>	31
Figura 6 – Cromatograma do óleo essencial de <i>C. nobile</i>	34
Figura 7 – Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo de <i>C. nobile</i>	36
Figura 8 – Atividade do óleo essencial de <i>C. nobile</i> em motilidade do tipo <i>twitching</i> de <i>P. aeruginosa</i> PA01.....	41
Figura 9 - Atividade do óleo essencial de <i>C. nobile</i> em motilidade do tipo <i>swarming</i> de <i>P. aeruginosa</i> PA01.....	41
Figura 10 – Atividade do óleo essencial de <i>C. nobile</i> em motilidade do tipo <i>swimming</i> de <i>P. aeruginosa</i> PA01.....	42
Figura 11 - Efeito do óleo essencial de <i>C. nobile</i> sobre a produção de biofilme por <i>P. aeruginosa</i> e de violaceína por <i>C. violaceum</i>	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Formulação dos meios para avaliação de motilidade.....	32
Quadro 2 – Composição percentual do óleo essencial de <i>C. nobile</i>	34
Quadro 3 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>C. nobile</i>	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	SITUAÇÃO ATUAL DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	12
3.2	TERAPIA ANTIMICROBIANA COMBINADA.....	13
3.3	BIOFILMES.....	15
3.4	MOTILIDADE BACTERIANA.....	19
3.5	REGULAÇÃO GÊNICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM <i>P. aeruginosa</i>	22
3.6	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	25
3.7	DESCRIÇÃO DA PLANTA <i>Chamaemelum nobile</i>	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO.....	28
4.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	29
4.2.1	Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão.....	29
4.2.2	Determinação da CIM e CBM para bactérias.....	29
4.2.3	Determinação da CIM e CBM para leveduras.....	30
4.2.4	Avaliação de combinação com antimicrobianos.....	30
4.3	ENSAIOS DE INTERFERÊNCIA BACTERIANA.....	31
4.3.1	Inibição da formação de biofilme.....	31
4.3.2	Inibição da produção de violaceína.....	31
4.3.3	Inibição da motilidade bacteriana.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO.....	33
5.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
5.3	ENSAIOS DE INTERFERÊNCIA BACTERIANA.....	40
6	CONCLUSÃO	45
7	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina, nos anos 20, foi um dos mais importantes avanços da medicina. A partir dos anos 40, com a sua produção em larga escala e a descoberta de várias outras classes de antimicrobianos, a humanidade experimentou um grande aumento na qualidade e expectativa de vida (CRF, 2011).

Desde então, a resistência aos antimicrobianos vem aumentando em todo mundo, levando ao aparecimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos, algumas das quais resistentes a virtualmente todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis. Em 2007, esses micro-organismos foram responsáveis por 400.000 infecções e 25.000 mortes na Europa e um custo estimado em 1,5 bilhões de euros (BUSH, 2011). A escalada de micro-organismos multirresistentes, junto à carência de novos fármacos, levanta a possibilidade que a humanidade possa viver uma era pós-antibióticos, em que muitas infecções serão novamente intratáveis.

Essa temida possibilidade levou a uma busca por novas abordagens para o enfrentamento da resistência a antimicrobianos, como o desenvolvimento de vacinas, terapia com bacteriófagos e interferência na capacidade de formação de biofilme e expressão de fatores de virulência, bem como a combinação de 2 ou mais antimicrobianos ou a combinação destes com agentes não-antimicrobianos capazes de potencializar sua ação (BUSH, 2011).

Acredita-se que mais de 60% das infecções estão associadas à formação de biofilmes por micro-organismos (PARAJE, 2011). Os biofilmes são comunidades organizadas de micro-organismos, inseridos em uma matriz polimérica, que colaboram entre si. A formação de biofilme é um processo complexo e multifatorial, que depende tanto de fatores ambientais quanto de mecanismos genéticos dos organismos envolvidos, que podem ser mediados por sinalizadores extracelulares conhecidos como sistema *quorum sensing* (KJELLEBERG, 2002).

Bactérias vivendo sob a forma de biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos, podendo apresentar Concentração Inibitória Mínima (CIM) até 1000 vezes maior que suas formas planctônicas (NICKEL, 1985). Essa maior resistência apresentada por biofilmes não pode ser explicada por um único mecanismo, mas sim por uma combinação de fatores que incluem a matriz extracelular, que pode servir de barreira à difusão do antibiótico, a menor taxa de crescimento nas camadas mais

profundas devido à menor quantidade de oxigênio, que torna essas bactérias menos suscetíveis à ação do medicamento (PARAJE, 2011).

Biofilmes apresentam íntima relação com motilidade bacteriana e essa é importante tanto para a aproximação da superfície (O'TOOLE, 1998) quanto para a dispersão a partir de um biofilme formado (PUREVDORJ-GAGE, 2005). Além disso, a motilidade por si só, pode conferir resistência aumentada a antimicrobianos e permitir a colonização de ambientes hostis (KIM, 2003; LAI, 2009; HOL, 2016). A regulação da transição entre esses estados móvel e sésil é feita através de uma complexa rede de sinalizadores intra e extracelulares, incluindo *quorum sensing* e diguanilato cíclico (c-di-GMP), que também estão envolvidos na expressão de vários outros fatores de virulência (SKARIYACHAN, 2018).

Antimicrobianos foram tradicionalmente encontrados em fungos e bactérias do solo, e a escassez de descoberta de novos antimicrobianos nesses organismos levou a ampliação da busca para vegetais. Plantas são conhecidas pela capacidade de sintetizar uma enorme variedade de metabólitos secundários, como, por exemplo, óleos essenciais, que, embora não vitais para a planta, possuem importante papel de defesa contra insetos, roedores e micro-organismos, (BASSOLÉ, 2012).

Popularmente conhecida como camomila romana, a *Chamaemelum nobile* é uma erva perene nativa da Europa que pertence à família *Asteraceae*. Também é conhecida como *Anthemis nobilis*, e alguns estudos relatam atividades antimicrobiana (KAZEMIAN, 2015, DUARTE, 2005), inseticida (AL SNAFI, 2016), hipotensiva (AL SNAFI, 2016), anti-inflamatória (AL SNAFI, 2016), hipoglicemiante (EDDOUKS, 2005), ansiolítica (AL SNAFI, 2016) e antioxidante (SHARIFZADEH, 2016, GUIMARÃES, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os componentes majoritários do óleo essencial de *C. nobile* bem como sua atividade antimicrobiana e inibitória sobre fatores de virulência de microorganismos patogênicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar a composição do óleo essencial de *C. nobile*;

2.2.2 Avaliar atividade antimicrobiana do óleo frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas;

2.2.3 Avaliar a atividade antifúngica do óleo em leveduras do gênero *Candida*;

2.2.4 Avaliar a atividade inibitória de motilidade de *P. aeruginosa* do óleo em concentrações subinibitórias;

2.2.5 Avaliar a capacidade de concentrações subinibitórias do óleo de inibir a produção de biofilme de *P. aeruginosa*;

2.2.6 Avaliar a capacidade de concentrações subinibitórias do óleo em interferir com o mecanismo de regulação *quorum sensing*;

2.2.7 Avaliar a atividade antimicrobiana em combinação com o agente antimicrobiano amicacina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SITUAÇÃO ATUAL DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Ao longo de toda sua história, o homem foi vítima de muitas doenças infecciosas, que por alguns períodos foram a principal causa de mortalidade. Infecções hoje facilmente tratáveis frequentemente resultavam em óbitos ou deixavam sequelas importantes (CRF-SP, 2011). Este quadro permaneceu inalterado até a industrialização da penicilina na década de 40. A partir de então, vários outros antimicrobianos foram descobertos e passaram a ser comercializados, possibilitando muitos avanços na medicina e o consequente aumento da qualidade e expectativa de vida da população (PIDDOCK, 2012, CRF-SP, 2011).

O que ficou conhecido como era de ouro da descoberta dos antimicrobianos, entre os anos 40 e começo dos anos 70, criou uma percepção equivocada de que doenças infecciosas já não representavam um grande problema de saúde. Assim, o foco das pesquisas de medicamentos mudou para doenças não-infecciosas, e a descoberta de novos antimicrobianos despencou (O'NEILL, 2016).

Paralelamente a isso, a resistência a antimicrobianos começou a aumentar, e hoje chega a níveis assustadores, como os 80% de resistência à oxacilina em cepas de *Staphylococcus aureus*, ou 50% de resistência a carbapenêmicos em cepas de *Klebsiella pneumoniae* encontradas em alguns estudos (WHO, 2014). Em 2007, micro-organismos multirresistentes foram responsáveis por 400.000 infecções e 25.000 mortes na Europa (BUSH, 2011) e se estima que em 2050 causarão 10 milhões de mortes por ano (O'NEILL, 2016).

O impacto financeiro dessas infecções também é enorme. Pacientes que apresentam infecções por micro-organismos multirresistentes frequentemente são colocados em isolamento nos hospitais para evitar a disseminação do micro-organismo para outros pacientes. Além disso, o tratamento exige medicações mais caras e que muitas vezes apresentam efeitos colaterais importantes, levando a um aumento no tempo de internação (MARMITT, 2015). Dessa forma, o tratamento, que já representa de 30 a 50% dos custos com medicamentos em hospitais (TOSCANO, 2015), se torna ainda mais oneroso. O'NEILL (2016) estima que se nada for feito, as perdas econômicas chegarão a U\$100 trilhões até 2050.

Embora a escalada da resistência esteja inegavelmente relacionada ao intenso uso de antimicrobianos pela humanidade, micro-organismos resistentes já existiam muito antes da descoberta da penicilina. O primeiro isolado da *National Collection of Type Cultures* (NCTC) do reino Unido é uma cepa de *Shigella flexnerii* isolada de um soldado na primeira guerra e estudos recentes demonstraram que era já resistente a penicilina e eritromicina (MATHER, 2014). A presença de genes de resistência a vários antimicrobianos em amostras obtidas na camada de Permafrost, na região do ártico, que estiveram congeladas por milhares de anos e modelos computacionais estimam que genes de resistência se originaram há milhões de anos (Perry, 2016).

Em seu relatório, encomendado pelo governo britânico, O'NEILL (2016) sugeriu algumas ações para combater a ascensão da multirresistência e suas graves consequências, entre as quais o estímulo à pesquisa de novos antimicrobianos. Entretanto, a compreensão de que o desenvolvimento de resistência é um mecanismo natural inevitável e acelerado pela forte pressão evolutiva imposta pelo uso de antimicrobianos, levou estudiosos a propor formas de controle de infecção que dificultem o desenvolvimento de resistência, como a utilização de vacinas (KENNEDY, 2017), terapia antimicrobiana combinada (REX CONSORTIUM, 2013) e interferência em mecanismos de virulência (ALLEN, 2014) bem como sua regulação e relação com biofilmes.

3.2 TERAPIA ANTIMICROBIANA COMBINADA

Terapia combinada consiste no uso de 2 ou mais fármacos simultaneamente para um tratamento. Pode ser usada com o intuito de diminuir as doses necessárias de um medicamento tóxico, como é o caso de alguns regimes de quimioterapia (DECKER, 2005), ou para evitar o surgimento de resistência, como por exemplo os tratamentos para HIV (RICHMAN, 2001) e tuberculose (MITCHISON, 2012). Porém, no atual contexto de alta prevalência de micro-organismos multirresistentes, a principal razão para essa escolha, é a superação da resistência a algum antimicrobiano. Essa abordagem já vem sendo usada com sucesso desde a introdução na clínica dos inibidores de β -lactamase, que permitem a utilização de antimicrobianos para os quais os micro-organismos apresentam resistência (WRIGHT, 2016).

A terapia antimicrobiana combinada pode ser dividida em 2 grupos: associação entre 2 ou mais antimicrobianos; e associação entre um antimicrobiano e um adjuvante, que são moléculas sem ação antibacteriana quando usadas sozinhas, mas que quando associados a um antimicrobiano, potencializam sua ação (WORTHINGTON, 2013).

Por sua vez, os adjuvantes podem ser de classe I, que inibem mecanismos de resistência do micro-organismo ou de classe II, que atuam aumentando a resposta imunológica do hospedeiro. Adjuvantes de classe I podem ser ainda subdivididos em classe IA e classe IB (WRIGHT, 2016).

Adjuvantes da classe IA atuam sobre mecanismo de resistência ativo, ou seja, específicos a algum antimicrobiano, como inibição de enzimas responsáveis pela sua inativação. A associação de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamase pertence à classe IA e é o único exemplo em uso clínico de associação de um antimicrobiano com um adjuvante (WRIGHT, 2016). Adjuvantes da classe IB atuam sobre um mecanismo de resistência passivo, capazes de conferir resistência a múltiplos fármacos (WRIGHT, 2016). Um exemplo desse mecanismo é ilustrado pelos estudos de EJIM et al. (2011), que notaram que o antidiarreico loperamida age diminuindo o componente elétrico da força motriz protônica. Como consequência, ocorre um aumento da diferença de pH através da membrana interna, o que acaba aumentando a permeabilidade da membrana a tetraciclinas.

Outro possível mecanismo para um adjuvante de classe II é a inibição de bombas de efluxo. Fenilalanina-arginil β -naftilamida (PA β N) é um inibidor de um amplo espectro de bombas de efluxo, e sua capacidade de aumentar a sensibilidade a antimicrobianos já foi demonstrada em várias espécies (LOMOVSKAYA, 2001). Posteriormente, foi demonstrado que é capaz de aumentar a susceptibilidade a antimicrobianos em cepas deficientes em bombas de efluxo, sugerindo que tenha ação também de aumentar a permeabilidade da membrana (LAMERS, 2013). Mecanismo similar já foi descrito para (-)- α -pineno em combinação com ciprofloxacino em cepas de *Campylobacter jejuni* (KOVAČ, 2015)).

Com base na experiência com antirretrovirais e no tratamento de *Mycobacterium* sp, tem sido proposto que a terapia combinada poderia dificultar o surgimento de resistência em bactérias gram-positivas e gram-negativas e isso foi demonstrado por LOUIE et al. (2010) que conseguiram suprimir o desenvolvimento de resistência em

P. aeruginosa com uma combinação sinérgica de meropenem e levofloxacino. Contudo, a associação com adjuvantes é considerada particularmente promissora, pois por não terem ação antimicrobiana direta, esses agentes exerceriam menor pressão evolutiva. De fato, combinação de PA β N com levofloxacino reduziu em mais de 4 ordens de magnitude a emergência de resistência em *P. aeruginosa* (LOMOVSKAYA, 2001).

A interação entre antimicrobianos e moléculas vegetais também tem sido muito estudada, com resultados promissores (LANGEVELD, 2014). Por exemplo, BARRETO et al.(2014) relataram que o extrato alcoólico de *Lippia origanoides* reduziu pelo menos 5 vezes a CIM de amicacina e 10 vezes a CIM de neomicina frente a uma cepa multirresistente de *Staphylococcus aureus*, e GUERRA et al (2012) demonstraram sinergismo entre os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Citrus limon* e amicacina frente a *Acinetobacter* sp.

3.3 BIOFILMES

Biofilmes são comunidades microbianas aderidas a uma superfície biológica ou não, e envoltas em uma matriz extracelular, cuja composição varia de acordo com as condições de crescimento e a(s) espécie(s) envolvida(s) (TOYOFUKU, 2016). Sua formação começa com a aproximação e ligação reversível do micro-organismo com uma superfície (O'TOOLE, 1998; CAIAZZA, 2004), que pode ou não levar a adesão irreversível e a uma série de mudanças fenotípicas como a síntese dos componentes da matriz, resultando no estabelecimento do biofilme (PARAJE, 2011). A partir daí o biofilme cresce através da multiplicação das células já presentes nele e da adesão de outras células planctônicas. Por fim, algumas células escapam da matriz e colonizam outros locais, formando novos biofilmes (PAMP, 2009) (Figura 1).

Figura 1: Formação de biofilme

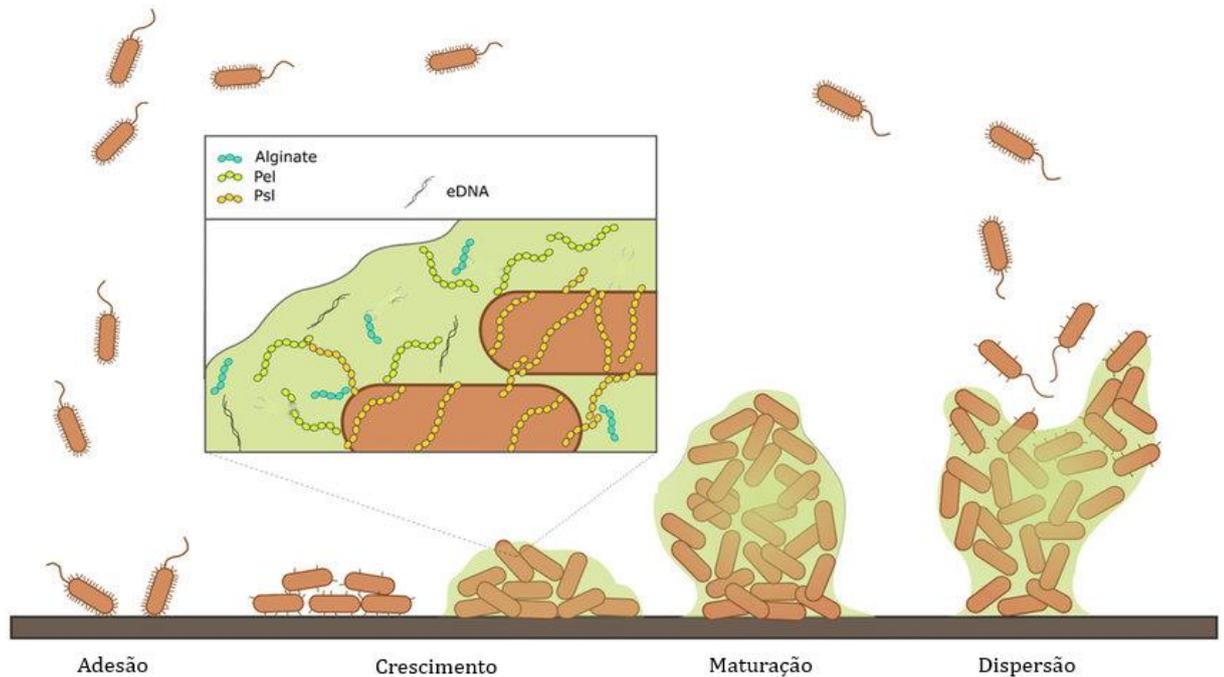


Figura 1: Formação de biofilme. Células planctônicas aderem reversivelmente a uma superfície. À medida que proliferam, produzem componentes da matriz extracelular enquanto motilidade e outros fatores de virulência são inibidos. Por fim, algumas células se desprendem do biofilme e voltam a forma planctônica. Fonte: Adaptado de MAUNDERS (2017)

O primeiro passo para a formação de biofilme é a aproximação do micro-organismo à superfície para posterior adesão e é nessa etapa que a motilidade tem um papel importante. Para conseguir superar as forças de repulsão e se aproximar da superfície, micro-organismos móveis usam flagelos. Porém, após essa aproximação inicial, que ocorre por um tempo muito curto, o movimento precisa ser inibido para que outras moléculas de adesão possam se ligar a superfície e iniciar a adesão permanente (RÖMLING, 2013).

Ainda não está claro como células bacterianas percebem que chegaram a uma superfície sólida, mas uma teoria sugere que a resistência ao movimento flagelar imposta por superfícies mais duras ativa genes reguladores (KAZMIERCZAK, 2015). Esses genes causam diminuição de velocidade de rotação ou na frequência de reversão da direção de rotação do flagelo, permitindo um maior tempo de contato entre a bactéria e a superfície (CAIAZZA, 2007). Esses mesmos genes também estão envolvidos na ativação da síntese do polissacarídeo *Pel* e diminuição da síntese de surfactantes, que é necessária para movimento do tipo *swarming*, em *P. aeruginosa*

(CAIAZZA, 2007). Dessa forma, *swarming* e formação de biofilme são inversamente regulados através da regulação de movimentos flagelares.

Outra organela importante nos estágios iniciais da formação de biofilme é o pilus tipo IV. KOWLES et al. (2010) demonstraram que a ligação a uma superfície ativa a produção de pili tipo IV. Esse tipo de pilus é diferente de outros pili e fímbrias por apresentar capacidade de extensão e contração e através desse movimento pode puxar a célula em direção a superfície e permitir a ligação de outras adesinas. Essa ligação é irreversível e induz a secreção de polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular, que formarão a matriz pela qual as células microbianas estão envoltas (BURROWS, 2010).

O biofilme maduro geralmente é composto de vários aglomerados de células, denominados de macrocolônias, intercalados com canais que permitem a passagem de água e outros nutrientes e metabólitos, ambos em envoltos em uma matriz, que compõe cerca de 80% da massa do biofilme. Podem apresentar uma variedade de estruturas tridimensionais, que variam de acordo com a espécie e as condições do meio em que foi formado. Por exemplo, biofilmes de *P. aeruginosa* formados em condições aeróbicas comumente apresentam macrocolônias com forma de cogumelo, intercaladas com canais de água, e quando formados sob anaerobiose apresentam uma estrutura semelhante a uma rede e com células alongadas (YAWATA, 2008). Essa estrutura permite a criação de diferentes microambientes devido a diferença de concentração de substratos em diferentes regiões (WERNER, 2004), o que leva a uma grande variabilidade fenotípica nas células que integram o biofilme (VLAMAKIS, 2008).

Algumas células podem se desprender de um biofilme maduro, voltar ao estado planctônico e colonizar outras áreas. Esse processo pode acontecer tanto de forma passiva, devido a erosão do biofilme por fatores mecânicos, quanto de forma ativa, que depende da degradação da matriz ou de algumas células dentro do biofilme voltarem a adquirir motilidade e se desprenderem (TOYOFUKU, 2016).

Essa forma de organização multicelular confere uma maior resistência a antimicrobianos, que chega a ser 1000 vezes maior que em células planctônicas (NICKEL, 1985). A susceptibilidade reduzida a antimicrobianos varia de acordo com o agente usado, as condições de crescimento, estágio de maturação do biofilme, da espécie microbiana e até mesmo com diferentes cepas de uma mesma espécie, e é amplamente aceita como sendo multifatorial, envolvendo fatores como reduzido

acesso dos fármacos aos micro-organismos, restrições nutricionais e maior variabilidade genética e fenotípica (HALL, 2017).

Um bom exemplo dessa variabilidade é *Psl*, um polissacarídeo composto de D-glicose, D-manose e L-ramnose, que é parte importante da matriz extracelular produzida por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PA01, mas não é sintetizada pela cepa PA14. A presença de *Psl* confere resistência aumentada à colistina, polimixina B, tobramicina e ciprofloxacina nos estágios iniciais da formação de biofilme, mas não no biofilme maduro (BILLINGS, 2013). Essa ação aparentemente é mediada por uma interação do polissacarídeo com esses antimicrobianos, de uma maneira similar a que ocorre com alginato (HATCH, 1998) e outros glicanos periplasmáticos (SADOVSKAYA, 2010).

Outros mecanismos que diminuem o acesso de antimicrobiano às células são enzimas extracelulares, como por exemplo uma β -lactamase encontrada em biofilmes de *K. pneumoniae* (ANDERL, 2000) e a presença de DNA extracelular (eDNA). eDNA está presente no biofilme da maioria, se não de todas, as espécies bacterianas, e conferem resistência de várias formas. Por ser aniônico, eDNA pode se ligar a fármacos catiônicos, impedindo seu acesso as células. Também podem quelar íons Mg^{++} (MULCAHY, 2008) e acidificar o meio (WILTON, 2016), e ambos sinais ativam os sistemas de regulação gênica PhoPQ e PmrAB que, através da indução da adição de aminoarabinose à porção lipídica do lipopolissacarídeo e da síntese de espermidina, leva a maior resistência a aminoglicosídeos e peptídeos catiônicos (WILTON, 2016, MULCAHY, 2008).

Além disso, eDNA também foi relacionado a uma maior transmissão horizontal de genes de resistência em *C. jejuni* (BAE, 2014). Esse aumento da transferência também pode ocorrer através de plasmídeos. Foi sugerido que a proximidade entre as células facilita a conjugação e em um estudo com *S. aureus*, SAVAGE et al. (2013) relataram uma frequência mais de 10.000 vezes maior de transferência de plasmídeos conferindo multirresistência em biofilmes que em células planctônicas.

Outra fonte de variabilidade genética em biofilmes é a maior taxa de mutação, causada por um aumento de estresse oxidativo endógeno (BOLES, 2008). Paradoxalmente, a diminuição do estresse oxidativo também pode diminuir a susceptibilidade de biofilmes. Devido ao gradiente de difusão, camadas mais profundas do biofilme frequentemente enfrentam carência de nutrientes, o que pode levar à ativação da resposta estringente. Resposta estringente é um mecanismo

altamente conservado em bactérias, na qual a privação de aminoácidos induz a síntese de guanosina tetrafosfato (ppGpp) e guanosina pentafofosfato (pppGpp), mensageiros que através de interação com a RNA polimerase leva a uma série de alterações na expressão gênica, incluindo a inibição da síntese de proteínas e ativação de rotas de síntese de aminoácidos. Também causa um aumento da expressão de enzimas como superóxido dismutase e catalase, e previne a acumulação das moléculas pró-oxidante 4-hidroxi-a-alquinolinas. Esse conjunto de ações ajuda proteger as bactérias do estresse oxidativo que é parte do mecanismo de ação de vários antimicrobianos (NGUYEN, 2011).

Adicionalmente, a baixa disponibilidade de oxigênio nas áreas mais profundas do biofilme faz com que muitas células tenham reduzida atividade metabólica, o que diminui a ação de antimicrobianos e leva a formação de *persister cells*, células que estão em um estado de latência e tem baixa susceptibilidade a antimicrobianos (BROOUN, 2000).

Diante de tamanha variabilidade nos mecanismos de resistência de biofilmes maduros, impõe-se a busca por formas de impedir a formação de biofilmes, dentre as quais se destacam a inibição da motilidade e adesão, e muitos esforços têm sido feitos para elucidar esses processos.

3.4 MOTILIDADE

Motilidade é uma característica comum a muitos micro-organismos e tem grande importância na capacidade de subsistência desses organismos, pois permite que as células se movam na direção de nutrientes ou se afastem de ambientes hostis. Clinicamente, motilidade é um importante fator de virulência, permitindo a disseminação do micro-organismo para locais distantes a partir de um foco de infecção (DRAKE, 1988). Além disso, já foi relatado o aumento de resistência a antimicrobianos durante movimentos bacterianos coletivos (KIM, 2003; LAI, 2009; HOL, 2016).

Existem vários tipos de motilidade bacteriana: *sliding* é uma forma passiva de movimento, mediada pelo crescimento bacteriano, que força as células a se afastarem da origem; *gliding* é um termo genérico que se aplica a qualquer forma de movimento ativo em uma superfície que não envolva nem pili nem flagelo. *Swimming* e *swarming* são ambas mediadas por flagelos e *twitching* é um movimento através de uma

superfície mediada por pili tipo IV (KEARNS, 2010). *P. aeruginosa* apresenta motilidades dos tipos *twitching*, *swimming* e *swarming*, e por isso é o principal modelo bacteriano para estudo de motilidade.

Figura 2: Tipos de motilidade bacteriana

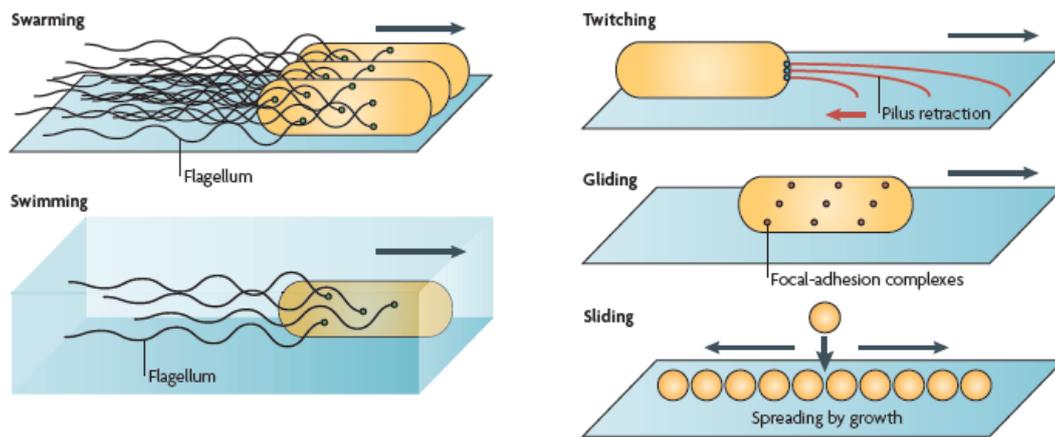


Figura 2: Tipos de motilidade bacteriana. Fonte: Adaptado de KEARNS (2010)

Swimming é um movimento unicelular que ocorre em meio líquido. Além de permitir a colonização de locais distantes, está associado a formação de biofilmes, pois o flagelo utilizado na movimentação serve também de molécula de adesão a superfícies, que é um passo importante na formação de biofilmes (O'TOOLE, 1998). Adicionalmente, HOL et al (2016), demonstraram que uma população de *Escherichia coli* foi capaz de colonizar uma área com concentração de canamicina 50 vezes superior a CIM através de migração por *swimming* através de um gradiente de concentração. Essa maior tolerância só ocorreu após uma alta densidade populacional ser atingida, e a CIM dessas cepas voltou aos níveis basais quando reisoladas, mostrando que a resistência não era devida a mutações.

Swarming é caracterizado por um movimento rápido e coordenado de um grupo de células em uma superfície semissólida, equivalente a concentrações de ágar de aproximadamente 0,5%. Resistência aumentada a vários antimicrobianos relacionada a *swarming*, já foi relatada em várias espécies (KIM, 2003; LAI, 2009), e assim como no experimento de HOL et (2016), foram demonstradas ser independentes de mutações. Um possível mecanismo para essa maior tolerância a antimicrobianos durante *swarming* é a indução da expressão de genes relacionados a resistência para

evitar a autotoxicidade devido a secreção de surfactantes, que possuem atividade antimicrobiana (YANG, 2017).

A secreção de surfactantes é uma das mudanças fenotípicas que são necessárias para *swarming*. Outras mudanças geralmente envolvem alongamento celular e expressão aumentada de flagelos (KEARNS, 2010). No caso de *P. aeruginosa* consistem na expressão de um motor flagelar adicional além daquele necessário para *swimming* (TOUTAIN, 2005) e a síntese e secreção de ramnolipídios (KÖHLER, 2000), que consiste de uma mistura de mono e di-ramnolipídios e seus precursores, ácidos 3-(3-hidroxi)alcanoíloxi) alcanóicos (HAAs). Glicose-1-P, um dos precursores na síntese de ramnolipídios, é também necessário para a síntese dos polissacarídeos Pel e Psl, e ativação de uma dessas vias indiretamente inibe a outra através da competição por um substrato (WANG, 2014), consistindo em uma importante forma de regulação entre a formação de biofilme ou continuação da forma de vida planctônica (WANG, 2014).

A participação de pili tipo IV em *swarming* é controversa. Alguns estudos apontam que cepas deficientes em pili tipo IV são incapazes de *swarming* (KÖLER, 2000; LEECH, 2006), porém evidências mais recentes sugerem que pili tipo IV não só são desnecessários, como interferem negativamente (YANG, 2017).

Pili tipo IV, além do papel já mencionado na adesão, permite também o terceiro tipo de motilidade de *P. aeruginosa*, *twitching*. Nesse movimento, que ocorre em superfícies com consistência equivalente a 1% de ágar, a capacidade de extensão e retração do pilus é usada pela célula para explorar a superfície a qual se aderiu (BURROWS, 2012). Essa movimentação desempenha importante papel na definição da estrutura do biofilme, com cepas capazes de *twitching* colonizando outras áreas e expandindo o biofilme após atingir uma certa densidade, enquanto cepas incapazes de *twitching*, formam biofilmes mais espessos e mais localizados na área de fixação inicial (KLAUSEN, 2003). Outro estudo, de ZHAO et al. (2013) demonstra que cepas de *P. aeruginosa*, à medida que exploram uma superfície através de *twitching* depositam Psl, que estimulam o movimento de outras células, em um mecanismo de *feedback* positivo, que leva a formação de microcolônias nos locais onde há maior depósito de Psl.

Tanto a presença deste tipo de pilus quanto a motilidade *twitching* estão relacionados com uma maior virulência, e nem sempre se pode distinguir seus papéis, já que muitos estudos são feitos com cepas deficientes em pili (KLAUSEN, 2003;

BURROWS, 2012). Contudo, alguns estudos usando cepas com pili incapazes de contração e retração demonstraram o papel de *twitching* como fator de virulência. Por exemplo, ZOFAGHAR et al. (2003), demonstraram que a deficiência de *twitching* reduz a capacidade de *P. aeruginosa* de colonizar córneas de camundongos, independentemente de ser deficiente em pili ou não.

3.5 REGULAÇÃO GÊNICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *P. aeruginosa*

A síntese de fatores de virulência demanda um alto consumo de energia e sua expressão seria uma desvantagem em situações onde não são necessários (HEILMAN, 2015). Dessa forma, sua expressão é controlada por uma complexa rede de reguladores, dentre os quais se destacam *quorum sensing* (QS) (SKARIYACHAN, 2018) e c-di-gmp (RÖMLING, 2013).

Quorum sensing system (QSS) é um mecanismo regulatório que permite que micro-organismos reconheçam sua densidade populacional através de pequenas moléculas difusíveis que são produzidas e secretadas no meio. De maneira simplificada, o micro-organismo produz um receptor e um ligante (AI, do inglês *autoinducer*), que é secretado. Após atingir uma certa densidade celular, a concentração do AI no meio atinge os níveis necessários para se ligar ao receptor, que então age como um fator de transcrição (FUQUA, 1994), inibindo ou ativando múltiplos genes que por sua vez regulam funções como produção de enzimas, polissacarídeos, sideróforos e motilidade (DEFOIRDT, 2018).

O primeiro QSS a ser descoberto foi o sistema LuxI/LuxR, que regula a bioluminescência na bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Desde então, análogos desse sistema foram encontrados em vários outros micro-organismos, cada um com seus AIs específicos, geralmente oligopeptídeos em bactérias gram-positivas e acil homoserina lactonas (AHLs) em bactérias gram-negativas (KALIA, 2018).

Assim como ocorre com biofilme e motilidade, *P. aeruginosa* se tornou o principal modelo para estudo de QS, e nessa bactéria já foram identificados 4 sistemas diferentes (DEFOIRDT, 2018). Dois deles, LasI/LasR e RhII/RhIR são análogos do sistema LuxI/R e seus AIs são n-(3-oxo-dodecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL) e N-butanoil-L-homoserina lactona (BHL), respectivamente. Os outros dois são conhecidos pelos nomes de PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) e IQS (*Integrated quorum-sensing signal*). Existe ainda um quinto receptor QscR, que não possui um AI

próprio, mas que interage com OdDHL e inibe a expressão de vários genes regulados por RhIR e LasR. Esse último, após ligação com OdDHL é capaz de ativar também os outros 3 sistemas. Além disso, tanto IQS quanto PQS podem ativar o sistema Rhl, que por sua vez, inibe o sistema PQS (TURKINA, 2018). Um modelo dessa complexa rede regulatória pode ser visto na figura 1.

Figura 3 – Sistemas *quorum sensing* em *P. aeruginosa*

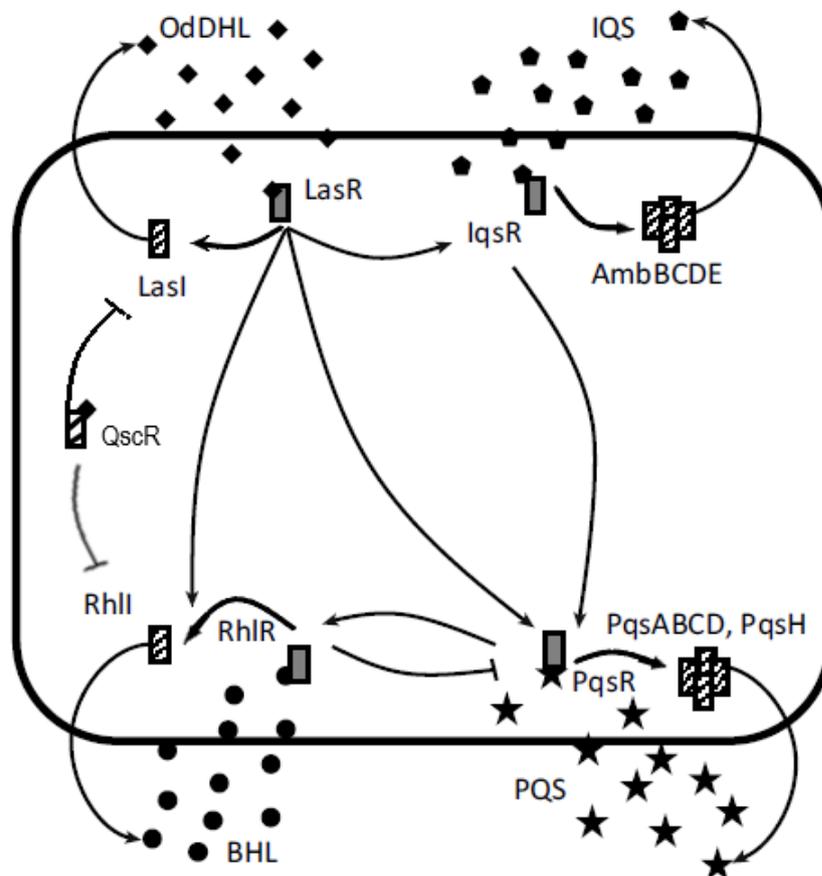


Figura 3 – Sistemas *quorum sensing* em *P. aeruginosa*. Os autoindutores OdDHL, BHL, IQS e PQS são produzidos por LasI, RhII, AmbBCDE e PqsABCD respectivamente e uma vez ligados a seus receptores (LasR, RhIR, IqsR e PqsR, respectivamente) atuam na regulação de diversos genes. Adicionalmente, o complexo LasR/OdDHL ativa os outros 3 sistemas *quorum sensing*, o sistema PQS ativado aumenta a expressão do sistema Rhl, e este por sua vez, inibe a expressão do sistema PQS. Além disso, o sistema IQS também é capaz de ativar o sistema PQS. Por fim, o receptor QscR, uma vez ligado a OdDHL reprime tanto Las como Rhl. Fonte: Adaptado de DEFOIRDT (2018)

Esses sistemas podem atuar juntos ou separadamente para a regulação de inúmeros fatores de virulência. Por exemplo, a produção de piocianina é regulada por OdDHL, BHL e PQS, a síntese de ramnolipídeos é controlada por BHL e PQS e a síntese de polissacarídeos por OdDHL e BHL (DEFOIRDT, 2018).

Chromobacterium violaceum é um bacilo gram-negativo que produz um pigmento com ação antimicrobiana chamado violaceína sob a regulação de um QSS análogo ao sistema LuxI/LuxR. A produção de violaceína é facilmente detectada a olho nu devido a sua cor violeta característica e pode ser quantificada por espectrofotometria. Como esse sistema é capaz de responder a uma variedade de AHL, a inibição da produção de violaceína se tornou rapidamente um teste de triagem para inibidores de QS (MOROHOSHI, 2008).

Outra importante forma de regulação é através de diguanilato cíclico (c-di-GMP). Inicialmente descrito como ativador da síntese de celulose, foi posteriormente reconhecido como um segundo mensageiro envolvido na regulação da motilidade, formação de biofilme, virulência, ciclo celular e outros processos em uma ampla gama de bactérias (RÖMLING, 2013).

A transição da forma de vida planctônica para sésil é um importante papel de c-di-GMP (SIMM, 2004) e é mediada através da inibição da motilidade e indução da síntese de polissacarídeos. Altos níveis de c-di-GMP são capazes de ativar a síntese de Pel através da ligação com o gene *FleQ*. Esse gene também participa da regulação da síntese de flagelos, porém não está claro se essa regulação também é mediada por c-di-GMP. Contudo, outro mecanismo de regulação flagelar é mediado por c-di-GMP: a regulação da frequência de reversões do sentido de rotação do flagelo (FANG, 2010). A diminuição dessa frequência devido a altos níveis de c-di-GMP favorece um tipo de *swimming* mais “suave”, sem muitas mudanças de direção, enquanto o aumento da frequência, induzida por baixos níveis de c-di-GMP, leva a mais mudanças de direção e maior sensibilidade a estímulos quimiotáticos. PAUL et al. (2010), por sua vez demonstraram que altos níveis de c-di-GMP reduzem a velocidade de rotação do flagelo. Juntos, esses dois mecanismos favorecem a formação de biofilme e inibem a motilidade

Além disso, foi proposto que c-di-GMP regula a extensão/contração de pili tipo IV. A extensão depende de polimerização de pili que é mediada por c-di-GMP, enquanto a contração depende de despolimerização, inibida por c-di-GMP. Dessa forma, a motilidade mediada por pili tipo IV depende da rápida flutuação dos níveis de c-di-GMP, e concentrações elevadas desse mensageiro inibem a motilidade por *twitching* (RÖMLING, 2013).

3.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são aqueles não essenciais à manutenção da vida da planta. Geralmente tem função de defesa contra herbívoros, insetos e micro-organismos patogênicos, atração de polinizadores e comunicação entre plantas (BASSOLÉ, 2012, MAFFEI, 2010). Estima-se que entre os cerca de 100.000 metabólitos secundários conhecidos, mais de 3.000 são óleos essenciais (BASSOLÉ, 2012).

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, compostas principalmente de terpenos e terpenoides e derivados voláteis de ácidos graxos (RAI, KON, 2013). Podem ser sintetizados em qualquer parte da planta e a sua extração pode ser feita por hidrodestilação, destilação por arraste de vapor e extração com fluido supercrítico, entre outros métodos (BASSOLÉ, 2012, RAI, KON, 2013).

Um grande número de estudos com óleos essenciais demonstrou atividade *in vitro* contra bactérias (EDWARDS-JONES, 2004, WARNKE, 2013, TURGIS, 2009, BOUHDID, 2010), fungos (DUARTE, 2005), protozoários (BALDISSERA, 2013), vírus (ROY ET AL., 2015), helmintos (GRANDO, 2016) e insetos (KLAUCK, 2015, PAZINATO, 2014, VOLPATO, 2016), bem como contra biofilme produzido por alguns desses micro-organismos (COMIN, 2016) e efeito sinérgico entre óleos essenciais e antimicrobianos (VAN VUUREN, 2009) ou nanopartículas (SCANDORIEIRO, 2016). Além disso, alguns compostos isolados desses óleos também demonstram atividade antimicrobiana *in vitro* (DE MIERI, 2015) e pelo menos um composto, a artemisinina, já é aprovado para uso clínico no tratamento de malária (RAI, KON, 2013).

Estudos sobre o mecanismo de ação dos óleos essenciais demonstram que eles apresentam mecanismos diversos, como extravasamento de K⁺ (DE SOUZA, 2010, BOUHDID, 2010), ATP (TURGIS, 2009) e outros materiais celulares (DE SOUZA, 2010, TURGIS, 2009), redução do pH intracelular (TURGIS, 2009), alterações na morfologia celular (DE SOUZA, 2010, DERAKHSHAN, 2008), redução da atividade da urease (DERAKHSHAN, 2008) e inibição da atividade respiratória (BOUHDID, 2010). Todas essas ações estão relacionadas à alteração na permeabilidade da membrana plasmática causada pelos óleos essenciais. Além disso, efeitos sobre fatores de virulência também foram relatados, como a inibição da produção de enterotoxinas (DE SOUZA, 2010) e da cápsula (DERAKHSHAN, 2008) e inibição da sinalização *quorum-sensing* (SZABÓ, 2010).

3.7 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *C. nobile* (L.) All.

A camomila romana é uma planta perene de origem mediterrânea e amplamente distribuída na Europa, norte da África, Australásia e Américas (AL SNAFI, 2016). Cresce em regiões temperadas em terrenos férteis e leves e com boa exposição ao sol (CUNHA et al., 2003). Foi originalmente descrita por Linnaeus em 1753, que a denominou *Antehmis nobilis* e posteriormente reclassificada por Allioni como *Chamaemelum nobile*, que é a nomenclatura atualmente preferida (THE PLANT LIST, 2019).

É uma planta vivaz, rasteira, que mede de 35 a 40 cm de altura com caule coberto com sulcos e ramagens abundantes e numerosas raízes adventícias, que lhe dão uma aparência pubescente verde acinzentada. As folhas são alternas com recortes nas bordas, lanceoladas, muito estreitas com aspecto pubescente-aveludado. As flores são amarelas, fortemente aromáticas, reunidas em capítulos ligulados, longo-pedunculados solitários no ápice dos ramos e com disco branco (CORRÊA, 1926).

A planta é composta por cerca de 80% de água, 6-7% de minerais e possui uma variedade de metabólitos secundários, como catequinas, cumarinas, flavonoides, fenóis e um óleo volátil. Este constitui de 0,4 a 1,75% volume da planta e tem uma composição bastante variável, mas que é geralmente composta predominantemente de ésteres dos ácidos tíglico e angélico, e menores quantidades de terpenos como eucaliptol, trans-pinocarveol, pinocarvona e α -pineno, por exemplo (AL SNAFI, 2016).

Figura 4 - *Chamaemelum nobile*



Figura 4 - *Chamaemelum nobile* Fonte: Jardim Botânico da UTAD, disponível em https://jb.utad.pt/multimedia/Chamaemelum_nobile#imagem-18649

Na medicina popular, suas partes aéreas são consideradas carminativas, estimulantes, digestivas, diuréticas, diaforéticas, antiespasmódicas e antissépticas, sendo usadas desde tempos remotos no combate à febre tifoide, febre intermitente, crises nervosas e dismenorreia (CORRÊA, 1926; DUKE, 1987)). Extratos são usados em xampus, tinturas de cabelo, colutórios, protetores solares e como aromatizantes na indústria alimentícia e de bebidas. O óleo essencial é ocasionalmente usado em bebidas, perfumes e na indústria farmacêutica em unguentos e loções antissépticas (DUKE, 1987).

O extrato apresenta ações hipoglicemiantes (EDDOUKS, 2005), antibacterianas (KAZEMIAN, 2015; AL MARBY, 2016; KAZEMIAN, 2018), anti-helmíntica (AL MARBY, 2016), antiprotozoário (DE MIERI, 2017) e apoptóticas em linhagens de células cancerígenas (KANDELOUS, 2016). Já o seu óleo essencial apresenta atividades antifúngicas, tanto contra filamentosos (EBANI, 2017; SHARIFZADEH, 2016) como contra fungos leveduriformes (BAIL, 2009; DUARTE, 2005; EBANI, 2017), antibacterianas (BAIL, 2009) e antioxidantes (SHARIFZADEH, 2016).

Além disso, algumas substâncias comumente encontradas no óleo já foram caracterizadas como antimicrobianas. Por exemplo, α -pineno que apresenta ação contra *Staphylococcus* sp, (SILVA, 2012; DE SOUZA EDUARDO, 2018), *E. coli* (DE SOUZA, 2018) *Candida* sp (RIVERA-YAÑEZ, 2017; SILVA, 2017), e *Leishmania amazonensis* (DA FRANCA RODRIGUES, 2015) e ação moduladora de resistência a antimicrobianos em *C. jejuni* (KOVAČ, 2015); Já o β -pineno apresenta ação frente aos vírus herpes (ASTANI, 2014), *Candida* sp e *S. aureus* (SILVA, 2012). Também já foi demonstrada ação antibacteriana (ALDOGHAIM, 2018) para o eucaliptol e alguns dos ésteres comumente presentes no óleo (BAIL, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO

O óleo essencial de *C. nobile* foi adquirido da empresa Ferquima, a qual informa que foi obtido por destilação a vapor de flores provenientes da Itália e que os principais componentes são angelato de butila, angelato de isoamila, α -pineno e β -pineno.

A caracterização do óleo foi realizada no Núcleo de Tecnologia de Alimentos (NTA), do Departamento de tecnologia e Ciência do Alimento (DTCA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID). O óleo foi diluído em uma razão de 1:10 em n-hexano e injetado no sistema cromatográfico a uma temperatura de 250 °C no modo *split* de razão 1:25. Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida EquityTM- 5 (60 m \times 0.20 mm \times 0.20 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 40 °C e mantida durante 0,5 min. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 4 °C min⁻¹ até 80 °C, 10 °C min⁻¹ até 160 °C, 1 °C min⁻¹ até 180 °C e 20 °C min⁻¹ até 230 °C e mantida em condições isotérmicas durante 2 min. A temperatura do detector foi mantida a 250 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL).

A análise qualitativa dos compostos foi efetuada por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 Plus acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para estas análises, foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de varredura de massas 35-500 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) e por comparação dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica. A quantidade percentual relativa de cada composto identificado foi obtida a partir da área do pico obtida no FID.

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana por Disco-Difusão

Todos os testes microbiológicos foram feitos no Laboratório de Microbiologia Oral (LAPEMICRO), no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Como forma de triagem preliminar, o óleo foi testado contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras do gênero *Candida* pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer (CLSI, 2010). Colônias de cada micro-organismo a ser testado foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) até conseguir um inóculo com turvação 0,5 da escala de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), que foi então semeado, com o auxílio de um *swab* estéril em toda a superfície de uma placa contendo ágar Müller-Hinton. Discos de papel impregnados com 10 µL de óleo essencial foram colocados sobre a placa e esta foi incubada por 24 horas a 37°C. Após a incubação, os halos de inibição de crescimento ao redor dos discos foram medidos e registrados (em mm).

4.2.2 Determinação da CIM e CBM para bactérias

Os micro-organismos que apresentaram zona de inibição (halo aparente maior que 6 mm de diâmetro) pelo método de disco-difusão foram então testados pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2013). Utilizando-se microplacas de 96 poços, foram preparadas diluições seriadas a partir do óleo essencial puro em caldo Müller-Hinton, com concentrações variando entre 0,44 mg/mL e 455 mg/mL, às quais foram acrescentados 10 µL de inóculo 0,5 de McFarland do micro-organismo a ser testado. Após incubação por 24 h a 37 °C, foi realizada a leitura da placa, usando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio como indicador de crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), alíquotas retiradas de todos os poços com concentrações iguais ou maiores à CIM foram repicadas para placas contendo ágar Müller-Hinton e incubadas por 24 h a 37°C. Foi considerada como CBM a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano (RUKAYADI, 2010).

4.2.3 Determinação da CIM e CBM para leveduras

A determinação da CIM para leveduras foi realizada de acordo com o documento M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Foi preparado um inóculo com turvação 0,5 da escala de McFarland, e este foi diluído a 1:1000 em meio RPMI. Posteriormente este inóculo foi adicionado aos poços de uma microplaca de 96 poços contendo diluições seriadas do óleo essencial de *C. nobile* nas mesmas concentrações usadas nos testes com bactérias e incubada a 35 °C. A CIM foi a menor concentração do óleo na qual não houve crescimento fúngico após 26 horas de incubação. Para a determinação da CFM o procedimento foi o mesmo realizado para bactérias.

4.2.4 Avaliação de combinação com antimicrobianos

A interação entre o óleo essencial e fármacos antimicrobianos foi avaliada usando a cepa *P. aeruginosa* PA01 e o antimicrobiano amicacina. As concentrações usadas variaram de 0,25 µg/mL a 16 µg/mL para amicacina e 0,222 mg/mL a 227,5 mg/mL para o óleo. Pipetou-se 50 µL de caldo Mueller Hinton em todos os poços da placa e 50 µL de óleo em todos os poços da coluna 2 e diluições seriadas foram feitas a partir daí. Para a amicacina, foram preparadas concentrações 2 vezes maiores que a necessária de cada diluição e 50 µL de cada diluição foram pipetados nas linhas B a H, conforme descrito por Den Hollander et al (1998) (Figura 5). Dessa forma a linha A contém apenas óleo essencial e a coluna 1 contém apenas amicacina e a CIM da amicacina na presença de concentrações subinibitórias do óleo pôde ser comparada com a CIM da amicacina isoladamente.

Figura 5 – Placa de checkerboard

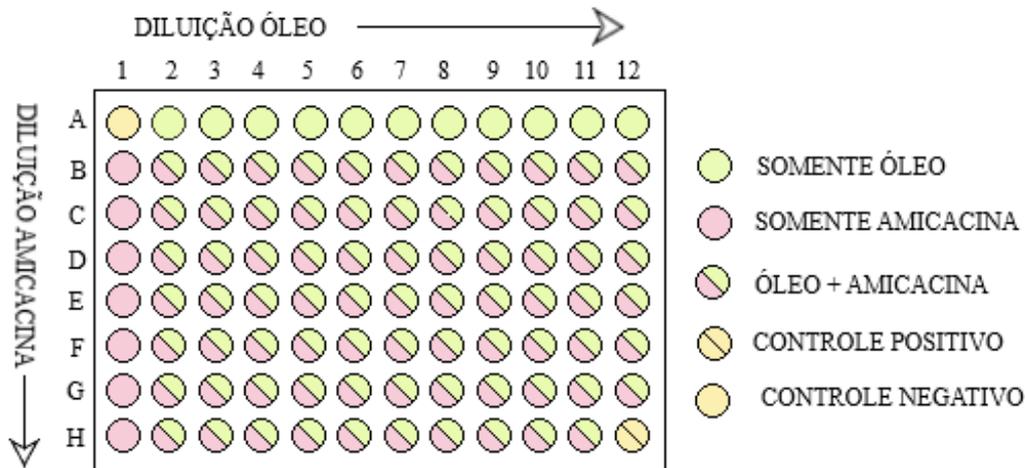


Figura 5 – Placa de checkerboard. Fonte: autor

4.3 ENSAIOS DE INTERFERÊNCIA BACTERIANA

4.3.1 Inibição da formação de biofilme

Para a avaliação da formação de biofilme, foi usada a cepa *P. aeruginosa* PA01. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, 100 μ L do óleo essencial de *C. nobile* nas concentrações equivalentes ao CIM (455 mg/mL), $\frac{1}{2}$ CIM (227,5 mg/mL) e $\frac{1}{4}$ CIM (113,7 mg/mL) foram adicionados a 100 μ L de caldo Mueller Hinton. Em seguida foram adicionados 10 μ L de um inóculo 0,5 de McFarland de uma cultura de *P. aeruginosa* com 24 horas de crescimento. Após 24 horas de incubação a 37 °C, a placa foi lavada em água por 3 vezes para remover as colônias planctônicas e o biofilme aderido às paredes dos poços foi corado com cristal violeta 1% por 15 minutos. O cristal violeta foi removido por lavagem em água 3 vezes, e após secagem adicionou-se 200 μ L de etanol 95% e realizou-se a leitura da absorbância em 580 nm.

4.3.2 Inibição da produção de violaceína

Para avaliar a capacidade de indução da produção de violaceína, foi utilizada uma modificação da metodologia descrita por BLOSSER (2000), na qual a violaceína é extraída de culturas de *C. violaceum* e dosada por espectrofotometria após incubação com o óleo essencial em concentrações subinibitórias. Primeiramente a CIM do óleo

frente à cepa foi determinada como sendo 28,4 mg/mL. Concentrações subinibitórias correspondente a $\frac{1}{2}$ CIM (14,2 mg/mL) e $\frac{1}{4}$ CIM (7,1 mg/mL) foram adicionadas a um inóculo 0,5 McFarland em meio BHI. Após incubação por 24 horas a 30°C, os tubos foram centrifugados a 1300 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 250 μ L de dodecil sulfato de sódio 10% e 150 μ L de BHI e, após a lise bacteriana, foram acrescentados 600 μ L de butanol e o tubo foi novamente centrifugado. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância lida em espectrofotômetro em 540 nm.

4.3.3 Inibição da motilidade bacteriana

Usou-se a cepa *P. aeruginosa* PA01 para avaliação da capacidade de inibição das motilidades dos tipos *swimming*, *swarming* e *twitching*. Meios apropriados para a avaliação de cada um dos tipos de motilidade foram preparados conforme Quadro 1 abaixo (BONEZ, 2017). Um inóculo 0,5 de McFarland foi semeado por picada em placas com e sem adição de óleo nas concentrações $\frac{1}{2}$ CIM (227,5 mg/mL) e $\frac{1}{4}$ CIM (113,7 mg/mL) e após incubação a 37 °C por 48 horas o crescimento foi avaliado através da leitura do diâmetro da colônia.

Quadro 1 – Formulação dos meios para avaliação de motilidade

Ingredientes	Swimming	Swarming	Twitching
Triptona	1 g	-	1 g
NaCl	0,5 g	-	1 g
Agarose	0,3 g	0,5 g	1 g
Caldo nutriente	-	0,8 g	-
Glicose	-	0,5 g	-
Extrato de levedura	-	-	0,5 g
Água	100 mL	100 mL	100 mL

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO

A caracterização do óleo foi feita por meio de GC-FID e GC-MS. Apesar de alguns picos com baixa resolução na GC-FID (Figura 6), foi possível identificar e quantificar 31 componentes, que somam 90% do óleo (Quadro 2). Os componentes majoritários foram α -pineno, β -pineno, angelato de isobutila, eucaliptol e angelato de 2-metilbutila com 22%, 21%, 12%, 10% e 7% respectivamente (estruturas químicas na figura 7), o que está de acordo com os dados fornecidos pelo fornecedor.

Contudo, quando comparados com os dados obtidos na literatura, os achados do presente estudo diferem consideravelmente. Embora os componentes do óleo sejam aproximadamente os mesmos, com grande variedade de ésteres dos ácidos angélico e tíglico, as concentrações são bastante diferentes. Na maior parte dos estudos encontrados, o principal componente do óleo é angelato de isobutila (ANTONELLI, 1998; FARKAS, 2003; OMIDBAIGI, 2004; BAIL, 2009; EBANI, 2017), com concentrações que variam de 21 a 38%, com a exceção de um estudo, em que outros ésteres do ácido angélico foram os mais abundantes em duas amostras e eucaliptol em outra (TRADENT, 2017) enquanto na amostra analisada por este estudo, ele corresponde a apenas 12% do óleo, sendo o terceiro mais abundante. Em contraste, α -pineno e β -pineno, que na amostra por nós analisada somam 43% do total, não passam de 2% nos demais estudos, e em algumas amostras, sequer foram encontrados. Eucaliptol, outro componente majoritário de nossa amostra também foi encontrado em pequenas quantidades ou não foi encontrado na maioria dos demais estudos (ANTONELLI, 1998; BAIL, 2009; EBANI, 2017; FARKAS, 2003; OMIDBAIGI, 2004).

Figura 6 – Cromatograma do óleo essencial de *Chamaemelum nobile*

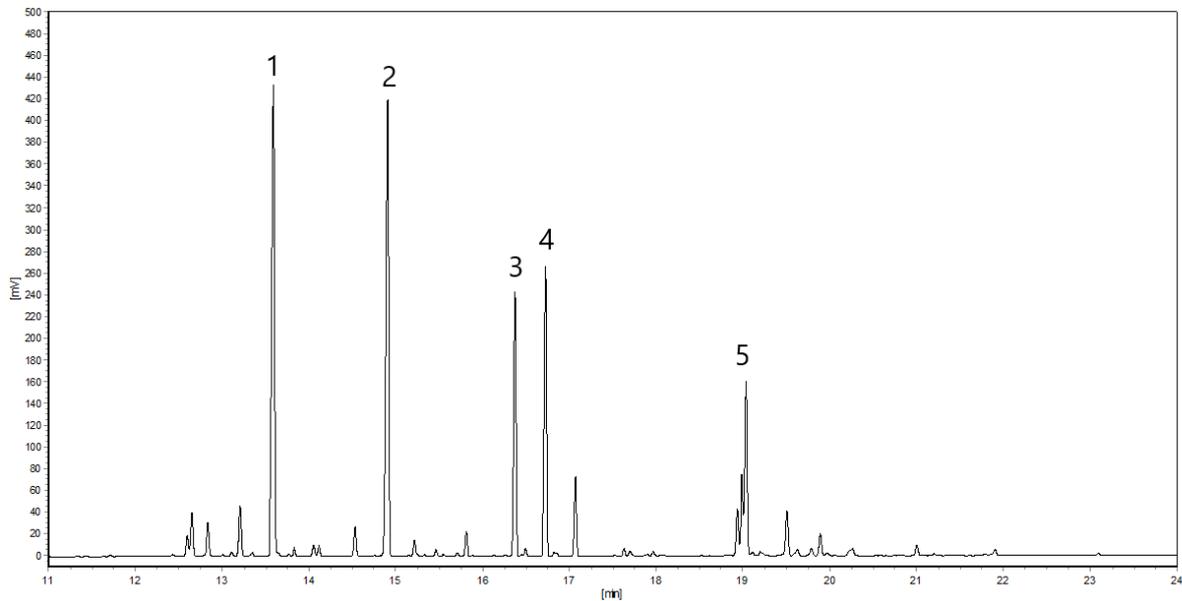


Figura 6 – Cromatograma do óleo essencial de *Chamaemelum nobile*. 1 – α -pineno; 2 – β -pineno; 3 – eucaliptol; 4 – angelato de isobutila; 5 – angelato de 2-metilbutila. Fonte: autor

Pequenas variações na composição do óleo eram esperadas, já que é notório que o perfil químico de plantas varia com a composição do solo, clima, época da colheita, método de extração. De fato, TRADENT et al (2017), encontraram uma grande variação na composição do óleo essencial de *C. nobile* coletado de várias partes do mundo e OMIDBAIGI et al (2004) encontraram variações decorrentes do método de secagem das flores.

Quadro 2 – Composição percentual do óleo essencial de *C. nobile*

Continua

SUBSTÂNCIA	PORCENTAGEM
α -pineno	22,281
β -pineno	21,022
Angelato de isobutila	12,054
Eucaliptol	10,461
Angelato de 2-metilbutila	7,389
Angelato de isoamila	3,472
Pinocarvona	2,023
Trans-pinocarveol	1,888
Isobutirato de isobutila	1,338

Quadro 2 – Composição percentual do óleo essencial de *C. nobile*

continuação

1-butenil-metil-cetona	1,110
3-hidroxi-2-metilenobutanoato de isobutila	0,942
Angelato de propila	0,645
3,3-dimetil-hexan-2-ona	0,494
Mirtenol	0,473
3,4-epoxi-2-octanona	0,443
Borneol	0,363
Mirtenal	0,356
Canfeno	0,340
3-pinanona	0,334
4,7-dimetil-3,7-decadieno-5,6-diol	0,298
4,4,5-trimetil-2-hexeno	0,289
Ciclopropano carboxilato de 3-metilbutila	0,285
Angelato de butila	0,284
Isobutirato de prenila	0,246
2-metilbutirato de isobutila	0,242
Tiglato de isoamila	0,237
Tiglato de isobutila	0,190
Angelato de 2-metil-2butanila	0,157
Farneseno	0,154
Germacreno D	0,119
Isobutirato de isoamila	0,116
2,4-di-terc-butilfenol	0,116
Fenilacetato de ciclohexila	0,107
Metacrilato de isobutila	0,092
Angelato de 2-hidroxi-2-metil-3-butenila	0,091
Angelato de 3-metilpentila	0,090
1-metiltetradecil pentanoato	0,086
Hidrato de canfeno	0,081
Isovalerato de isobutila	0,066
1,1,2,2-tetrametilciclopropano	0,063

Quadro 2 – Composição percentual do óleo essencial de *C. nobile*

	conclusão
Tiglato de cis-3-hexenila	0,059
Total	90,946

Fonte: Autor

Figura 7 – Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. nobile*

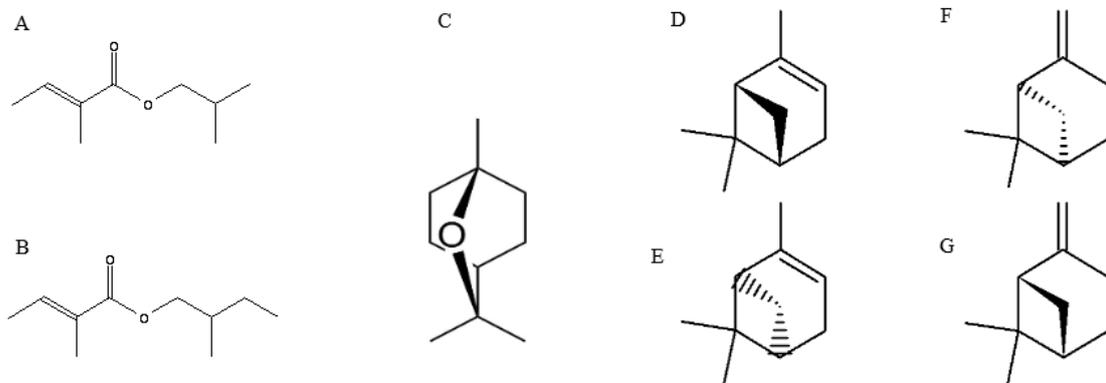


Figura 7 – Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. nobile*. A: angelato de isobutila; B: angelato de 2-metilbutil; C: eucaliptol; D: (-)- α -pineno; E: (+)- α -pineno; F: (+)- β -pineno; G: (-)- β -pineno

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação da atividade antimicrobiana, inicialmente foi realizada uma triagem através da metodologia de disco-difusão. Todas as cepas e isolados clínicos que apresentaram halos de inibição maiores que 6 mm foram posteriormente testadas através da técnica de microdiluição para determinação da CIM e CBM, assim como cepas da mesma espécie que não apresentaram halos de inibição. Para as demais espécies, que não apresentaram halo de inibição, os testes subsequentes não foram realizados.

O óleo essencial de camomila romana apresentou ação antimicrobiana discreta contra algumas cepas e isolados clínicos de *Staphylococcus* sp, *Shigella* sp., *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, com CIM de 227 a 455 mg/mL e não teve ação contra cepas de *Candida* sp (Quadro 3). Em outros estudos, a concentração inibitória

encontrada foi significativamente menor: DUARTE et al(2005) encontraram CIM de 0,8 mg/mL para *C. albicans*, BAIL et al (2009), encontraram CIM de 60 ppm para *E. coli* e *Salmonella* sp e 600 ppm para *S. aureus*, *C. albicans* e outros bacilos Gram negativos e EBANI et al(2017) encontraram CIM de 4,5 µg/mL para *Candida* sp e *Aspergillus* sp e nenhuma atividade para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Essa discrepância entre as CIM obtidas em diferentes estudos provavelmente se deve às diferentes composições do óleo em cada estudo. Por exemplo, DUARTE et al (2005) que obtiveram uma CIM de 0,8 mg/mL para *C. albicans* usaram uma amostra que continha 14% de eucaliptol, 8% de γ -muuroleno e 6% de trans-geraniol. Nenhuma dessas substâncias foi encontrada no óleo avaliado por EBANI et al (2017), cuja CIM para *C. albicans* foi de 4,5 µg/mL. De fato, os dois autores não encontraram nenhuma substância em comum, embora DUARTE et al. (2005) tenham identificado apenas 40% dos componentes do óleo. A amostra por nós avaliada, com CIM >455 mg/mL para *C. albicans*, apresenta apenas eucaliptol em comum com a amostra de DUARTE et al (2005). Já em comparação com amostra avaliada por EBANI et al (2017), a composição foi mais semelhante, embora com concentrações diferentes (22% de α -pineno e 12% de angelato de isobutila em nosso estudo e 1,2% e 34% respectivamente no de EBANI et al.

Quadro 3 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. nobile*

Micro-organismos	Halo de inibição	CIM mg/mL	continua
			CBM mg/mL
Cepas			
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	10	227	>455
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	6	>455	>455
<i>Candida albicans</i> ATCC 28367	7	>455	>455
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22018	11	>455	>455
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	11	>455	>455
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	6	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	6	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 700327	6	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	6	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	6	-	-

Quadro 3 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. nobile*

continuação

<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	6	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	6	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1705	6	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	6	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	6	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	7	455	>455
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	6	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	6	-	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022323A	6	455	>455
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	6	455	>455
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33691	6	455	>455
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	6	455	>455
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1026	6	227	>455
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 976	6	455	>455
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 977	6	455	>455
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14606	6	227	455
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35985	6	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC BAA 750	6	227	>455
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 17666	6	-	-
Isolados clínicos			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	>455	>455
<i>Burkholderia cepacia</i>	6	-	-
<i>Candida albicans</i>	17	>455	>455
<i>Candida glabrata</i>	15	>455	>455
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6	-	-
<i>Escherichia coli</i> Lactose negativo	6	-	-
<i>Morganella morganii</i>	6	-	-

Quadro 3 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. nobile*

			conclusão
<i>Morganella morganii</i>	6	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	6	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	6	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	6	-	-
<i>Salmonella sp</i>	6	-	-
<i>Serratia sp</i>	6	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	10	227	>455
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	455	>455
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6	-	-
<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	8	227	227
<i>Streptococcus sp</i>	6	-	-

Fonte: autor

O óleo analisado tem um percentual considerável de α -pineno e β -pineno e portanto, esperávamos encontrar uma CIM mais baixa, já que alguns estudos demonstram ação antimicrobiana para ambas substâncias. Todavia, essa ação não é consensual, apresentando grandes variações na CIM, como por exemplo de 20 μ g/mL (LEITE, 2007) a 625 μ g/mL (SIENIAWSKA, 2003) para *S. epidermidis* ou até mesmo ausência de ação (ANGIONI, 2003). Uma provável explicação para isso reside na quiralidade dessas moléculas, dado que boa parte dos autores não identificam com qual(is) enantiômero(s) trabalharam. SILVA et al (2012) demonstraram que apenas os enantiômeros (+)- α -pineno e (+)- β -pineno possuem atividade antimicrobiana e que os enantiômeros (-)- α -pineno e (-)- β -pineno não possuem tal atividade e DE SOUSA et al (2018) demonstraram que (+)- α -pineno possui atividade antimicrobiana comparável à da Amicacina para *S. aureus*. Ainda segundo SILVA et al. (2012), os enantiômeros positivos são encontrados mais comumente na América e os negativos na Europa. Assim sugerimos que os pinenos encontrados em nossa amostra, que é proveniente da Itália, sejam ambos enantiômeros negativos.

Baseado nessa hipótese, resolvemos investigar a possibilidade de sinergismo com fármacos antimicrobianos, já que foi demonstrado que o enantiômero (-)- α -pineno em concentração de 125 mg/L tem ação moduladora da resistência a antimicrobianos

em *C. jejuni*, reduzindo a CIM de ciprofloxacina e eritromicina em até 512 vezes (KOVAČ, 2015). Como essa ação foi atribuída a um sinergismo entre alteração da permeabilidade da membrana e inibição de bombas de efluxo, decidimos testar essa hipótese usando combinações do óleo com amicacina em cepas de *P. aeruginosa*, cuja resistência a esse antimicrobiano é frequentemente devida a esse mecanismo (AIRES, 1999, WESTBROCK-WADMAN, 1999).

Para a avaliação da ação moduladora do óleo essencial de camomila romana utilizamos a técnica de *checkerboard*, na qual foram usadas diversas combinações de concentrações de óleo e amicacina. O óleo essencial revelou atividade moduladora de amicacina na concentração de 113 mg/mL, reduzindo 128 vezes a CIM de amicacina, de 1 µg/mL para 0,0078 µg/mL. A concentração necessária para essa ação em nosso estudo foi maior que na do estudo de KOVAČ et al (2015). Contudo, α -pineno corresponde a apenas 22% da composição total do óleo. Além disso, os fármaco e micro-organismo utilizados foram diferentes.

5.3 ENSAIOS DE INTERFERÊNCIA BACTERIANA

Devido ao desenvolvimento cada vez mais comum de multirresistência por vários micro-organismos, alguns autores têm postulado que a inibição de fatores de virulência pode ser uma forma de diminuir a morbimortalidade destes patógenos, sem estimular o desenvolvimento de resistência. Essa estratégia é chamada de interferência bacteriana.

Os ensaios de interferência em fatores de virulência realizados foram inibição da produção de biofilme e da motilidade dos tipos *swimming*, *swarming* e *twitching* em *P. aeruginosa* e inibição da produção de violaceína em *C. violaceum*. Em todos foram usadas concentrações equivalentes a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CIM, ou seja, 227 mg/mL e 113 mg/mL para *P. aeruginosa* e 14,2 mg/mL e 7,1mg/mL para *C. violaceum*, respectivamente. Para a atividade antibiofilme testou-se também a CIM. No teste de motilidade do tipo *swimming*, a concentração $\frac{1}{2}$ CIM não pode ser avaliada, pois não houve crescimento bacteriano.

Os diâmetros de crescimento no teste de *twitching* foram de 14mm, 3mm e 5,5mm para o controle, $\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM respectivamente. No teste de *swarming* foram 11,4mm, 4mm e 7,7mm para o controle, $\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM respectivamente. Para *swimming*, os valores foram 12,7 o controle e 15,3 para $\frac{1}{4}$ CIM. Concentrações de $\frac{1}{2}$

CIM e de $\frac{1}{4}$ CIM foram eficientes contra as motilidades dos tipos *swarming* e *twitching*, mas não para *swimming*, como pode ser visto nas figuras 8, 9 e 10, abaixo. Já para a formação do biofilme, apenas a CIM teve efeito inibitório, enquanto $\frac{1}{2}$ CIM não teve efeito e $\frac{1}{4}$ CIM aumentou a formação de biofilme (Figura 11). A produção de violaceína foi inibida em ambas as concentrações testadas (Figura 11)

Figura 8 - Atividade do óleo essencial de *C. nobile* em *twitching* de *P. aeruginosa* PA01

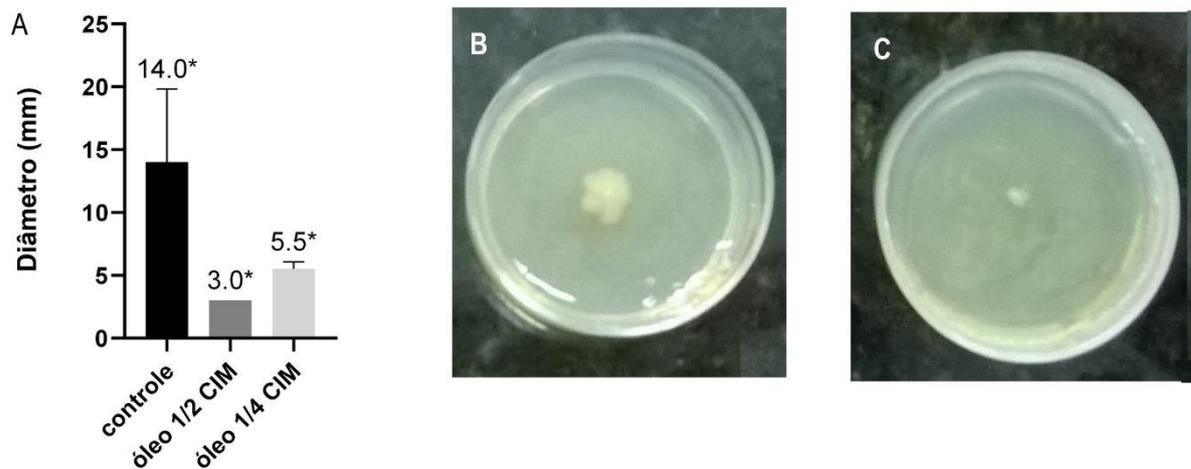


Figura 8 - Atividade do óleo essencial de *C. nobile* em *twitching* de *P. aeruginosa* PA01. A: Diâmetro da colônia em mm * $p < 0,05$. B: Placa controle. C: Placa com $\frac{1}{2}$ CIM de óleo. Fonte: autor

Figura 9 - Atividade do óleo essencial de *C. nobile* em *swarming* de *P. aeruginosa* PA01

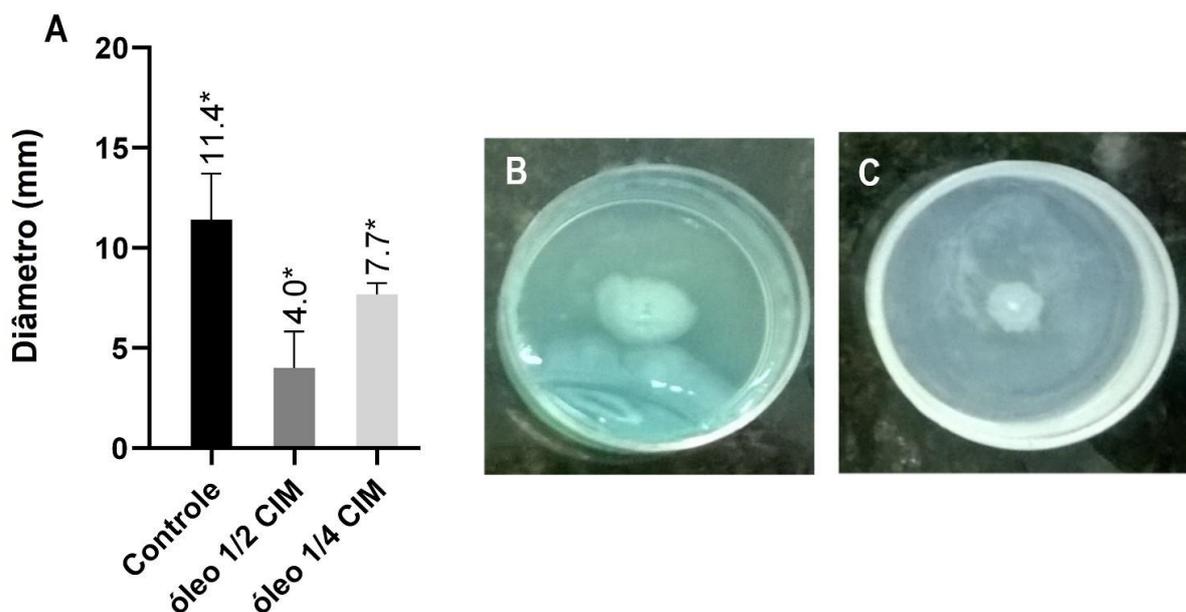


Figura 9 - Atividade do óleo essencial de *C. nobile* em *swarming* de *P. aeruginosa* PA01. A: Diâmetro da colônia em mm * $p < 0,05$. B: Placa controle. C: Placa com $\frac{1}{2}$ CIM de óleo. Fonte: autor

Figura 10 - Atividade do óleo essencial de *C. nobile* em swimming de *P. aeruginosa*

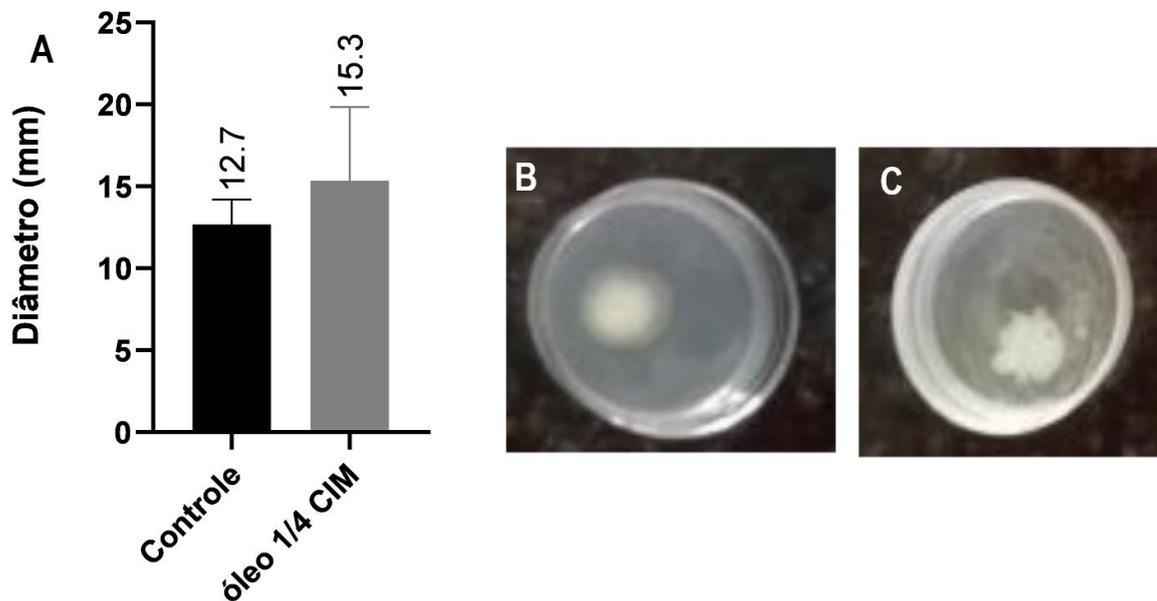


Figura 10 - Atividade do óleo essencial de *C. nobile* em swimming de *P. aeruginosa*. A: Diâmetro das colônias em mm ($p > 0,05$) B: Placa controle C: Placa com 1/2 CIM de óleo Fonte: autor

Figura 11 - Efeito do óleo essencial de *C. nobile* sobre a produção de biofilme por *P. aeruginosa* e violaceína por *C. violaceum*

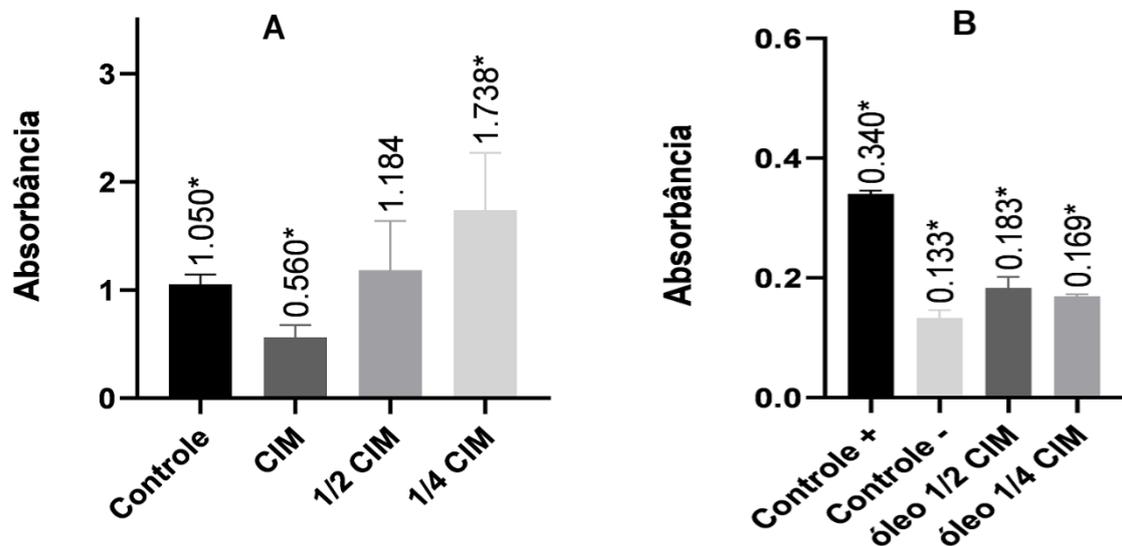


Figura 11 - Efeito do óleo essencial de *C. nobile* sobre a produção de biofilme por *P. aeruginosa* e violaceína por *C. violaceum* A: produção de biofilme B: produção de violaceína * $p < 0,05$

O estudo realizado não permite identificar o mecanismo de ação do óleo sobre a motilidade, mas em conjunto com a inibição da produção de violaceína e o aumento

da formação de biofilme, algumas considerações podem ser feitas. Primeiro, é improvável que o óleo aja sobre a síntese ou montagem do flagelo, já que teve efeito inibitório apenas para *swarming* e não demonstrou ação na motilidade do tipo *swimming*.

A inibição de *twitching* poderia sugerir uma ação inibitória da síntese de pili tipo IV, porém essa nos parece improvável, pois tal ação inibiria também a adesão bacteriana e inibiria a formação de biofilme (CHIANG, 2003). Alternativamente, poderia haver uma interferência apenas no mecanismo de distensão/contração dos pili, que seria capaz de inibir *twitching* sem alterar a capacidade de adesão, levando a formação de uma massa maior de biofilme (KLAUSEN, 2003; CHIANG, 2003). Porém, esse mecanismo ainda não explicaria a inibição de *swarming*.

Diante do exposto acima, 2 mecanismos surgem como mais prováveis: inibição da síntese de ramnolipídeos e interferência no mecanismo regulatório por c-di-gmp.

Ramnolipídeos são biosurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* compostos por 1 ou 2 moléculas de ramnose ligadas ao éster 3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (WANG, 2014). Não são necessários para *swimming*, mas são fundamentais para *swarming*, onde atuam como surfactantes, diminuindo a tensão superficial e facilitando o deslocamento bacteriano (KEARNS, 2010). Tal mecanismo poderia também facilitar *twitching*, no qual também ocorre deslocamento sobre uma superfície. Embora não seja absolutamente necessário para esse tipo de motilidade, um estudo já demonstrou inibição de *twitching* na ausência de ramnolipídeos (GLICK, 2010). Além disso, a síntese de ramnolipídeos poderia causar um aumento da massa de biofilme através da ativação da síntese de polissacarídeos Psl. As rotas metabólicas dessas substâncias compartilham um mesmo substrato e dessa forma exercem inibição competitiva uma sobre a outra (WANG, 2014).

A outra possibilidade, interferência nos níveis de c-di-GMP surgiu do fato de que esse mensageiro intracelular tem papel fundamental na transição entre as formas de vida planctônica e sésil, com altos níveis inibindo motilidade e induzindo formação de biofilmes e vice-versa (RÖMLING, 2013). A elevação dos níveis de c-di-GMP causa uma diminuição da velocidade de rotação do flagelo (PAUL, 2010), bem como uma alteração na frequência de inversões do sentido de rotação (FANG, 2010). Juntos, esses mecanismos tornam o movimento *swimming* menos sensível à quimiotaxia e mais propenso a ligação com superfícies, sem, contudo, inibi-lo por completo. Em superfícies mais viscosas, a diminuição da frequência de inversões do sentido de

rotação, inibe *swarming* (CAIAZZA, 2007). O aumento dos níveis de c-di-GMP também induz a síntese de Psl, e, portanto, inibe a síntese de ramnolipídeos (RÖMLING, 2013). Outro mecanismo inibitório de motilidade por altos níveis de c-di-GMP é o impedimento da extensão-contração de pili tipo IV, que inibe twitching. A alternância entre extensão e contração de pili tipo IV é alcançada através da polimerização e despolimerização de pilina, proteínas formadoras do pilus. Enquanto a polimerização é induzida por altos níveis de c-di-GMP, a despolimerização depende de baixos níveis. Assim, twitching depende de rápidas flutuações nos níveis de c-di-GMP, e é inibido por níveis persistentemente altos (RÖMLING, 2013).

Por fim a inibição da produção de violaceína em *C. violaceum* indica uma ação inibitória de *quorum sensing*. Embora autoindutores sejam geralmente específicos para cada espécie, *C. violaceum* responde a vários autoindutores do tipo AHL (MOROHOSHI, 2008) e é comum que agentes com ação no sistema QS dessa espécie tenham também ação no sistema QS de outras espécies, inclusive *P. aeruginosa*. A inibição de QS poderia ser o fator responsável pelo aumento nos níveis de c-di-GMP já que foi recentemente demonstrada que o sistema QS Rhl aumenta a degradação de c-di-GMP, diminuindo seus níveis dentro da célula (KIM, 2018; LIN CHUA, 2017).

6 CONCLUSÃO

A composição do óleo utilizado é significativamente diferente daquela encontrada na literatura, apresentando os mesmos componentes, porém em proporções relativas muito distintas;

O óleo essencial de *C. nobile* não apresentou atividade antimicrobiana para a maioria das cepas e isolados clínicos testados e fraca atividade contra *Staphylococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella sp*;

Não foi observada atividade antimicrobiana frente a espécies de *Candida sp*;

A interferência em fatores de virulência foi mais relevante, com concentrações de 113 mg/mL sendo capazes de inibir as motilidades dos tipos *swarming* e *twitching* em *P. aeruginosa* PA01;

Concentrações subinibitórias do óleo levaram a um aumento da formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA01

Concentrações de 7,1 mg/mL foram capazes de inibir a produção de violaceína por *C. violaceum*, indicando ação anti *quorum sensing*;

Apesar da fraca ação antimicrobiana, o óleo apresentou grande capacidade moduladora da ação de amicacina sobre *Pseudomonas aeruginosa*, com diminuição de 128 vezes da CIM deste;

7 REFERÊNCIAS

- AIRES, J. R. et al. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2624-2628, 1999.
- ALDOGHAIM, F.; FLEMATTI, G.; HAMMER, K. Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian Eucalyptus Essential Oils. **Microorganisms**, v. 6, n. 4, p. 122, 2018.
- ALLEN, R. C. et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 300, 2014.
- AL-MARBY, A. et al. Nematicidal and antimicrobial activities of methanol extracts of 17 plants, of importance in ethnopharmacology, obtained from the Arabian Peninsula. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 114, 2016.
- AL-SNAFI, A. E. Medical importance of *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*)-a review. **Asian journal of pharmaceutical science & technology**, v. 6, n.2, p. 89-95, 2016.
- ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818-1824, 2000.
- ANGIONI, A. et al. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 3073-3078, 2003.
- ANTONELLI, A.; FABRI, Cristiano. Study on Roman chamomile (*Chamaemelum nobile* L. All.) oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 571-574, 1998.
- ASTANI, A.; SCHNITZLER, P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. **Iranian journal of microbiology**, v. 6, n. 3, p. 149, 2014.
- BAE, J.; OH, E.; JEON, B.. Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 04066-14, 2014.
- BAIL, S. et al. Antimicrobial activities of roman chamomile oil from France and its main compounds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 3, p. 283-286, 2009.
- BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 356-361, 2013.

BARRETO, H.M. et al. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia origanoides* HBK in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BEATSON, S. A. et al. Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 13, p. 3598-3604, 2002.

BILLINGS, N. et al. The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003526, 2013.

BLOSSER, R. S.; GRAY, K. M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 1, p. 47-55, 2000.

BOLES, B. R.; SINGH, P. K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008.

BONEZ, P. C. et al. Anti-biofilm activity of A22 ((S-3, 4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: Influence on biofilm formation, motility and bioadhesion. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 6-13, 2017.

BOUHDID, S. et al. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1139-1149, 2010

BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 640-646, 2000.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. **Annual review of microbiology**, v. 66, p. 493-520, 2012.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894-896, 2011.

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, n. 14, p. 4476-4485, 2004.

CAIAZZA, N. C.; SHANKS, R. MQ; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7351-7361, 2005.

CAIAZZA, N. C. et al. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3603-3612, 2007.

CHIANG, P.; BURROWS, L. L. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2374-2378, 2003.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard M7–A6**. ninth ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A2** second ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COMIN, V. M. et al. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial pathogenesis**, v. 93, p. 120-125, 2016
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Projeto farmácia estabelecimento de saúde**; fascículo VI, 2011

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. V. 1 [s.l.] Imprensa Nacional Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal 1926-1984, 1926. 747 p

COWLES, K. N.; GITAI, Z. Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1411-1426, 2010.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5 ed. Rio de Janeiro, Ed. Bertrand Brasil, 1995. 599 p

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 3 ed. Lisboa: Ed. Calouste Gulbenkian, Serviço de Educação e Bolsas 2003, 701 p

DA FRANCA RODRIGUES, K. A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.

DE MIERI, M. et al. Antiprotozoal activity-based profiling of a dichloromethane extract from *Anthemis nobilis* flowers. **Journal of natural products**, v. 80, n. 2, p. 459-470, 2017.

DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International journal of food microbiology**, v. 137, n. 2, p. 308-311, 2010.

DE SOUSA E., L. et al. Antibacterial Activity and Time-kill Kinetics of Positive Enantiomer of α -pinene Against Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 917-924, 2018.

DECKER, S.; SAUSVILLE, E. A. Preclinical modeling of combination treatments: fantasy or requirement? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1059, n. 1, p. 61-69, 2005.

DEFOIRD, T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 4, p. 313-328, 2018.

DEN HOLLANDER, J. G.; MOUTON, J. W.; VERBRUGH, H. A. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 744-748, 1998.

DERAKHSHAN, S.; SATTARI, M.; BIGDELI, M. Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 5, p. 432-436, 2008.

DRAKE, D.; MONTIE, T. C. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 43-52, 1988.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUKE, J. A. **CRC Handbook of medicinal herbs**. 2 Ed. Boca Raton, Ed. CRC Press, 1987. 677 p

EBANI, V. V. et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils against pathogens responsible for otitis externa in dogs and cats. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 21, 2017.

EDDOUKS, M. et al. Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes research and clinical practice**, v. 67, n. 3, p. 189-195, 2005.

EDWARDS-JONES, V. et al. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. **Burns**, v. 30, n. 8, p. 772-777, 2004.

EJIM, L. et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 6, p. 348, 2011.

FANG, X.; GOMELSKY, M. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. **Molecular microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1295-1305, 2010.

FARKAS, P. et al. Composition of the essential oil from the flowerheads of *Chamaemelum nobile* (L.) All.(Asteraceae) cultivated in Slovak Republic. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 2, p. 83-85, 2003.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269, 1994.

GLICK, R. et al. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 2973-2980, 2010.

GRANDO, T. H. et al. In vitro activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of helminthology**, v. 90, n. 03, p. 377-382, 2016.

GUERRA, F. Q. S. et al. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. **Natural product research**, v. 26, n. 23, p. 2235-2238, 2012.

GUIMARÃES, R. et al. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 718-725, 2013.

HALL, C. W.; MAH, TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 276-301, 2017.

HATCH, R. A.; SCHILLER, N. L. Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides through the Extracellular Polysaccharide of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 974-977, 1998.

HEILMANN, S.; KRISHNA, S.; KERR, B. Why do bacteria regulate public goods by quorum sensing? - How the shapes of cost and benefit functions determine the form of optimal regulation. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 767, 2015.

HOL, F. J. H. et al. Density-dependent adaptive resistance allows swimming bacteria to colonize an antibiotic gradient. **The ISME journal**, v. 10, n. 1, p. 30, 2016.

KALIA, V. C. et al. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. **Biotechnology advances**, 2018.

KANDELOUS, H. M. et al. Mitochondrial apoptosis induced by *Chamaemelum nobile* extract in breast cancer cells. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 15, n. Suppl, p. 197, 2016.

- KAZEMIAN, H. et al. Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 432-436, 2015.
- KAZEMIAN, H. et al. In vivo antibacterial and wound healing activities of Roman chamomile (*Chamaemelum nobile*). **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 18, n. 1, p. 41-45, 2018.
- KAZMIERCZAK, B. I.; SCHNIEDERBEREND, M.; JAIN, R. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. **Current opinion in microbiology**, v. 28, p. 78-82, 2015.
- KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.
- KENNEDY, D. A.; READ, A. F. Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1851, p. 20162562, 2017.
- KIM, W. et al. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3111-3117, 2003.
- KIM, B. et al. Terrein is an inhibitor of quorum sensing and c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*: a connection between quorum sensing and c-di-GMP. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8617, 2018.
- KJELLEBERG, S.; MOLIN, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 3, p. 254-258, 2002.
- KLAUCK, V. et al. In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haemotobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. **Tropical biomedicine**, v. 32, n. 1, p. 160-166, 2015.
- KLAUSEN, M. et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Molecular microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1511-1524, 2003.
- KÖHLER, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 5990-5996, 2000.
- KOVAČ, J. et al. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)- α -pinene in *Campylobacter jejuni*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122871, 2015.
- LAI, S.; TREMBLAY, J.; DÉZIEL, E. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 1, p. 126-136, 2009.

LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60666, 2013.

LANGVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. JA; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LEECH, Andrew J.; MATTICK, John S. Effect of site-specific mutations in different phosphotransfer domains of the chemosensory protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* motility. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8479-8486, 2006.

LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LIN CHUA, S. et al. Reduced intracellular c-di-GMP content increases expression of quorum sensing-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 451, 2017.

LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 105-116, 2001.

LOUIE, A. et al. The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2646-2654, 2010.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.

MARMITT, D. J. et al. Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.

MATHER, A. E. et al. Bacillary dysentery from World War 1 and NCTC1, the first bacterial isolate in the National Collection. **The Lancet**, v. 384, n. 9955, p. 1720, 2014.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 13, 2017.

MITCHISON, D.; DAVIES, G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future [State of the art]. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 6, p. 724-732, 2012.

- MOROHOSHI, T. et al. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. **FEMS microbiology letters**, v. 279, n. 1, p. 124-130, 2008.
- MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000213, 2008.
- NGUYEN, D. et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 982-986, 2011.
- NICKEL, J. C. et al. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 619-624, 1985.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. **HM Government and Wellcome Trust: UK**, 2018.
- OMIDBAIGI, R.; SEFIDKON, F.; KAZEMI, F. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman chamomile. **Flavour and fragrance journal**, v. 19, n. 3, p. 196-198, 2004.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.
- PAMP, S. J.; STERNBERG, C.; TOLKER-NIELSEN, T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. **Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 75, n. 2, p. 90-103, 2009.
- PARAJE, M. G. et al. Antimicrobial resistance in biofilms. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex**, 2011.
- PAUL, K. et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. **Molecular cell**, v. 38, n. 1, p. 128-139, 2010.
- PAZINATO, R. et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 1, p. 77-83, 2014.
- PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 6, p. a025197, 2016.

PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet infectious diseases**, v. 12, n. 3, p. 249-253, 2012.

PUREVDORJ-GAGE, B.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1569-1576, 2005.

RAI, M.; KON, K. (Ed.). **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**. 1 ed. [S.l.], Academic Press, 2013. Cap. 1,6,10,14

REX CONSORTIUM et al. Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 2, p. 110-118, 2013.

RICHMAN, D. D. HIV chemotherapy. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 995, 2001.

RIVERA-YAÑEZ, C. R. et al. Anti-Candida Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene—An In Vitro Study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2095, 2017.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1-52, 2013.

ROY, S.; CHAURVEDI, P.; CHOWDHARY, A. Evaluation of antiviral activity of essential oil of *Trachyspermum Ammi* against Japanese encephalitis virus. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 3, p. 263, 2015.

RUKAYADI, Yaya et al. In vitro antibacterial activity of panduratin A against enterococci clinical isolates. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 1489-1493, 2010.

SADOVSKAYA, I. et al. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β -(1 \rightarrow 3)-glucans, which bind aminoglycosides. **Glycobiology**, v. 20, n. 7, p. 895-904, 2010.

SAVAGE, V. J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A. J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1968-1970, 2013.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

SHARIFZADEH, A. et al. Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n. 1, p. e11-e17, 2016.

- SIENIAWSKA, E. et al. Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures. **Industrial crops and products**, v. 51, p. 152-157, 2013.
- SILVA, A. C. R. da et al. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-6316, 2012.
- SIMM, R. et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1123-1134, 2004.
- SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 413-432, 2018.
- SZABÓ, M. Á. et al. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 5, p. 782-786, 2010.
- THE PLANT LIST – A WORKING LIST OF ALL PLANT SPECIES. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-113893>>. Acesso em 21 mar. 2019
- TOSCANO, A. A. P. Avaliação farmacoeconômica de medicamentos antimicrobianos no complexo hospitalar Clementino Fraga. 2014. 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.
- TOUTAIN, C. M.; ZEGANS, M. E.; O'TOOLE, G. A. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 771-777, 2005.
- TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7-12, 2016.
- TADRENT, W. et al. Chemotypes investigation of essential oils of Chamomile herbs: A short review. **Journal Material Environment Science**, v. 7, p. 1229-1235, 2017.
- TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.
- TURGIS, M. et al. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 1073-1079, 2009.
- TURKINA, M. V.; VIKSTRÖM, E. Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of innate immunity**, p. 1-17, 2018.

VAN VUUREN, S. F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A. M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 4, p. 440-446, 2009.

VOLPATO, A. et al. *Melaleuca alternifolia* essential oil against the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and its possible effect on the soil fauna. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 1, p. 41-46, 2016.

VLAMAKIS, H. et al. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. **Genes & development**, v. 22, n. 7, p. 945-953, 2008.

WANG, S. et al. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharides production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 01237-14, 2014.

WARNKE, P. H. et al. The ongoing battle against multi-resistant strains: in-vitro inhibition of hospital-acquired MRSA, VRE, *Pseudomonas*, ESBL *E. coli* and *Klebsiella* species in the presence of plant-derived antiseptic oils. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 4, p. 321-326, 2013.

WERNER, E. et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6188-6196, 2004.

WESTBROCK-WADMAN, S. et al. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2975-2983, 1999.

WILTON, M. et al. Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 544-553, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary**. 2014

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 177-184, 2013.

WRIGHT, G. D. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 11, p. 862-871, 2016.

YANG, A. et al. Influence of physical effects on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biophysical journal**, v. 112, n. 7, p. 1462-1471, 2017.

YAWATA, Y.; NOMURA, N.; UCHIYAMA, H. Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5429-5435, 2008.

ZHAO, K. et al. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 497, n. 7449, p. 388, 2013.

ZHENG, Z.; STEWART, P. S. Growth limitation of *Staphylococcus epidermidis* in biofilms contributes to rifampin tolerance. **Biofilms**, v. 1, n. 1, p. 31-35, 2004.

ZOLFAGHAR, I.; EVANS, D. J.; FLEISZIG, S. M.J. Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 9, p. 5389-5393, 2003.