



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Novas estratégias no controlo de infeções e biofilmes de *Acinetobacter baumannii*

Susana Cristina Teixeira Alves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues

Coorientadora: Mestre Andreia Filipa Silvestre Duarte

Covilhã, junho de 2014

Folha em branco

Dedicatória

Dedico esta Dissertação às pessoas mais importantes da minha vida

Pelo que me ensinaram e transmitiram

Pelo apoio incondicional e incessante

Pela paciência e amizade

Pela pessoa que sou hoje

Aos meus pais, avós e à minha irmã

Ao meu namorado

À minha família

Aos meus amigos

Folha em branco

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação só foi possível devido à colaboração, disponibilidade e empenho de várias pessoas, desde já, o meu muito obrigado.

À Professora Fernanda Domingues, pela orientação, disponibilidade, atenção e compreensão, assim como pelos conhecimentos transmitidos.

À Andreia Duarte, por todo o tempo disponibilizado, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio.

Ao Ângelo pelo apoio transmitido.

À Sónia Sousa e à Engenheira Ana Paula pelo tempo disponibilizado e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais, aos meus avós, à minha irmã e ao meu namorado pelo apoio incondicional e incessante, pelo vosso amor e por terem acreditado sempre em mim, sem vocês isto não seria possível.

A toda a minha família, em especial à minha tia Sofia e ao meu tio Nelo por todo o apoio e por toda a amizade.

A todos os meus amigos, em especial à Catarina L., Cláudia B., Lúcia Q., João C., Inês C., Zélia P., Patrícia P. e ao Senhor Abreu, pelo apoio incondicional e incessante, pela amizade e carinho, pela paciência e por me fazerem feliz. Vocês são os meus irmãos do coração, sem o vosso apoio não seria possível chegar até aqui.

Aos meus colegas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), em especial à Ana, ao Luís e à Filipa.

Folha em branco

Resumo

Acinetobacter baumannii tem recentemente emergido como patógeno nosocomial oportunista. Um dos fatores de patogenidade e virulência consiste na capacidade deste microrganismo aderir a equipamentos e superfícies hospitalares, e formar biofilmes resistentes aos antibióticos e agentes antimicrobianos disponíveis, tornando-se relevante a procura de novas alternativas naturais. A atividade antimicrobiana dos compostos majoritários do óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum* foi determinada contra duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e três estirpes clínicas (AcB10/10, AcB23/10 e AcB24/10) de *A. baumannii*, através do método de difusão em disco e da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Neste estudo também foi analisado o efeito do linalool sobre a formação e a dispersão de biofilmes de *A. baumannii*, através da quantificação da biomassa total do biofilme. Como a adesão bacteriana é o primeiro passo na formação dos biofilmes, determinou-se a capacidade de estirpes de *A. baumannii* aderirem a diferentes superfícies, comuns em ambiente hospitalar, e a sua capacidade de formar biofilmes nas mesmas. Para isso recorreu-se à medição do ângulo de contacto, e à quantificação da biomassa de biofilme formado sobre as superfícies, com e sem tratamento com linalool. Como a formação de biofilmes é regulada por fenómenos de *quorum-sensing*, estudou-se ainda a interferência do linalool nesse processo de comunicação bem como, a sua citotoxicidade em eritrócitos humanos. Através dos resultados obtidos, verificou-se que o linalool foi o composto que apresentou melhor atividade antibacteriana, com valores de CMI entre 2-8 µL/mL e observou-se uma rápida ação bactericida sobre as estirpes de *A. baumannii*. O linalool apresentou capacidade de inibir a formação de biofilmes, assim como biofilmes preformados de *A. baumannii*. Através das medições do ângulo de contacto, verificou-se que as duas estirpes de referência apresentaram uma distinta capacidade de adesão às superfícies testadas. Para estas mesmas estirpes, verificou-se que o linalool apresentou uma ação inibitória na formação de biofilme sobre as superfícies. Esta ação sobre os biofilmes poderá ser explicada pela interferência do linalool sobre o sistema de *quorum-sensing*. Os resultados do teste de hemólise demonstram uma baixa toxicidade do linalool sobre os eritrócitos humanos. Em conclusão, o linalool revelou-se um agente antimicrobiano promissor sobre células planctónicas e biofilmes de *A. baumannii*, podendo futuramente vir a ser considerada a sua aplicação no controlo deste microrganismo.

Palavras-chave

Acinetobacter baumannii; linalool; antibacteriano; anti-biofilme; adesão.

Folha em branco

Abstract

Acinetobacter baumannii has recently emerged as an opportunistic nosocomial pathogen. One of the pathogenicity and virulence factors is the ability of this microorganism to adhere to equipment and hospital surfaces and form biofilms with increasing resistance to the antibiotics and antimicrobial agents available, making it important the search of new natural alternatives. The antimicrobial activity of the major compounds of the *Coriandrum sativum* essential oil was determined against two reference strains (LMG 1025 and LMG 1041) and three clinical strains (AcB 10/10, AcB 23/10 and AcB 24/10) of *A. baumannii*, by disk diffusion assay and by the minimum inhibitory concentration (MIC). In this study, it was also evaluated the effect of linalool on the formation and dispersion of biofilms of *A. baumannii* by the quantification of the total biomass of the biofilm. Since bacterial adhesion is the first step in biofilm formation, the ability of *A. baumannii* strains to adhere to different surfaces common in hospitals, and their ability to form biofilms was evaluated. For this purpose, the sessile drop contact angle measurements and the quantification of biofilm biomass formed on surfaces with and without treatment with linalool were assessed. As biofilm formation is regulated by *quorum-sensing*, the interference of linalool in the communication process was studied, as well as its cytotoxicity in human erythrocytes. It was found that linalool was the compound with better antibacterial activity with MIC values between 2-8 $\mu\text{L}/\text{mL}$, being also observed its rapid bactericidal action against the *A. baumannii* strains. Linalool also showed ability to inhibit biofilm formation, as well as pre-formed biofilms of *A. baumannii*. Through contact angle measurements, it was found that the two reference strains had a distinct ability to adhere to the tested surfaces. For these same strains, it was found that linalool had an inhibitory effect on the formation of biofilm on the surfaces. This anti-biofilm activity may be explained by the interference of linalool on the *quorum-sensing* system. The results of the test hemolysis showed a low toxicity of linalool on human erythrocytes. In conclusion, linalool proved to be a promising antimicrobial agent on planktonic and biofilms cells of *A. baumannii* and may eventually come to be considered for use in the control of this microorganism.

Keywords

Acinetobacter baumannii; linalool; antibacterial; anti-biofilm; adhesion.

Folha em branco

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-chave	vii
Abstract	ix
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Acrónimos e Abreviaturas.....	xix
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Bactéria <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
2.1. Caracterização geral da espécie <i>A. baumannii</i>	2
2.1.1. Taxonomia	2
2.1.2. Caracterização fisiológica e metabólica	2
2.1.3. Epidemiologia e disseminação	3
2.1.4. Relevância clínica	4
2.1.5. Patogenicidade e fatores de virulência	5
2.1.6. Resistência antimicrobiana e mecanismos de resistência	6
Capítulo 3 - Biofilmes bacterianos	8
3.1. Adesão Celular e formação de biofilme	8
3.2. Mecanismos de resistência em biofilmes	10
3.3. Métodos de avaliação da adesão bacteriana a superfícies	11
Capítulo 4 - Controlo de <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
4.1. Estratégias de controlo de <i>A. baumannii</i>	13
4.2. Atividade do óleo essencial de <i>Coriandrum sativum</i>	14
4.2.1. Atividade antimicrobiana dos compostos linalool, α -pineno, p-cimeno, cânfora e acetato de geranyl	15
4.3. Utilização de compostos naturais no controlo de biofilmes	18
Capítulo 5 - Objetivos	19
Capítulo 6 - Materiais e Métodos	20
6.1. Microrganismos	20
6.2. Conservação dos microrganismos	20
6.3. Compostos antimicrobianos	20
6.4. Determinação da atividade antimicrobiana	21
6.4.1. Teste de difusão em disco	21
6.4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	22
6.4.3. Curvas de morte - fase exponencial e estacionária de crescimento	23

6.5. Biofilmes de <i>A. baumannii</i>	24
6.5.1. Avaliação do efeito do linalool em biofilmes de <i>A. baumannii</i>	24
6.5.1.1. Efeito do linalool na formação de biofilme de <i>A. baumannii</i>	24
6.5.1.2. Efeito do linalool sobre o biofilme pré-formado de <i>A. baumannii</i>	24
6.5.1.3. Análise da formação de biofilme através de microscopia eletrónica de varrimento	25
6.5.2. Avaliação da formação de biofilmes de <i>A. baumannii</i> em diferentes superfícies e efeito do linalool	26
6.5.2.1. Superfícies utilizadas e sua esterilização	26
6.5.2.2. Avaliação da formação de biofilmes em diferentes superfícies	26
6.5.2.3. Efeito do linalool na formação de biofilmes nas superfícies	27
6.6. Capacidade de adesão de <i>A. baumannii</i> a diferentes superfícies e efeito do tratamento com linalool.....	27
6.6.1. Preparação das superfícies	28
6.6.2. Preparação dos inóculos	28
6.6.3. Ângulos de contacto e energia livre de adesão	28
6.7. Atividade anti- <i>Quorum-sensing</i> (QS).....	29
6.8. Citotoxicidade - atividade hemolítica.....	30
6.9. Equipamentos utilizados.....	31
6.10. Reagentes utilizados	32
Capítulo 7 - Resultados e Discussão	33
7.1. Atividade antimicrobiana dos compostos naturais	33
7.2. Efeito do linalool em biofilmes de <i>A. baumannii</i>	41
7.2.1.1. Efeito do linalool na formação de biofilmes de <i>A. baumannii</i>	41
7.2.1.2. Efeito do linalool em biofilmes pré-formados de <i>A. baumannii</i>	43
7.2.1.3. Análise da formação do biofilme por microscopia electrónica de varrimento	46
7.2.2. Avaliação da adesão e formação de biofilmes de <i>A. baumannii</i> em diferentes superfícies - efeito do linalool	46
7.2.2.1. Avaliação da adesão de <i>A. baumannii</i> a diferentes superfícies através da medição do ângulo de contacto e energia de adesão	46
7.2.2.2. Avaliação da formação de biofilmes de <i>A. baumannii</i> em diferentes superfícies e efeito do tratamento com linalool	49
7.3. Atividade Anti- <i>Quorum-sensing</i> (QS).....	54
7.4. Citotoxicidade - hemólise	55
Capítulo 8 - Conclusões e Perspetivas futuras	57
Referências Bibliográficas	59
Anexos	66

Folha em branco

Lista de Figuras

- Figura 2.1.** Representação das colónias de *A. baumannii* (Imagem obtida de http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3442836_viru-3-243-g1&req=4; no dia 16/06/2014). 3
- Figura 2.2.** Principais mecanismos bacterianos de resistência a antibióticos (imagem obtida em www.politicsandthelifesciences.org/Biosecurity_course_folder/print/u3s5_antibiotic.html; no dia 16/06/2014). 7
- Figura 3.1.** Imagem ilustrativa dos passos de formação de biofilme: ligação das células planctónicas (1), adesão célula-célula (2), proliferação (3), maturação (4) e dispersão (5). (Imagem adaptada de <http://labrat.fieldofscience.com/2009/11/biofilms-and-bioshields.html>, no dia 16/06/2014). 8
- Figura 6.1.** Estrutura química do linalool, cânfora, α -pineno, acetato de geranyl e p-cimeno (imagem adaptada de Burt, [1] e Rajeshwari e Andallu, [2]). 21
- Figura 7.1.** Representação gráfica das curvas de morte do efeito do linalool sobre estirpes de *A. baumannii* em fase de crescimento exponencial: efeito de diferentes concentrações de linalool (1x e 2x a CMI) e controlo sobre duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e três estirpes clínicas (AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10) de *A. baumannii*. 37
- Figura 7.2.** Representação gráfica das curvas de morte do efeito do linalool sobre estirpes de *A. baumannii*, em fase de crescimento estacionária: efeito de diferentes concentrações de linalool (1x e 2x a CMI) e controlo sobre duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e três estirpes clínicas (AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10) de *A. baumannii*. 38
- Figura 7.3.** Efeito do linalool sobre a formação do biofilme de *A. baumannii*. Quantificação da biomassa total de biofilme pelo método do Violeta de Cristal (A) e percentagem de inibição de biofilme formado (B). 42
- Figura 7.4.** Efeito do linalool sobre o biofilme previamente formado de *A. baumannii*. Quantificação da biomassa total de biofilme pelo método do Violeta de Cristal (A) e percentagem de inibição do biofilme formado (B). 44
- Figura 7.5.** Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento a pressão variável. Biofilme da estirpe de *A. baumannii* LMG 1041, formado sobre uma superfície de poliestireno a 2300 \times (A) e 4000 \times (B). 46

Figura 7.6. Equipamento OCAH 200 da DataPhysics Instruments, utilizado na determinação do ângulo de contacto através da técnica da gota séssil. 47

Figura 7.7. Formação de biofilme pelas estirpes de referência de *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041 em aço inoxidável, alumínio anodizado, latex e cloreto de polivinilo, através da quantificação da biomassa total do biofilme. De modo a comparar os resultados, estes foram padronizados de modo a corresponderem a uma área superficial de 1cm². 50

Figura 7.8. Representação do biofilme formado sobre as superfícies de PVC (6 poços à direita) e alumínio anodizado (6 poços à esquerda) (A) e aço inoxidável (poços superiores com biofilme e poços inferiores controlo) (B). 51

Figura 7.9. Efeito do linalool na formação de biofilme pelas estirpes de referência de *A. baumannii* LMG 1025 (A) e LMG 1041 (B) em aço inoxidável, alumínio anodizado, latex e cloreto de polivinilo. De modo a comparar os resultados, estes foram padronizados de modo a corresponderem a uma área superficial de 1cm². 52

Figura 7.10. Imagens do halo de inibição do linalool para estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando DMSO (A), linalool (B) e esquema representativo da inibição de crescimento e pigmento (C). 55

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 4.1. Classificação taxonómica do óleo de <i>C. sativum</i> [3].	15
Tabela 4.2. Composição química (% total de composto) do óleo essencial de <i>C. sativum</i> [4].	16
Tabela 6.1. Classificação dos compostos antimicrobianos, de acordo com a estrutura química.	20
Tabela 6.2. Superfícies utilizadas, placas onde foram realizados os ensaios e volume final utilizado por poço.	26
Tabela 6.3. Volumes de inóculo e soluções de linalool adicionadas às diferentes superfícies.	27
Tabela 6.4. Descrição dos equipamentos utilizados no decorrer do presente trabalho laboratorial.	31
Tabela 6.5. Descrição dos reagentes, marca, grau de pureza e país/Origem, utilizados no decorrer do presente trabalho laboratorial.	32
Tabela 7.1. Diâmetros (mm) dos halos de inibição dos compostos e dos controlos (tetraciclina e DMSO) para as estirpes de <i>A. baumannii</i> (Média ± Desvio Padrão).	33
Tabela 7.2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Letal (CML), em µL/mL, dos compostos em estudo contra cinco estirpes de <i>A. baumannii</i> .	34
Tabela 7.3. Tempo de incubação (em minutos) ao qual se observou total inibição do crescimento das estirpes de <i>A. baumannii</i> nas duas fases de crescimento, utilizando duas concentrações inibitórias de linalool.	39
Tabela 7.4. Energia livre de adesão das bactérias de <i>A. baumannii</i> às diferentes superfícies, com e sem tratamento prévio com o linalool.	48
Tabela 7.5. Percentagem de inibição do biofilme formado pelas duas estirpes de referência de <i>A. baumannii</i> (LMG 1025 e LMG 1041), sobre quatro superfícies, através do efeito do linalool.	53
Tabela 7.6. Diâmetro (mm) do halo de inibição do pigmento violeta pelo linalool e controlo (DMSO) para a estirpe <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 (Média ± Desvio Padrão).	54

Folha em branco

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

CCD	Centro Controlo de Doenças
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CML	Concentração Mínima Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	Exopolissacáridos
IAA	Ácido indol - 3- acético
LB	Lúria - Bertani
LPS	Lipopolissacárido
MDR	Multidrug - resistant
MHA	Müeller Hinton Agar
OmpA	Proteína da Membrana Externa
PBS	Phosphate buffered saline
PS	Poliestireno
PVC	Cloreto de polivinilo
QS	Quorum sensing
Rpm	Rotações por minuto
Triton X-100	4-(1,1,3,3- Tetramethylbutyl) phenyl- polyethylene glycol
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta
VC	Violeta de cristal

Folha em branco

Capítulo 1 - Introdução

Nos últimos quinze anos, os surtos hospitalares causados pelo patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii* têm vindo a aumentar em todo o mundo. Este microrganismo está a tornar-se uma preocupação clínica, pois adquiriu a capacidade de resistir a quase todos os antibióticos comercialmente disponíveis [5].

Perante a elevada resistência desta bactéria aos antibióticos convencionais e antimicrobianos e, conseqüentemente, à capacidade de provocar inúmeros surtos de infeções a nível hospitalar torna-se relevante a procura de alternativas aos antimicrobianos convencionais, tais como os óleos essenciais, bem como os seus compostos isolados, que estão descritos como possuindo propriedades antimicrobianas.

Os óleos essenciais são considerados seguros e apresentam poucos efeitos secundários ou riscos associados à sua utilização. Alguns óleos essenciais são utilizados como ingredientes na indústria alimentar e são mesmo usados como aditivos para a produção de alimentação para animais, devido às suas propriedades antibacterianas [6].

Capítulo 2 - Bactéria *Acinetobacter baumannii*

2.1. Caracterização geral da espécie *A. baumannii*

2.1.1. Taxonomia

O género *Acinetobacter* tem sido sujeito a uma extensa revisão nas últimas décadas e, pelo menos, 32 espécies já foram descritas, entre elas a espécie *A. baumannii*, uma das espécies mais relevantes clinicamente [7]. A análise taxonómica recente sugeriu que os membros do género *Acinetobacter* devem ser inseridos na família Moraxellaceae e na ordem Gammaproteobacteria, onde fazem parte os géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e outros organismos relacionados [8]. Das 32 espécies do género *Acinetobacter*, as espécies *A. baumannii* e as espécies genómicas *Acinetobacter* 3 e 13TU, são responsáveis pelas infeções nosocomiais e adquiridas na comunidade e são geneticamente e fenotipicamente semelhantes à espécie ambiental *A. calcoaceticus*, pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* [8,9].

2.1.2. Caracterização fisiológica e metabólica

As bactérias são organismos procarióticos, unicelulares, com uma estrutura simples, não apresentando membrana nuclear e organelos celulares. A parede celular da célula bacteriana é complexa e, deste modo, as bactérias podem ser dividida em Gram-positiva (com uma camada espessa de peptidoglicano) ou Gram - negativa (com uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa). O espaço compreendido entre a membrana externa e a membrana citoplasmática é designado por espaço periplasmático, e fazem parte da sua constituição os componentes dos sistemas de transporte de ferro, proteínas, açúcares, e uma diversidade de enzimas hidrolíticas importantes para a célula, uma vez que têm a capacidade de degradar macromoléculas de grandes dimensões. A membrana externa é atípica, pois apresenta uma distribuição assimétrica dos lípidos sobre as membranas externa e interna. Esta membrana é rígida e é responsável pela manutenção da estrutura da bactéria e representa uma barreira para a permeabilidade de moléculas de grandes dimensões e moléculas hidrofóbicas (como alguns antibióticos) protegendo, também, a bactéria de condições ambientais adversas [10,11].

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, aeróbio estrito, não fermentador da lactose, catalase-positiva e oxidase-negativa, hemolítico e com um teor de G+C de ADN de 39% e 47%, respetivamente. O género *Acinetobacter* tem a capacidade de crescer em meios sólidos frequentemente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica à temperatura de 37°C, formando colónias brancas, por vezes mucóides (figura 2.1). No entanto, a espécie *A.*

baumannii é capaz de utilizar uma grande diversidade de fontes de carbono e de sobreviver numa diversa gama de temperaturas e pH [8,12,13].

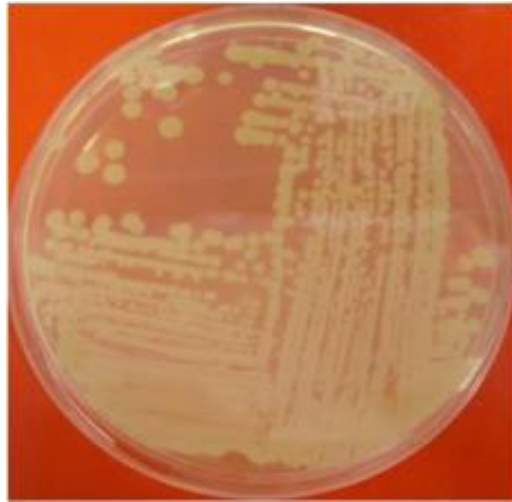


Figura 2.1. Representação das colónias de *A. baumannii* (Imagem obtida de http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3442836_viru-3-243-g1&req=4; no dia 16/06/2014).

2.1.3. Epidemiologia e disseminação

A versatilidade nutricional e metabólica de *A. baumannii* faz com que este patógeno se adapte facilmente a diferentes ambientes [8]. A ubiquidade é outra das características da bactéria *A. baumannii*, podendo assim ser isolada a partir do solo, da água, da pele e do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis. No entanto, pode ser também isolada de material médico, tal como, equipamentos de raio - x, bancadas, ventiladores e sistemas de circulação de ar [14]. Por outro lado, *A. baumannii* propaga-se rapidamente, devido à sua capacidade de resistir à dessecação e à ação dos desinfetantes, provocando infeções nosocomiais, principalmente nos doentes imunocomprometidos e com doenças críticas. Deste modo, o estado de saúde do doente colonizado por *A. baumannii* é que determina a capacidade deste patógeno causar uma doença [15,16]. Esta espécie bacteriana para além de ter sido encontrada em amostras clínicas humanas, também está associada à infeção e disseminação epidémica em animais. A presença de *A. baumannii* na pele de indivíduos saudáveis foi de 4%, mas a taxa de prevalência na comunidade foi baixa e a presença no ambiente foi rara [17].

A. baumannii resistente a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) são frequentemente responsáveis pelas infeções hospitalares e o aumento das estirpes com genes que conferem resistência a antibióticos tem-se distribuído por novas áreas geográficas [7]. Segundo um estudo desenvolvido na região de Espanha, as infeções adquiridas por *A. baumannii* foram maioritariamente nosocomiais (superior a 90%) e apenas uma pequena

percentagem (4%) foram adquiridas na comunidade. Assim, a disseminação de *A. baumannii* é maioritariamente clonal, dentro das instituições hospitalares, o que faz com que este patogéneo nosocomial seja responsável por elevadas taxas de mortalidade e morbilidade, principalmente nos cuidados intensivos de saúde [18]. Deste modo, as infeções provocadas por *A. baumannii* são maioritariamente adquiridas por contacto com equipamentos hospitalares contaminados com esta bactéria ou através dos profissionais de saúde que entraram em contacto com os doentes infetados [19].

A. baumannii é um microrganismo ubíquo em ambiente hospitalar, espalhando-se com bastante facilidade entre os doentes e entre os hospitais. Em 2003, foi descrita uma infeção adquirida num hospital em França, e no espaço de um mês foram identificados cinco *clusters* de *A. baumannii* em quatro hospitais, dentro do mesmo distrito. Posteriormente, destes hospitais, o surto espalhou-se para 53 hospitais e do Norte da França para 4 regiões diferentes [20]. Por outro lado, em 2004, o Centro de Controlo de Doenças (CCD) identificou que *A. baumannii* era responsável por aproximadamente 80% das infeções responsáveis por patologias em seres humanos [20]. A ocorrência de infeções causadas por *A. baumannii* tem representado uma questão clínica importante em diversas partes do mundo, nomeadamente em muitas partes da Europa, entre as quais Portugal, com a disseminação de um clone de *A. baumannii* resistente a múltiplos fármacos [8]. Os complexos clonais I, II e III de *A. baumannii* (CC1, CC2 e CC3, respetivamente) surgiram e distribuíram-se internacionalmente ao longo de muitas áreas geográficas, de forma preocupante, nomeadamente na Europa. Assim, estas linhagens epidémicas caracterizam-se pela resistência a quase todos os antibióticos utilizados na clínica [21,22].

2.1.4. Relevância clínica

A. baumannii é um microrganismo oportunista capaz de provocar infeções nosocomiais e infeções na comunidade [23]. Assim, existem diversos fatores de risco para a aquisição e infeção pelo patogéneo *A. baumannii*, nomeadamente doentes sujeitos a uma intervenção cirúrgica; traumas (como queimaduras); recém-nascidos prematuros; hospitalizações anteriores nos cuidados intensivos de saúde; tempo de internação; exposição a equipamento médico contaminado; fatores relacionados com o tratamento médico, como a ventilação mecânica e a presença de dispositivos de longa permanência - cateteres e tubos de drenagem; número de procedimentos invasivos realizados e terapia antimicrobiana anterior [17]. Como *A. baumannii* é um microrganismo oportunista causa infeções em doentes imunocomprometidos, principalmente os doentes que se encontram nos cuidados intensivos de saúde e doentes com uma patologia subjacente como, por exemplo, doentes pulmonares crónicos ou diabéticos. No entanto, apesar de este patogéneo poder colonizar pessoas saudáveis não apresenta risco de provocar infeções [20].

As infecções hospitalares, especialmente nos cuidados intensivos, provocadas por *A. baumannii* podem ser, infecções do trato urinário e respiratório, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do sangue, bacteremia, meningite, endocardite, infecções em feridas e queimaduras, abscessos intra-abdominais, infecções nas regiões envolvidas em cirurgias e pneumonia nosocomial associada à ventilação mecânica. Estas infecções em meio hospitalar são responsáveis por uma taxa de mortalidade de 43% para os doentes presentes nos cuidados intensivos e de 23% para os restantes doentes hospitalizados [12]. Por outro lado, as infecções provocadas por *A. baumannii* e adquiridas na comunidade não são tão frequentes como as adquiridas em meio hospitalar, mas há relatos de meningite adquirida na comunidade. No entanto, as infecções do trato respiratório inferior e dos dispositivos intravasculares são as infecções mais frequentes [19,20,23,24].

2.1.5. Patogenicidade e fatores de virulência

Os fatores de patogenicidade e virulência podem estar associados à capacidade de *A. baumannii* se manter viável por longos períodos de tempo; adquirir nutrientes essenciais; aderir a células epiteliais, levando à sua apoptose; libertar produtos tóxicos, causando danos nos tecidos; capacidade de formação de biofilmes; interação dos pilus bacterianos e dos lipopolissacáridos (LPS), promovendo a adesão às células hospedeiras e colonizando-as; resistência à dessecação; versatilidade das necessidades de crescimento e sobrevivência e, provavelmente, à atividade *quorum - sensing* (QS) [16,17]. Por outro lado, através da análise genómica e fenotípica foi possível a identificação de outros fatores de virulência, nomeadamente exoprodutos hemolíticos, fosfolipase C e D (enzimas lipolíticas que são responsáveis pela lise das células hospedeiras através da clivagem dos fosfolípidos), proteases, atividade quelante de ferro mediada por *acinetobactin*, motilidade e resistência às condições de stress [19,22,25]. Por fim, existem outros fatores ambientais, tais como, a luz, cátions monovalentes e etanol no meio de cultura, que contribuem para a virulência e resistência de *A. baumannii*, assim como para a formação de biofilmes em superfícies abióticas. A adição de baixas concentrações de etanol ao meio de cultura aumenta a formação de biofilme, conduz a uma diminuição do pH do meio, devido à produção de ácido indol-3- acético (IAA), e provoca uma redução da motilidade celular, devido ao aumento da produção de polímeros extracelulares ou apêndices bacterianos superficiais [26].

A proteína da membrana externa (OmpA) é responsável pela adesão e invasão das células epiteliais, contribuindo para a formação de biofilme e para a capacidade de *A. baumannii* permanecer e crescer no soro humano. Deste modo, esta proteína contribui para a motilidade da bactéria e induz a apoptose das células durante a infeção. Por outro lado, as vesículas da membrana externa permitem a transferência horizontal de genes e protegem as células bacterianas do sistema imunitário do organismo hospedeiro. Por fim, os LPS são responsáveis pela resposta imunitária congénita e pela patogenicidade associada à bactéria *A. baumannii*.

Os polissacarídeos capsulares representam também um fator de patogenicidade [19]. A proteína da família RNase T2 promove a adesão de *A. baumannii* a superfícies abióticas, tais como, poliestireno (PS), polipropileno, vidro e aço inoxidável, com posterior formação de biofilme, e intervém na motilidade da bactéria [27].

A bactéria *A. baumannii* apresenta também a capacidade de produzir pilus tipo IV (apêndices superficiais bacterianos multiproteicos) funcional, que está envolvido na transformação natural (capacidade de adquirir ADN exógeno, por transferência horizontal de genes), na motilidade *twitching* e na adesão a superfícies bióticas e abióticas [25].

O uso excessivo de antibióticos contribuiu para o aparecimento de estirpes de *A. baumannii* extremamente resistentes. Foram identificados dois clones diferentes, responsáveis por epidemias de *A. baumannii* devido à utilização de um amplo espectro de antibióticos, nos cuidados intensivos de saúde [20]. Por outro lado, a análise genotípica de *A. baumannii* ACICU, pertencente ao Clone Europeu II, e de três estirpes designadas por A, B e C revelou a presença de regiões genómicas associadas à resistência apresentada por esta bactéria. Estas características genéticas podem ser adquiridas por transferência horizontal de genes, mas também através da combinação, adição e/ou eliminação dos genes que codificam para os fatores de virulência [19]. O sequenciamento do ADN de uma outra estirpe de *A. baumannii* identificou 16 ilhas genómicas que possuem genes de virulência, associados à biogénese da parede celular, resistência a antibióticos, biogénese do pilus e metabolismo lipídico [17].

2.1.6. Resistência antimicrobiana e mecanismos de resistência

A resistência apresentada por *A. baumannii* a diversos antibióticos está associada a uma extensa diversidade de fatores, entre os quais estão envolvidos os mecanismos de resistência intrínsecos, adquiridos e genéticos. A resistência intrínseca está associada às estirpes de uma determinada espécie, sem haver contacto com os antibióticos. Por outro lado, a resistência adquirida consiste na indução de resistência através, por exemplo, do contacto com os antibióticos. Por fim, a resistência genética consiste na alteração genética, através de uma mutação genética ou de um mecanismo de controlo ou a partir da obtenção de um plasmídeo que confere resistência aos antibióticos [15,17,28].

A espécie *A. baumannii* apresenta alguns mecanismos intrínsecos de resistência, nomeadamente as porinas e as bombas de efluxo. A perda da permeabilidade da membrana externa resulta da perda das porinas (OMP), responsáveis pelo transporte de substâncias. Assim, a resistência antimicrobiana intrínseca de *A. baumannii* pode estar associada, em parte, à baixa quantidade e tamanho das porinas neste microrganismo. Por outro lado, as bombas de efluxo juntamente com a baixa quantidade de porinas desempenham um fator de resistência muito forte em *A. baumannii* [20,29]. O bombeamento ativo dos agentes

antimicrobianos do meio intracelular para o meio extracelular (efluxo ativo) provoca resistência bacteriana a determinados antimicrobianos e os sistemas AdeABC e AdelJK foram caracterizados em *A. baumannii*. A sobre-expressão do sistema AdeABC, codificado pelos genes *adeRS*, é responsável pela resistência aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina. Por outro lado, a bomba RND, AdelJK, contribui para a resistência à tigeciclina. O sistema de efluxo Abes também contribui para a resistência às quinolonas, macrolídeos e cloranfenicol [29].

A capacidade de *A. baumannii* adquirir genes de resistência antimicrobiana de forma extremamente rápida, faz com que este patógeno seja resistente a múltiplos fármacos, apresentando assim resistência a quase todas as classes de antibióticos. O rápido aparecimento de um extenso espectro de β -lactamases e carbapenemases têm conduzido ao aparecimento de estirpes pan-resistentes [7,30]. Deste modo, a resistência aos β -lactâmicos pode ocorrer por hidrólise, mediada por β -lactamases, alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBP), diminuição da permeabilidade aos antibióticos devido a alterações da estrutura e do número de porinas e à ação das bombas de efluxo, que contribuem para a redução da quantidade de antibiótico que alcança a célula de *A. baumannii* [31].

Deste modo, a resistência de *A. baumannii* aos agentes antimicrobianos, como os antibióticos, é mediada pelos principais mecanismos de resistência identificados em bactérias, nomeadamente: modificação dos locais-alvo, inativação enzimática, efluxo ativo e diminuição da afluência dos fármacos (ver a figura 2.2.) [17].

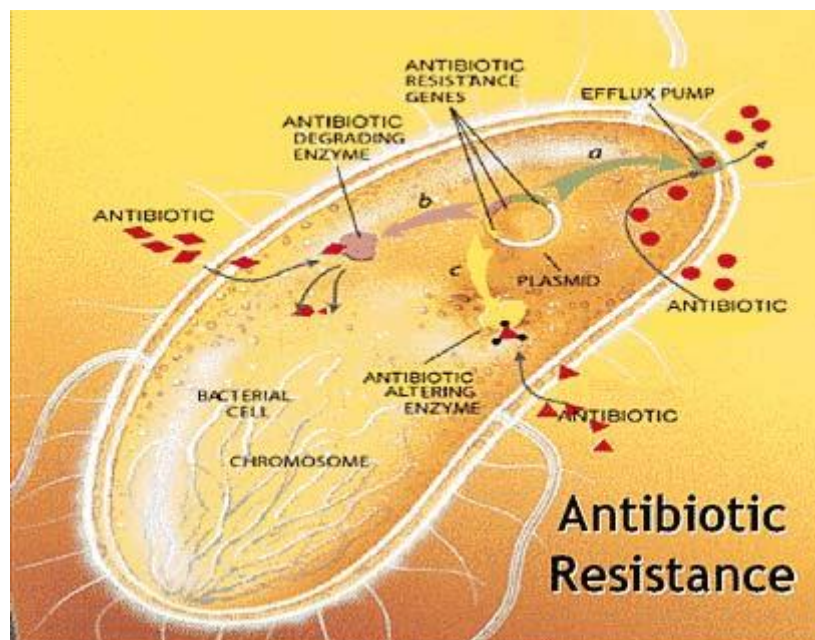


Figura 2.2. Principais mecanismos bacterianos de resistência a antibióticos (imagem obtida em www.politicsandthelifesciences.org/Biosecurity_course_folder/print/u3s5_antibiotic.html; no dia 16/06/2014).

Capítulo 3 - Biofilmes bacterianos

3.1. Adesão Celular e formação de biofilme

Os biofilmes bacterianos, correspondem a arranjos celulares, em que as células são morfológicamente, metabolicamente, fisiologicamente e fenotipicamente diferentes dos seus homólogos planctônicos e apresentam a capacidade de resistir a agentes antimicrobianos [23,32]. Os biofilmes estão normalmente associados a muitos problemas de saúde como, por exemplo, a doença periodontal, a endocardite, a osteomielite, a fibrose cística e infecções relacionadas com implantes cirúrgicos, e contribuem para mais de 80% de todas as infecções em seres humanos [33].

Os biofilmes apresentam um conjunto de características em comum, tais como, a capacidade de produzir uma matriz extracelular de polissacáridos; sinalização intracelular e a presença de homólogos de adesinas bacterianas na superfície da proteína associada à formação do biofilme (Bap). Deste modo, a formação do biofilme bacteriano envolve cinco passos (figura 3.1) [12]:

- i. Ligação primária reversível de células individuais a uma superfície;
- ii. Fixação irreversível, mediada por polissacáridos extracelulares;
- iii. Desenvolvimento precoce da estrutura do biofilme;
- iv. Maturação da arquitetura do biofilme;
- v. Dispersão das células individuais que constituem o biofilme.

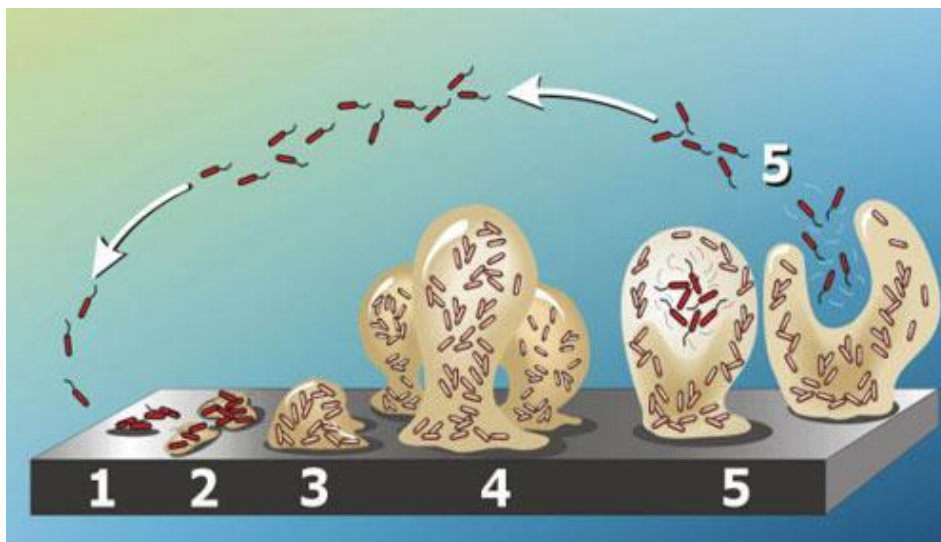


Figura 3.1. Imagem ilustrativa dos passos de formação de biofilme: ligação das células planctônicas (1), adesão célula-célula (2), proliferação (3), maturação (4) e dispersão (5). (Imagem adaptada de <http://labrat.fielddofscience.com/2009/11/biofilms-and-bioshields.html>, no dia 16/06/2014).

A formação de biofilme resulta da tendência natural dos microrganismos para aderir a superfícies bióticas e abióticas, se multiplicarem e correspondem assim a células incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares [34]. Deste modo, o biofilme é constituído pelas células bacterianas, exopolissacáridos (EPS), proteínas e ADN [35].

Existem alguns fatores que influenciam a capacidade de adesão e formação de biofilme pela bactéria *A. baumannii*, tais como, a presença e a expressão dos genes associados à resistência aos antibióticos como o gene *bla_{PER-1}*, a temperatura e a concentração de ferro extracelular livre, o agente quelante EDTA que diminui a adesão e a formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas e, por fim, a densidade da população celular, através da produção de moléculas de *quorum-sensing* (QS) [19]. Por outro lado, em condições de baixo *stress* exógeno, nomeadamente concentrações sub-inibitórias de sais, álcoois e uma vasta diversidade de antibióticos, verifica-se o aumento da formação de biofilme [36].

O primeiro passo da formação do biofilme envolve as interações entre a célula-superfície, como por exemplo, a adesão bacteriana de *A. baumannii* a superfícies inertes e as interações célula-célula, com posterior desenvolvimento do biofilme maduro. O aumento da adesão das bactérias às superfícies deve-se frequentemente à síntese de EPS. As características da superfície bacteriana, nomeadamente, a presença de estruturas semelhantes ao pilus e os açúcares hidrofóbicos da cadeia lateral O do LPS também promovem a adesão inicial às células hospedeiras e a ligação filiforme entre as bactérias, resultando na formação do biofilme [12,17,23]. Também, a pilus tipo I, codificado pelo *locus Csu*, a OmpA e a produção do polissacárido extracelular poli-beta-1-6-N-acetilglucosamina (PNAG) estão envolvidos na adesão inicial a superfícies abióticas e, conseqüentemente, na formação de biofilmes em dispositivos médicos [21]. Gaddy et al., [37], verificaram que a OmpA da estirpe *A. baumannii* 19606 apresenta um papel importante na formação de biofilmes sobre as superfícies bióticas e abióticas.

Após a adesão inicial verifica-se a produção dos exopolissacáridos, constituintes importantes do biofilme maduro, inibindo deste modo a atividade dos neutrófilos e contribuindo para a resistência bacteriana [29]. A proteína Bap, para além de estar associada à adesão bacteriana e à formação do biofilme em condições estáticas, intervém na estabilização do biofilme maduro, pois apresenta uma estrutura homóloga às adesinas bacterianas [12]. Nesta etapa final da formação do biofilme, muitas bactérias utilizam a comunicação célula-célula - *quorum - sensing* (QS). Este processo envolve a síntese intracelular de moléculas de baixo peso molecular e a sua libertação para o meio extracelular. Estas moléculas são reconhecidas por recetores e conseqüentemente verifica-se a expressão de genes responsáveis pela virulência. Assim, o QS é um dos sistemas responsável pela formação de biofilme, motilidade, esporulação, conjugação, bioluminescência e intervenção em relações patogénicas ou simbióticas com o organismo hospedeiro de diversas bactérias [7,38,39]. Foi descrito que o QS apresenta uma função reguladora na formação do biofilme por uma estirpe clínica *A. baumannii* [19].

Segundo Tomaras et al., [23] , o patógeno *A. baumannii* forma um biofilme mais denso na interface ar-líquido, pois é uma bactéria aeróbia e, também se verificou a formação do biofilme tanto em superfícies hidrofóbicas (plástico) como em superfícies hidrofílicas (vidro). Neste estudo verificou-se também que a estirpe de *A. baumannii* em estudo teve a capacidade de aderir e formar biofilmes na superfície de alguns plásticos (poliestireno, polipropileno e teflon) utilizados na produção de dispositivos médicos. Estes biofilmes formam-se em condições dinâmicas (por exemplo, cateteres, onde as células são sujeitas ao fluxo de líquido) mas também em condições estáticas (por exemplo, equipamento hospitalar), no entanto, em condições dinâmicas verifica-se uma menor formação de biofilme [23].

De acordo com um estudo desenvolvido por Baño et al., [40], de 92 isolados de *A. baumannii* analisados, 56 (63%) formaram biofilme *in vitro* e 33 (36%) não desenvolveram biofilme [40]. Os autores deste estudo também demonstraram que a estirpe clínica de *A. baumannii* em estudo apresentou uma formação de biofilme significativamente maior do que a estirpe de referência [22].

Em suma, os biofilmes apresentam diversas propriedades, nomeadamente, elevada resistência a agentes antimicrobianos, o aumento da resistência à luz ultravioleta (UV), o aumento das taxas de troca genética, as alterações das capacidades biodegradativas e o aumento da produção de metabolitos secundários [41].

3.2. Mecanismos de resistência em biofilmes

O *glycocalyx*, polissacárido extracelular que envolve o biofilme, atua como uma barreira física e como é fortemente aniônico protege a microcolónia bacteriana dos agentes exógenos, como antibióticos, detergentes, entre outros. Deste modo, os biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células planctónicas [42]. A resistência antimicrobiana dos biofilmes pode ser intrínseca ou adquirida. Assim, a resistência intrínseca está associada à matriz de EPS que retarda a difusão dos agentes antimicrobianos, às menores taxas de crescimento dos organismos associados aos biofilmes e ao ambiente envolvente das células do biofilme que podem oferecer condições para a proteção dos organismos [43]. Por outro lado, a resistência adquirida consiste na transferência de elementos extracromossómicos como, por exemplo, a transferência de plasmídeos que conferem resistência a vários agentes antimicrobianos. O aumento da transferência de plasmídeos em biofilmes pode ocorrer devido ao aumento da probabilidade de contacto entre as células bacterianas do biofilme [43].

A elevada resistência dos biofilmes aos antibióticos e desinfetantes é também dependente da espécie e da estirpe do microrganismo, das características fisiológicas do biofilme e das células, das alterações fenotípicas das próprias células e da idade do biofilme [44]. No

entanto, a resistência do biofilme pode estar associada a outros mecanismos, tais como, a fraca penetração ou inativação dos agentes antimicrobianos na matriz polimérica extracelular, a alteração do estado metabólico da bactéria (estado latente), a presença de células persistentes, a resistência induzida pelo próprio agente antimicrobiano após utilização em baixas concentrações e a regulação positiva das bombas de efluxo [34].

A erradicação dos biofilmes formados é um processo muito difícil, uma vez que a inativação e remoção do biofilme são processos distintos, isto é, os biofilmes podem estar inativos (com as células mortas e/ou metabolicamente inativas) mas permanecem ligados à superfície [34].

3.3. Métodos de avaliação da adesão bacteriana a superfícies

A adesão bacteriana resulta de interações físico-químicas complexas entre a célula, a superfície e a fase líquida, devido à carga da superfície da célula, à hidrofobicidade e às propriedades de recetor/dador de eletrões. Deste modo, estas interações físico-químicas dependem das propriedades da superfície das células bacterianas e, conseqüentemente da sua cultura, das condições experimentais e dos métodos utilizados para as determinar [45]. Uma das teorias do processo de adesão celular é a teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), que caracteriza a energia total da interação entre as células e as superfícies, como um equilíbrio entre as interações atrativas de Lifshitz-van der Waals e as forças repulsivas da dupla camada eletrónica. Esta teoria, no entanto, não descreve com precisão as interações entre a célula e a superfície, para curtas distâncias. Os efeitos hidrofóbicos e de hidratação são também fatores importantes nas interações ácido/base de Lewis, uma vez que em meio aquoso, a hidrofobicidade contribui para a facilidade da remoção do filme de água, permitindo a adesão entre a célula e a bactéria. No entanto, esta teoria apenas permite descrever as interações não - específicas do processo de adesão das bactérias às superfícies, não sendo válida para as interações específicas entre as bactérias e as superfícies. Para complementar esta teoria surgiu a abordagem alargada de DLVO (xDLVO) que acrescenta termos adicionais à energia livre de adesão (interações ácido/base) para explicar as ligações de hidrogénio entre as bactérias e a superfície, a curta distância. No entanto, esta teoria está limitada às primeiras fases de adesão, pois apenas tem em conta as propriedades físico-químicas, não considerando as interações biológicas específicas. Assim, para a quantificação adequada da energia de adesão é necessário ter em consideração tanto as interações não específicas como as interações específicas - químicas e/ou biológicas [36,46]. Djeribi et al., [45] avaliaram a influência do pH sobre as propriedades físico-químicas da superfície das células por dois métodos diferentes, nomeadamente, a adesão microbiana aos solventes (MATS, do inglês *Microbial Adhesion To Solvents*) e medição do ângulo de contacto (CAM, do inglês *Contact Angle Measurements*). O MATS baseia-se na comparação da afinidade da célula bacteriana para um solvente monopolar e um solvente apolar. Utilizando este método, Djeribi et al., [45] verificaram que as interações ácido-base de Lewis são parcialmente responsáveis

pela adesão de *A. baumannii*. Por outro lado, a adesão das bactérias às superfícies abióticas, resultante das interações superficiais Lifshitz-van der Waals e ácido-base, poderá ser determinada através da medição do ângulo de contacto, utilizando três líquidos teste, com diferentes polaridades - a água desionizada, o etilenoglicol e o diiodometano, através da técnica da gota séssil (*sessile drop*). O ângulo de contacto está relacionado com a tendência de uma gota de líquido se espalhar numa superfície sólida [15,33,45]. A medição do ângulo de contacto é usada na avaliação do grau de hidrofobicidade e adesão da superfície da célula bacteriana, pois é uma técnica simples e rápida [15,33]. Assim, o ângulo de contacto foi o método seleccionado, na presente dissertação, para avaliar a adesão termodinâmica das estirpes de *A. baumannii* a diferentes superfícies.

Capítulo 4 - Controlo de *Acinetobacter baumannii*

4.1. Estratégias de controlo de *A. baumannii*

Estão disponíveis várias estratégias para combater ou prevenir infeções por *A. baumannii*, nomeadamente:

- **Monoterapia**, na qual se podem incluir o sulbactam, as polimixinas, a tigeciclina e as terapias de combinação [29].
- **Terapia quelante do ferro**, a atividade antimicrobiana desta terapia é diferente entre estirpes e o gálio (Ga^{+3}) pode também ser utilizado como agente antimicrobiano [47].
- **Péptidos antimicrobianos**, atuam como disruptores das membranas bacterianas e alguns péptidos exercem mecanismos de ação intracelulares [47].
- **Vacinas profiláticas**, a vacinação com a proteína BAP (associada à formação do biofilme) permitiu uma redução bacteriana. Por outro lado, a OmpA é promissora no desenvolvimento de vacinas, uma vez que é altamente conservada e é expressa em níveis elevados na membrana externa bacteriana [47].
- **Terapia fotodinâmica**, são utilizados fotosensibilizadores que no seu estado fundamental interagem com o oxigénio molecular, produzindo espécies reativas de oxigénio, que reagem localmente com as células - alvo, provocando danos e promovendo a morte das células - alvo [47].
- **Terapia com óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*)**, baseia-se na difusão do radical livre NO através das membranas biológicas, exercendo efeitos sobre os componentes intra e extracelulares [47].

Como as terapias descritas anteriormente apresentam algumas limitações, torna-se relevante a procura de novas alternativas, nomeadamente através da utilização de compostos de origem natural. Como está descrito que vários óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana, e que o óleo essencial das sementes de *Coriandrum sativum* apresenta propriedades antimicrobianas contra estirpes de *Acinetobacter baumannii*, torna-se relevante investigar a atividade antibacteriana dos compostos individuais extraídos deste óleo, tais como o linalool, contra este microrganismo [44,48].

4.2. Atividade do óleo essencial de *Coriandrum sativum*

Os óleos essenciais são produtos odoríferos e voláteis do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos das folhas e caules [49,50]. Por outro lado, na área médica, os óleos essenciais são utilizados no tratamento de infecções do trato respiratório e também são aplicadas inalações de óleos essenciais no tratamento da bronquite aguda e crônica e da sinusite aguda. Por fim, os óleos essenciais também apresentam atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, entre outras [51,52]. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é investigada na literatura há bastantes anos, sendo utilizados na farmacologia, botânica farmacêutica, fitopatologia, microbiologia médica e clínica, entre outros [53].

Uma das características particulares da maioria dos óleos essenciais e dos seus constituintes ativos é serem altamente voláteis, apresentarem baixa solubilidade na fase aquosa, serem lipofílicos e hidrofóbicos. Esta última característica permite a partição dos lípidos da membrana celular das bactérias, com conseqüente perturbação das estruturas celulares e a perda simultânea do controlo quimiosmótico, contribuindo para a maior permeabilidade a estes agentes antimicrobianos [54,55].

A espécie *Coriandrum sativum* L. (óleo essencial de sementes de coentro) é uma planta herbácea anual, pertencente à família *Apiaceae* (consultar a taxonomia na tabela 4.1.) e é um líquido incolor ou amarelo pálido com um odor e sabor (suave, doce, quente e aromático) característicos [3]. O óleo de *C. sativum* L. apresenta uma eficaz atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas e fungos, e a atividade antifúngica pode estar associada aos componentes de álcool deste óleo [4,44]. De acordo com Silva et al., [4], verificou-se que o *C. sativum* inibiu o crescimento das estirpes de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Burdock e Carabin [3], também verificaram a ação antibacteriana eficaz do óleo de *C. sativum* contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus* e *Bacillus subtilis*) e bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, espécies de *Klebsiella* e *Proteus vulgaris*).

Tabela 4.1. Classificação taxonómica do óleo de *C. sativum* [3].

Classificação Taxonómica	
Reino	<i>Plantae</i> (Plantas)
Sub-Reino	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)
Super-divisão	<i>Spermatophyta</i> (Plantas com sementes)
Divisão	<i>Magnoliophyta</i> (Plantas com flor)
Classe	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Sub-classe	<i>Rosidae</i>
Ordem	<i>Apiales</i>
Família	<i>Apiaceae</i> (família da cenoura)
Género	<i>Coriandrum</i> L.
Espécie	<i>Coriandrum sativum</i> L.

Segundo o estudo desenvolvido por Silva et al., [56], concluiu-se que o modo de ação do óleo essencial de *C. sativum* envolve perturbações na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, a alteração de todas as funções celulares, observando-se uma ação antibacteriana tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas. Duarte et al., [44], também demonstraram o efeito antibacteriano do óleo essencial de *C. sativum* sobre células planctónicas e biofilmes de *A. baumannii*, evidenciando a sua atividade bactericida e a inibição de biofilmes com concentrações de óleo sub-inibitórias.

4.2.1. Atividade antimicrobiana dos compostos linalool, α -pineno, p-cimeno, cânfora e acetato de geranil

Tal como foi previamente determinado pelo nosso grupo de investigação (tabela 4.2.), o principal componente do óleo de *C. sativum* é o linalool (64.38%) mas apresenta também outros componentes importantes, tais como, α -pineno (4,04%), p-cimeno (4,54%), cânfora (4,88%) e acetato de geranil (5,82%) [4].

Tabela 4.2. Composição química (% total de composto) do óleo essencial de *C. sativum* [4].

Composto	Percentagem Total (%)
Linalool	64.38
Acetato Geranil	5.82
Cânfora	4.88
p-cimeno	4.54
α -pineno	4.04
Óxido trans-linalool (furanóide)	3.12
Óxido cis-linalool (furanóide)	2.76
Limoneno	1.78
Geraniol	1.56
Canfeno	0.83
Borneol	0.47
3E-hexenilbutanoato	0.36
Óxido trans-linalool (piranóide)	0.33
α -terpineol	0.33
Mirceno	0.32
β -pineno	0.28
Geranial	0.21
Terpinen-4-ol	0.14
1-decanol	0.14
Isobornil acetato	0.14
p-cimenol	0.12
8-hidroxilinalool	0.12
Cis-pinocarvil acetato	0.12
3-decanol	0.1
1,8-cineol	0.08
Trans-carveol	0.06
Nerol	0.06
Neral	0.06
Neril acetato	0.06
Ciclogeraniol acetato	0.06
Dodecenal	0.05
Triciclono	Vestígios
α -tujeno	Vestígios
6-metil-5-heptan-2-ona	Vestígios
6-metil-5-heptan-2-ol	Vestígios
Geranil formato	Vestígios
Total Identificado	97.5

O linalool (*3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol*) é um álcool monoterpeneo constituinte principal dos óleos essenciais de diversas espécies aromáticas e é utilizado na medicina tradicional, devido aos seus efeitos espasmolítico, anestésicos e sedativos [52,57,58]. O linalool apresenta uma baixa toxicidade oral e dérmica aguda, como demonstrado em diversos estudos de laboratório desenvolvidos em animais, no entanto, alguns estudos demonstraram que uma pequena percentagem de indivíduos apresentaram uma reação alérgica [3]. Por outro lado, está descrito na literatura a atividade antimicrobiana do linalool contra *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* [57]. Segundo Al-Mariri et al., [6], o óleo essencial de *Thymus syriacus* e os compostos timol, carvacrol, “*dihydro-carvon*” e linalool apresentaram atividade antimicrobiana eficaz contra bactérias Gram-negativas. Vários estudos também, mostram a atividade antimicrobiana e antifúngica do linalool [59][60][61]. Mazzanti et al., [62], também verificaram que o linalool era o composto maioritário do óleo essencial de *Hyssopus officinalis* e demonstraram a atividade antimicrobiana do linalool, uma vez que inibiu o crescimento de várias leveduras e bactérias. Os resultados também mostraram que o composto 1,8-cineole apresentou uma elevada ação antimicrobiana [62].

O composto p-cimeno (*1-isopropil-4-metil-benzeno*) é um hidrocarboneto natural (monoterpeneo) [3,63] e é o composto maioritário de vários óleos essenciais. Este composto apresenta atividade antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O modo de ação deste agente antimicrobiano está associado à perturbação dos lípidos da membrana citoplasmática, provocando a ruptura da mesma [64]. O p-cimeno foi identificado como um dos principais compostos de *Origanum scabrum*, mas não apresentou atividade antimicrobiana contra as estirpes bacterianas testadas [65]. Segundo Bagamboula et al., [54] o p-cimeno é um dos principais compostos do óleo essencial de tomilho, e, através da determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar demonstraram que este composto não apresentou nenhuma atividade bactericida contra a estirpes *Shigella sonnei* e *S. flexneri*.

Outro dos compostos maioritários do óleo essencial de *C. sativum* é a cânfora (*1,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-2-one*) e este composto é uma cetona [3]. De acordo com Inouye et al., [51], a cânfora é um dos componentes principais do óleo de alecrim, e foi o principal responsável pela atividade antimicrobiana observada. Por outro lado, Magiatis et al., [53] verificaram que a elevada quantidade de 1,8-cineole e da cânfora podem estar associados à atividade bacteriana apresentada pelos óleos essenciais de *A. taygetea* e *A. fraasii*.

O α -pineno (*2, 6, 6- Trimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-ene*) é outro dos compostos principais de *C. sativum* e é um hidrocarboneto [3]. Filipowicz et al., [66], verificaram que o α -pineno é o principal composto do óleo essencial de zimbro e apresentou atividade antimicrobiana contra espécies de *A. baumannii*.

Por fim, o acetato de geranyl (*Trans* - 3, 7 - *Dimethyl* - 2, 6 - *octadienyl acetate*) é outros dos compostos maioritários do óleo de *C. sativum* e é um éster [3]. De acordo com Dorman e Deans, [50] verificou-se que o acetato de geranyl apresentou, em geral, maior atividade antimicrobiana comparativamente com o geraniol, possivelmente devido à presença do grupo acetato na estrutura deste composto.

4.3. Utilização de compostos naturais no controlo de biofilmes

Como os biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos e desinfetantes, do que as células planctónicas, torna-se cada vez mais urgente a procura de compostos naturais, como os óleos essenciais que ultrapassem a problemática da elevada resistência microbiana. Deste modo, é fundamental a procura de alternativas naturais que conduzam à inibição e erradicação dos biofilmes bacterianos.

Assim, estão descritos na literatura estudos com o objetivo de avaliar o efeito individual de vários componentes comuns dos óleos essenciais (α - pineno; 1,8-cineol; (+) - limoneno; linalool e acetato de geranyl) sobre biofilmes de *L. monocytogenes* [42]. Deste modo, os autores concluíram que o efeito antimicrobiano resulta da interação entre os componentes e não do efeito individual de um componente, ou seja, os compostos individuais foram ineficazes na inibição do crescimento do biofilme, no entanto, houve uma diminuição da atividade metabólica do biofilme [42]. Gursoy et al., [67], também verificaram que concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de *Satureja hortensis* L. inibiram a formação de biofilme pela bactéria *Prevotella nigrescens*. Num estudo desenvolvido por Nostro et al., [68], os autores concluíram que o óleo essencial de orégão e os compostos carvacrol e timol inibiram o crescimento do biofilme previamente estabelecido e interferiram na formação de biofilme por duas espécies de *Staphylococcus* (*S. aureus* e *S. epidermidis*). Dalleau et al., [69] verificaram que os terpenos carvacrol, geraniol e timol apresentaram elevada atividade antifúngica contra biofilmes de espécies de *Candida albicans*. Schillaci et al., [70] também verificaram que concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de *Boswellia payrifera* apresentaram atividade anti-biofilme contra o biofilme estabelecido de *S. epidermidis* e *S. aureus*. Com a utilização de concentrações de óleo *B. payrifera* dez vezes superior à CMI verificou-se atividade anti-biofilme contra *S. epidermidis* RP62A e com concentrações sub-inibitórias verificou-se uma prevenção da adesão deste microrganismo. De um modo semelhante, o óleo *B. rivae* apresentou atividade anti-biofilme contra *C. albicans* ATCC 10231 e inibiu a formação do biofilme de *C. albicans*, em concentrações sub-inibitórias.

Deste modo, torna-se relevante o estudo de compostos antimicrobianos naturais, como o linalool, na inibição da formação de biofilme e no biofilme estabelecido de *A. baumannii*.

Capítulo 5 - Objetivos

O patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii* tem vindo a adquirir resistência aos antibióticos e agentes antimicrobianos actualmente disponíveis. Assim de modo a controlar as infeções e disseminação deste patógeno, torna-se relevante o estudo do efeito antimicrobiano de compostos naturais sobre as células planctónicas e biofilmes de *A. baumannii*. Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

- Determinar a atividade antimicrobiana dos compostos maioritários do óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum* isoladamente (linalool, α -pineno, p-cimeno e acetato de geranyl), contra duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e três isolados clínicos (AcB 10/10, AcB23/10 e AcB24/10) de *A. baumannii* em células planctónicas.
- Avaliar o efeito do linalool na formação e em biofilmes pré-formados pelas estirpes de *A. baumannii* em estudo.
- Avaliar a capacidade das estirpes de referência de *A. baumannii* na adesão e formação de biofilmes em diferentes superfícies, nomeadamente aço inoxidável, PVC, alumínio anodizado e latex, assim como o efeito do linalool.
- Estudar o efeito do linalool nos mecanismos de *quorum-sensing*.
- Avaliar a citotoxicidade do linalool em eritrócitos humanos.

Capítulo 6 - Materiais e Métodos:

6.1. Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas duas estirpes de referência de *Acinetobacter baumannii* (LMG 1025 e LMG 1041) obtidas da coleção BCCM/LMG *Bacteria collection* (Gent, Bélgica) e três estirpes clínicas de *A. baumannii* (AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10) isoladas no Hospital Cova da Beira (Covilhã, Portugal). A estirpe AcB 10/10 foi isolada de um cateter de um paciente internado na Unidade de Cuidados intensivos (UCI), a estirpe AcB 23/10 foi isolada de uma hemocultura de um paciente internado no serviço de Cirurgia e a estirpe AcB 24/10 foi isolada de uma urocultura de um paciente do serviço de Urgência.

6.2. Conservação dos microrganismos

Após cultura *overnight* das estirpes de *A. baumannii* em meio sólido *Luria-Bertani* (LB) Agar, inoculou-se uma colônia em 20 mL de meio LB *broth* a 37 °C e 250 rotações por minuto (rpm), até se obter uma densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) igual ou superior a 0.6. Após obtida esta DO, adicionou-se o volume necessário de glicerol de modo a obter uma concentração final de 20% (V/V). Esta suspensão foi distribuída para tubos criogénicos estéreis e foram conservados a -80°C. Anteriormente a cada ensaio realizado, as estirpes foram inoculadas em meio LB agar e incubadas a 37 °C durante 24h, para garantir uma cultura pura.

6.3. Compostos antimicrobianos

Neste trabalho foram utilizados cinco compostos maioritários do óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum* L., nomeadamente o linalool, α -pineno, p-cimeno, acetato de geranil e cânfora, todos obtidos da Sigma-Aldrich. O conhecimento da estrutura química dos compostos é fundamental para a posterior compreensão da ação bacteriana (ver tabela 6.1. e figura 6.1.)

Tabela 6.1. Classificação dos compostos antimicrobianos, de acordo com a estrutura química.

Composto	Classificação
Acetato de geranil	Éster - monoterpeno [3,71]
Cânfora	Cetona - monoterpeno [3,72]
Linalool	Álcool - monoterpeno [3,73]
p-cimeno	Hidrocarboneto - monoterpeno [3,63]
α -pineno	Hidrocarboneto - terpeno bicíclico [3,74]

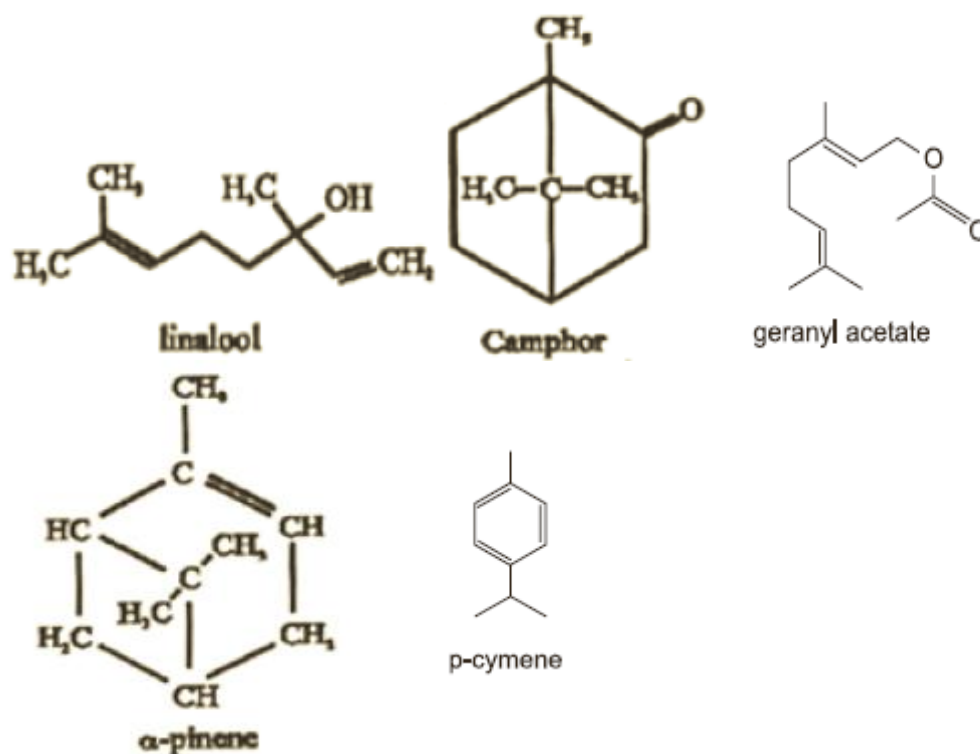


Figura 6.1. Estrutura química do linalool, cânfora, α -pineno, acetato de geranil e p-cimemo (imagem adaptada de Burt, [1] e Rajeshwari e Andallu, [2]).

6.4. Determinação da atividade antimicrobiana

6.4.1. Teste de difusão em disco

Para avaliar a suscetibilidade das cinco estirpes de *A. baumannii* aos cinco compostos maioritários do óleo essencial de sementes de *C. sativum* usou-se o teste de difusão em disco para bactérias, segundo a norma M2-A8 do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*[75].

Para este teste usaram-se as soluções puras dos quatro compostos líquidos (linalool, α -pineno, p-cimeno e acetato de geranil) e fez-se uma solução de cânfora de 200 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Aos discos de papel de filtro estéreis, com diâmetro de 6 mm, foram adicionados 20 μ L de cada umas das soluções previamente descritas. Como controlo negativo utilizou-se o DMSO (20 μ L/disco), uma vez que a cânfora foi dissolvida neste solvente, de modo a controlar a possível inibição do crescimento bacteriano pelo DMSO ou contaminação. Como controlo positivo foi utilizado o antibiótico tetraciclina (adicionou-se ao disco 20 μ L de uma solução de tetraciclina em água a uma concentração de 1.5 mg/mL de modo a obter uma concentração de 30 μ g/disco), pois permite comparar a atividade antibacteriana do antibiótico com a atividade dos compostos. Posteriormente, a partir de uma cultura *overnight*

das estirpes de *A. baumannii* em meio sólido LB agar, preparou-se uma suspensão salina a 0.5 Unidades de McFarland, mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão previamente preparada, girou-se várias vezes e apertou-se firmemente contra a parede interna do tubo (acima do nível do líquido) de modo a retirar o excesso de inóculo da zaragatoa. Numa placa de Mueller-Hinton Agar (MHA) foi então inoculada a suspensão bacteriana, esfregando-se a zaragatoa em toda a superfície do agar. Este procedimento foi repetido 2 vezes, girando a placa aproximadamente 60° de cada vez, a fim de garantir uma distribuição uniforme do inóculo em toda a placa. No final, passou-se a zaragatoa na margem da placa de agar e deixou-se secar aproximadamente 5 min. Os discos previamente preparados, foram então colocados na superfície das placas anteriormente inoculadas e pressionados de encontro ao agar de modo a assegurar o contacto completo com a superfície do mesmo. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 18h. Após o tempo de incubação os halos de inibição foram medidos em milímetros com o auxílio de uma régua. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detetável a olho nu e só foram considerados halos de inibição com diâmetro superior ao diâmetro do disco (6 mm). O teste foi efetuado em triplicado e independentemente.

6.4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos anteriormente descritos sobre as estirpes de *A. baumannii*, utilizou-se o método de microdiluição em meio líquido para bactérias, de acordo com a norma M7-A6 do CLSI [76].

Todos os ensaios foram realizados utilizando meio LB *broth*, uma vez que estudos anteriores verificaram ser o meio mais adequado para ensaios com *A. baumannii*. De forma a aumentar a solubilidade dos compostos, foi adicionado DMSO para uma concentração final máxima de 4% (V/V). A cânfora foi excluída deste ensaio devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso. Após preparação das soluções dos compostos procedeu-se a uma homogeneização vigorosa de modo a obter uma mistura homogénea. Numa placa de 96 poços, para um volume final de 50 µL por poço, realizaram-se diluições sucessivas (1:2) dos compostos nos intervalos de 32-0.25 µL/mL, 256-2 µL/mL, 256-2 µL/mL e 256-2 µL/mL, para o linalool, α-pineno, p-cimeno e acetato de geranil, respetivamente. Após 24h de crescimento das estirpes em meio LB agar a 37 °C, fez-se uma suspensão em solução salina (NaCl 0.85%), acertou-se a uma densidade de 0.5 Unidades de McFarland e fez-se uma diluição 1:100 em meio LB *broth*. Por fim, transferiu-se 50 µL da suspensão bacteriana diluída para cada poço, obtendo-se uma concentração final de 5x10⁵ unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL). Como controlo negativo de crescimento foram usados os poços sem inóculo e como controlo positivo de crescimento os poços sem compostos. A placa foi incubada a 37 °C, durante 16-20h. Após incubação o crescimento foi avaliado visualmente e a CMI foi definida como a menor concentração de composto sem crescimento visível. Os ensaios foram realizados em duplicado e pelo menos

três ensaios independentes. Após a incubação procedeu-se também à determinação da concentração mínima letal (CML), que corresponde à menor concentração de composto que provoca a morte de 99,9% do inóculo bacteriano. Assim, transferiu-se 10 µL, em duplicado, dos poços correspondentes à CMI (sem crescimento visível a olho nu) para placas de petri com LB agar para a determinação da CML, com posterior incubação a 37 °C, durante 24h.

6.4.3. Curvas de morte - fase exponencial e estacionária de crescimento

Para a determinação da suscetibilidade das estirpes de *A. baumannii* em diferentes fases de crescimento (fase exponencial e estacionária) ao linalool (composto que apresentou melhor atividade antimicrobiana), realizaram-se curvas de morte utilizando diferentes concentrações de linalool.

Após crescimento *overnight* das bactérias em meio sólido LB a 37 °C, suspendeu-se uma colónia em meio LB *broth*, inoculou-se 20 mL do mesmo meio de modo a obter uma DO_{600nm} inicial de 0.05 e incubou-se a 37 °C e 250 rpm durante 4 e 12h, estando as células em fase exponencial e estacionária de crescimento, respetivamente. Após o período de incubação acertou-se a DO_{600nm} a 0.1 em meio de cultura e diluiu-se de 1:10. Neste ensaio foram utilizados tubos de vidro rolhados devido à volatilidade do linalool e de modo a permitir as trocas gasosas. Assim, foram preparados 150 µL de solução de linalool nos tubos de modo a obter uma concentração final de 1× e 2× a CMI e adicionou-se 1350 µL de suspensão bacteriana diluída, resultando numa concentração final de 1×10^7 UFC/mL em cada tubo. Como controlos de crescimento bacteriano foram utilizados dois tubos, um com meio de cultura e outro com 1% de DMSO em meio. Os tubos foram incubados a 37 °C, sem agitação e para os tempos de incubação de 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 minutos e 24 horas foram retirados 20 µL de amostra, utilizados para a determinação das UFC/mL, conforme descrito por Chen et al., [77]. Resumidamente, numa placa de 96 poços adicionou-se 180 µL de solução salina a cada poço e adicionou-se 20 µL de amostra para a primeira linha da placa. Posteriormente, efetuaram-se diluições sucessivas (1:10) transferindo 20 µL da primeira linha para 180 µL de solução salina na segunda linha e assim sucessivamente. Por fim, com o auxílio de uma pipeta multicanal retirou-se 10 µL de cada poço, inoculou-se em placas com meio sólido LB e incubou-se a 37 °C durante 24h. Os ensaios foram realizados em triplicado.

6.5. Biofilmes de *A. baumannii*

6.5.1. Avaliação do efeito do linalool em biofilmes de *A. baumannii*

6.5.1.1. Efeito do linalool na formação de biofilme de *A. baumannii*

Para determinar o efeito do linalool sobre a capacidade de formação de biofilme pelas cinco estirpes de *A. baumannii*, seguiu-se o protocolo descrito por Duarte et al., [44]. Foram testadas cinco concentrações de linalool, três concentrações inibitórias (4×, 2× e 1× a CMI) e duas concentrações sub-inibitórias (0.5× e 0.25× a CMI). Numa placa de 96 poços de poliestireno, realizaram-se diluições sucessivas (1:2) de linalool em meio LB *broth*, de modo a obter as concentrações finais desejadas, num volume de 50 µL por poço. Para a preparação do inóculo bacteriano, as estirpes de *A. baumannii* cresceram em meio sólido LB a 37 °C durante 24h, após o tempo de incubação retirou-se uma colónia e fez-se uma suspensão em meio LB *broth*. Desta suspensão, inoculou-se 20 mL do mesmo meio de cultura de modo a obter uma DO_{600nm} inicial de 0.05 e incubou-se a 37 °C e 250 rpm durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, acertou-se a DO_{600nm} a 0.02 e adicionou-se 50 µL de inóculo a cada poço, de forma a obter uma concentração final de 1x10⁷ UFC/mL por poço. Os poços sem composto foram considerados o controlo positivo e os poços apenas com meio de cultura como controlo negativo. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C durante 24h. Devido à grande variabilidade deste ensaio, foram realizados, no mínimo, quintuplicados e três ensaios independentes. Após o tempo de incubação procedeu-se à quantificação da biomassa total do biofilme formado através da coloração com o corante violeta de cristal (VC).

• Coloração com violeta de cristal (VC)

Passado o tempo de incubação, aspirou-se o conteúdo dos poços, lavou-se duas vezes com 150 µL de água e deixou-se secar. Após os poços estarem bem secos, adicionou-se 100 µL de VC a 0.1% (P/V) em água e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Passado este tempo, descartou-se o conteúdo dos poços e lavou-se três vezes com água. Por fim, para solubilizar o corante, adicionou-se 200 µL de uma solução de etanol a 95% e transferiu-se 125 µL de cada poço para outra microplaca. A leitura da absorvância foi realizada num leitor de microplacas a 570 nm.

6.5.1.2. Efeito do linalool sobre o biofilme pré-formado de *A. baumannii*

Para avaliar o efeito do linalool sobre o biofilme previamente formado pelas cinco estirpes de *A. baumannii*, procedeu-se à prévia formação de biofilmes em placas de 96 poços de poliestireno como descrito anteriormente (ponto 6.5.1.1.), com algumas modificações. Resumidamente, adicionou-se 50 µL de inóculo com DO_{600nm} igual a 0.02 (obtida como descrito

anteriormente) a cada poço e, de modo a obter um volume final de 100 µL, completou-se o volume com 50 µL de meio de cultura LB *broth*. Como controlo positivo utilizou-se os poços com suspensão bacteriana e como controlo negativo os poços unicamente com meio de cultura. Após 24h de incubação a 37 °C, aspirou-se cuidadosamente o conteúdo dos poços de modo a evitar a desagregação do biofilme e adicionou-se 100 µL, a cada poço, de diferentes concentrações de linalool (4×, 2×, 1×, 0.5× e 0.25× a CMI). Aos controlos positivo e negativo adicionou-se 100 µL de meio de cultura. Após incubação a 37 °C durante 24h, procedeu-se à quantificação da biomassa total de biofilme, através do ensaio com VC descrito anteriormente.

6.5.1.3. Análise da formação de biofilme através de microscopia eletrónica de varrimento

Para visualizar a morfologia do biofilme formado em poliestireno, recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento a pressão variável. A presente técnica microscópica permite a visualização das amostras hidratadas, durante um período de tempo limitado, uma vez que se verifica uma perda gradual da água presente na amostra, a baixa pressão. A diminuição da temperatura da amostra e da pressão de vácuo terá de ser gradual e não rapidamente, para evitar a formação de cristais de gelo ou de sais do tampão. Os electrões retroespalhados permitem assim a obtenção das imagens de alta resolução [78]. Assim, uma das vantagens desta técnica é que permite a observação de amostras biológicas hidratadas, sem necessidade de haver um pré-tratamento, podendo-se variar a pressão de vácuo e a temperatura da amostra.

A estirpe de *A. baumannii* LMG 1041, foi escolhida para este procedimento uma vez que apresentou uma boa capacidade de formar biofilme em poliestireno. Para realizar este ensaio utilizaram-se quadrados de poliestireno (1×1 cm), que foram previamente mergulhados em etanol puro durante 24h, posteriormente foram colocados no fundo de placas de 24 poços e foram esterilizados por radiação ultravioleta (UV), durante 30 minutos. A cada poço, já com a superfície, adicionou-se 1 mL de suspensão bacteriana, obtida como descrito anteriormente, com uma DO_{600nm} igual a 0.01. De modo a obter um biofilme forte, incubou-se a placa durante 48h a 37 °C. Passado o tempo de incubação e imediatamente antes da visualização, retirou-se o conteúdo dos poços e lavou-se duas vezes com água para retirar todo o meio de cultura e evitar a posterior formação de cristais. Os quadrados de poliestireno com o biofilme formado foram então montados no suporte do porta amostra de alumínio e examinados num microscópio eletrónico de varrimento a pressão variável (HITACHI S3400N).

6.5.2. Avaliação da formação de biofilmes de *A. baumannii* em diferentes superfícies e efeito do linalool

6.5.2.1. Superfícies utilizadas e sua esterilização

Como foi previamente abordado na parte introdutória do presente trabalho, um dos fatores de virulência e patogenicidade da espécie *A. baumannii* é a capacidade que apresenta de formar biofilmes em equipamentos e superfícies hospitalares. Assim, escolheram-se quatro superfícies que podem ser encontradas em ambiente hospitalar, nomeadamente o aço inoxidável, alumínio anodizado, cloreto de polivinilo (do inglês PVC) e latex. Previamente a cada ensaio as superfícies foram lavadas e esterilizadas. Resumidamente, as superfícies de aço inoxidável (2×2 cm), alumínio anodizado (1.5×1 cm) e PVC (1.5×1.5 cm) foram sujeitas a esterilização por calor húmido em autoclave a 121 °C e a esterilização por UV durante 30 minutos, para assim evitar possíveis contaminações. Em relação às superfícies de latex (1×1 cm), estas foram submersas numa solução de hipoclorito de sódio (1%), durante 30 minutos, lavaram-se duas vezes com água estéril e após estarem bem secas procedeu-se à sua esterilização por UV. Como a área das superfícies era variável, utilizaram-se diferentes placas de cultura e os volumes finais foram previamente ajustados para obter a mesma proporção de meio em todas as placas (tabela 6.2.).

Tabela 6.2. Superfícies utilizadas, placas onde foram realizados os ensaios e volume final utilizado por poço.

Superfícies	Placa	Volume final por poço (mL)
Alumínio anodizado	12 poços	1.5
Aço Inoxidável	6 poços	3.5
Latex	24 poços	1.0
PVC	12 poços	1.5

6.5.2.2. Avaliação da formação de biofilmes em diferentes superfícies

Devido ao reduzido número de amostras de superfícies disponíveis, os ensaios foram realizados apenas com as duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG 1025 e LMG 1041. Assim, para avaliar a capacidade de formação de biofilmes nas superfícies previamente preparadas, as estirpes de *A. baumannii* foram colocadas a crescer durante aproximadamente 16h, a 37 °C e 250 rpm em 20 mL de meio LB *broth* (como descrito anteriormente no ponto 6.5.1.1). Após a incubação, acertou-se o inóculo a DO_{600nm} 0.01 e transferiu-se os volumes da suspensão bacteriana apresentados na tabela 6.2. para os poços. Os poços com a superfície e apenas meio LB *broth* foram considerados como controlo negativo de crescimento. No final da

preparação das placas, estas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. Este ensaio foi realizado em triplicado e em dias independentes.

- **Coloração com violeta de cristal (VC)**

Passadas as 24h da formação do biofilme, procedeu-se à quantificação da biomassa total do biofilme através da coloração com o VC. Resumidamente o procedimento foi efectuado como descrito anteriormente (ponto 6.5.1.1), com algumas modificações. Os volumes utilizados foram ajustados tendo em conta a tabela 6.2. Após os 30 minutos de incubação com o VC, descartou-se o conteúdo dos poços e lavou-se três vezes com água. Posteriormente, com o auxílio de uma pinça, transferiu-se cuidadosamente as superfícies para novas placas de cultura e adicionou-se o volume adequado de etanol a 95%. No final, transferiu-se 125 µL para uma placa de 96-poços, e foi lida a absorvância a 570 nm, utilizando um leitor de microplacas.

6.5.2.3. Efeito do linalool na formação de biofilmes nas superfícies

Neste ensaio avaliou-se o efeito do linalool em concentração sub-inibitória (0.5× MIC) na formação de biofilmes de *A. baumannii* nas diferentes superfícies. Os inóculos com DO_{600nm} a 0.01 foram obtidos como descrito anteriormente. A cada poço com a superfície previamente esterilizada, adicionou-se o volume de inóculo adequado (tabela 6.3.) e posteriormente adicionou-se uma solução de linalool de modo a obter uma concentração final de 0.5× CMI. Os poços unicamente com suspensão bacteriana e com meio de cultura foram utilizados como controlo positivo e negativo de crescimento, respetivamente. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. Após o tempo de incubação a biomassa total do biofilme foi avaliada através da coloração com o VC, como descrito no ponto 6.5.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicado e dias independentes.

Tabela 6.3. Volumes de inóculo e soluções de linalool adicionadas às diferentes superfícies.

Superfícies	Volume de inóculo (µL)	Volume de linalool (µL)
Alumínio Anodizado	1350	150
Aço Inoxidável	3150	350
Latex	900	100
PVC	1350	150

6.6. Capacidade de adesão de *A. baumannii* a diferentes superfícies e efeito do tratamento com linalool

A capacidade das cinco estirpes de *A. baumannii* aderirem a várias superfícies foi avaliada através da energia livre de adesão, por aplicação da teoria termodinâmica da adesão, usando medições dos ângulos de contacto.

6.6.1. Preparação das superfícies

Para o estudo da adesão das cinco estirpes de *A. baumannii* a diferentes superfícies, selecionaram-se cinco materiais frequentemente presentes em meio hospitalar - o aço inoxidável, o alumínio anodizado, o latex, o cloreto de polivinilo (PVC), o poliestireno (PS) e um tubo de plástico extraído de um cateter. Previamente à realização dos ensaios, os materiais foram imersos numa solução de detergente comercial à base de amoníaco e secos a 65 °C durante 3h [33].

6.6.2. Preparação dos inóculos

As células de *A. baumannii* foram inoculadas em 20 mL de meio de cultura LB *broth*, incubadas a 37 °C e 250 rpm, após o tempo de incubação acertou-se a DO_{600nm} a 2 ($\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL). Em seguida, prepararam-se as suspensões bacterianas adicionando-se 5mL de inóculo a 5mL da solução de linalool de modo a obter uma concentração final de 0.5× CMI. Como controlo positivo, foram adicionados 5mL de inóculo a 5mL de meio de cultura LB *broth*. Procedeu-se a uma nova incubação a 37 °C e 250 rpm, durante 24h. Após o tempo de incubação, as células bacterianas foram recolhidas através de filtração a vácuo, utilizando filtros de triacetato de celulose com diâmetro de poro de 0.45 μm . Para estabelecer um conteúdo de humidade constante, os filtros com as bactérias, com e sem tratamento prévio, foram colocados em caixas de Petri, contendo uma camada de agar 1% (P/V) em água com 10% de glicerol (V/V) [33].

6.6.3. Ângulos de contacto e energia livre de adesão

Os ângulos de contacto e a energia livre de adesão entre as estirpes de *A. baumannii* e as superfícies foram determinados de acordo com o procedimento descrito por Luís et al., [33].

As medições dos ângulos de contacto nas bactérias e nas superfícies foram realizadas no equipamento OCAH 200 da *DataPhysics Instruments*, aplicando o método da gota séssil. Foram utilizados três líquidos teste com diferentes polaridades - a água desionizada, o etilenoglicol e o diiodometano, tendo-se efetuado pelo menos quatro medições para cada um dos três líquidos. A partir dos valores de ângulo de contacto e conhecendo os parâmetros da tensão superficial dos líquidos teste, calcularam-se as componentes de Lifshitz-van der Waals, ácida e base das bactérias e das superfícies, usando a equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (equação 6.1.) [97]. Nesta equação, θ corresponde ao ângulo de contacto; γ , γ^{LW} , γ^+ e γ^- são, respetivamente, a tensão superficial e as componentes de Lifshitz-van der Waals, ácida e base; L corresponde à fase líquida e S corresponde à fase sólida (bactérias e superfícies). Os valores dos parâmetros da tensão superficial dos líquidos teste foram retirados da literatura [97].

$$\gamma_L(1+\cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} + 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} \quad (\text{equação 6.1.})$$

Para determinar a energia livre de adesão das bactérias aos diferentes materiais (ΔG_{Adh}^{Total}) usou-se o modelo de Lifshitz-van der Waals/ácido-base (equações 6.2., 6.3. e 6.4.). A energia livre de adesão corresponde à soma dos componentes resultantes das interações de Lifshitz-van der Waals (componente LW apolar - ΔG_{Adh}^{LW}) e das interações ácido-base (componente AB polar - ΔG_{Adh}^{AB}) [97].

$$\Delta G_{Adh}^{Total} = \Delta G_{Adh}^{LW} + \Delta G_{Adh}^{AB}$$

(equação 6.2)

$$\Delta G_{Adh}^{LW} = (\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}})^2 - (\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}})^2 - (\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}})^2$$

(equação 6.3)

$$\Delta G_{Adh}^{AB} = 2[\sqrt{\gamma_L^+} (\sqrt{\gamma_B^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) + \sqrt{\gamma_L^-} (\sqrt{\gamma_B^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) - \sqrt{\gamma_B^- \gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_B^+ \gamma_S^-}]$$

(equação 6.4.)

Onde,

LW = componente de Lifshitz-van der Waals

B = Bactéria

S= Superfície

L= Líquido da suspensão

γ^+ = Componente ácida

γ^- = Componente base

Segundo a teoria termodinâmica, quando ΔG_{Adh}^{Total} é negativo a adesão é favorecida, mas se ΔG_{Adh}^{Total} for positivo a adesão é energeticamente desfavorável. Assim, quando ΔG_{Adh}^{Total} aumenta a adesão das bactérias às superfícies deverá diminuir.

6.7. Atividade anti-*Quorum-sensing* (QS)

Uma vez que o *Quorum-sensing* (QS) tem sido associado à adesão bacteriana inicial e à formação de biofilmes em superfícies, o efeito do linalool no QS foi estudado usando a estirpe biossensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 através do ensaio de difusão em disco. Este ensaio laboratorial permitirá verificar o efeito do linalool sobre a produção da violaceína

(pigmento violeta) pela bactéria *C. violaceum*, sendo que a produção de pigmento é controlado por mecanismos de QS. Assim, se houver inibição do QS pelo linalool, observar-se-à inibição do crescimento e/ou pigmento da estirpe biossensor.

Para a realização deste ensaio seguiu-se o procedimento descrito por Singh et al., [79], com algumas modificações. Resumidamente, a estirpe *C. violaceum* ATCC 12472 foi inoculada em meio sólido LB agar e incubada *overnight* a 30°C e seguidamente transferida para 20 mL de meio LB *broth* e incubou-se a 30 °C e 150 rpm durante 16h. Após incubação, acertou-se a DO_{600nm} a 1 e inocou-se uma placa de meio LB agar, com o auxílio de uma zaragatoa tal como descrito no ponto 6.4.1. Adicionou-se 20 µL de linalool a discos estéreis, transferiram-se para a placa previamente inoculada e incubou-se a 30 °C, durante 24h. Após incubação, mediu-se o halo de inibição de crescimento e de pigmento com o auxílio de uma régua. Este ensaio foi realizado em triplicado, em ensaios independentes.

6.8. Citotoxicidade - atividade hemolítica

O estudo da atividade antibacteriana do linalool é fundamental, no entanto, para possíveis aplicações deste composto no controlo de *A. baumannii* é imprescindível estudar a sua toxicidade para o ser humano. Deste modo, realizou-se o ensaio de hemólise para avaliar o efeito do linalool em eritrócitos humanos.

Para a realização deste ensaio seguiu-se o protocolo descrito por Duarte et al., [44]. Resumidamente, foi recolhida uma amostra de sangue de um indivíduo saudável e colocada em tubos de vácuo com EDTA (anticoagulante). Posteriormente, os eritrócitos foram separados dos restantes constituintes do sangue por centrifugação a 2000 rpm a 20 °C durante 10 minutos. Após lavagem três vezes com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), adicionou-se PBS ao *pellet*, de modo a obter uma suspensão de 10% (V/V) de eritrócitos/PBS. Esta suspensão foi diluída 1:10, originando uma solução de 1% de eritrócitos/PBS. Numa microplaca de 96 poços de fundo em V efetuaram-se diluições sucessivas de linalool para um volume final de 100 µL e adicionou-se 100 µL da suspensão de eritrócitos/PBS. O triton X - 100 a 1% foi utilizado como controlo positivo de hemólise e o PBS como controlo negativo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora e, posteriormente, foram centrifugadas a 2000 rpm e 20 °C durante 10 minutos. Do sobrenadante transferiu-se 100 µL para uma microplaca de 96 poços com fundo plano e mediu-se a absorvância a 450 nm. Os ensaios realizaram-se em triplicado e a percentagem de hemólise foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\frac{A_{450nm} \text{ amostra com linalool} - A_{450nm} \text{ amostra com PBS}}{A_{450nm} \text{ amostra com Triton} - A_{450nm} \text{ amostra com PBS}} \times 100\% \quad (\text{Equação 6.5.})$$

6.9. Equipamentos utilizados

Na elaboração do trabalho laboratorial da presente dissertação foram utilizados vários equipamentos (ver tabela 6.4.), assim como material comum de laboratório.

Tabela 6.4. Descrição dos equipamentos utilizados no decorrer do presente trabalho laboratorial.

Equipamento	Marca/Modelo	País/Origem
Arca fria (-80° C)	US35 Innova	Portugal
Autoclave	Uniclave 88 e 77	Portugal
Balança	KERN	Alemanha
Câmara de Fluxo Laminar	Aura 2000	Itália
Câmara fria (4° C)	Dagard	França
Centrífuga refrigerada	Beckam Coulter/ Allegra X - 22R	-
Densímetro	Densimat	Itália
Eléctrodo de pH	Metrohm	-
Espectofotómetro	Ultrospec®3000	Cambridge, Inglaterra
Esterilizador	Memmert	-
Estufa - 37° C	Binder	Alemanha
Estufa - 30° C	P selecta	Espanha
Incubador Orbital	Aralab (Agitorb 200)	Lisboa, Portugal
Leitor de Microplacas	Anthos 2020	Inglaterra
Microscópio Electrónico de Varrimento a baixo vácuo	Hitachi/S3400N	-
Vortex	Labnet	Edison, NJ USA

6.10. Reagentes utilizados

Para a execução deste trabalho experimental foi necessário o recurso a diversos reagentes químicos (tabela 6.5.).

Tabela 6.5. Descrição dos reagentes, marca, grau de pureza e país/Origem, utilizados no decorrer do presente trabalho laboratorial.

Reagente	Grau de pureza (%)	Marca	País/Origem
Linalool	97%	Sigma - Aldrich	USA
α -pineno	98%	Sigma - Aldrich	USA
p-cimeno	99%	Sigma - Aldrich	-
Acetato de Geranil	98%	Sigma - Aldrich	Alemanha
Cânfora	96%	Sigma - Aldrich	Alemanha
Tetraciclina	-	USB	França
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	VWR BDH Prolabo	-
Triton X - 100	-	Fisher	-
Cloreto de sódio	-	Pronalab	Lisboa
LB Agar	-	Pronadisa	Espanha
Müeller Hinton Agar	-	Liofilchem	Itália
LB <i>Broth</i>	-		-
Glicerol	87%	VWR BDH Prolabo	França
Etanol	99,9%	Manuel Vieira & C ^a (Irmão), Lucrs, Lda	Portugal
Violeta de cristal	-	AMRESCO	Solon, Ohio

Capítulo 7 - Resultados e Discussão

7.1. Atividade antimicrobiana dos compostos naturais

A resistência de *A. baumannii* a diversos antibióticos e antimicrobianos tornou relevante a procura de soluções para combater esta problemática. Os agentes antimicrobianos naturais podem ser uma alternativa aos agentes convencionais disponíveis. Assim, neste trabalho estudou-se a atividade antimicrobiana dos compostos majoritários isolados do óleo essencial de sementes de *C. sativum* contra cinco estirpes de *A. baumannii* (duas de referência e três isolados clínicos).

Um dos métodos utilizados para determinar a atividade antimicrobiana dos cinco compostos em estudo foi o método de difusão em disco. Este método permite apenas uma análise qualitativa da suscetibilidade de um microrganismo a um dado composto, pois o diâmetro do halo de inibição depende da capacidade dos compostos antimicrobianos se difundirem uniformemente, através da placa de ágar. O diâmetro depende também da atividade antimicrobiana associada ao composto, da sua solubilidade e das várias características do microrganismo [54,80]. Os diâmetros dos halos de inibição do acetato de geranil, cânfora, linalool, p-cimeno e α -pineno para as cinco estirpes de *A. baumannii* estão apresentados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Diâmetros (mm) dos halos de inibição dos compostos e dos controlos (tetraciclina e DMSO) para as estirpes de *A. baumannii* (Média \pm Desvio Padrão).

Estirpe	Acetato de geranil	Cânfora	Linalool	p-cimeno	α -pineno	DMSO	Tetraciclina
LMG 1025	11.00 \pm 1.41	6.00 \pm 0.00	63.50 \pm 2.12	11.50 \pm 0.71	10.50 \pm 2.12	6.00 \pm 0.00	25.00 \pm 0.00
LMG 1041	10.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	24.50 \pm 0.71	8.00 \pm 0.00	8.50 \pm 0.71	6.00 \pm 0.00	22.00 \pm 0.00
AcB 10/10	10.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	20.00 \pm 0.00	8.50 \pm 0.71	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00
AcB 23/10	10.50 \pm 0.71	6.00 \pm 0.00	24.50 \pm 0.71	9.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00
AcB 24/10	9.50 \pm 0.71	12.50 \pm 0.71	50.00 \pm 1.41	11.50 \pm 2.12	11.00 \pm 1.41	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00

Através do método de difusão em disco, observou-se que a cânfora não apresentou atividade antimicrobiana contra todas as estirpes de *A. baumannii* testadas (halo de inibição de 6 mm), exceto contra a estirpe AcB 24/10 onde se observou um halo de inibição de 12.5 mm. Por outro lado, o linalool foi o composto que demonstrou melhor atividade antimicrobiana, uma vez que se observaram halos de inibição entre 20 e 63.5 mm contra todas as estirpes analisadas (Tabela 7.1.). Em relação ao p-cimeno, acetato de geranil e α -pineno observaram-se halos de inibição entre 8-11.5 mm, 9.5-11 mm e 6-11 mm, respetivamente, indicando uma baixa atividade antimicrobiana deste compostos. Em geral, as estirpes AcB 10/10 e AcB 23/10 foram menos suscetíveis aos compostos testados do que as restantes. Em relação ao

antibiótico de controlo (tetraciclina), verificou-se que as estirpes clínicas (AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10) são resistentes a este antibiótico (halo de inibição de 6 mm), enquanto as estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) são sensíveis (halos de inibição de 25 mm e 22 mm, respetivamente). Assim, conclui-se que o linalool foi o composto com melhor atividade antimicrobiana contra *A. baumannii*.

Outro método utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos em estudo, foi a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima letal (CML) dos compostos. A CMI é definida como a menor concentração de composto capaz de inibir o crescimento do microrganismo em estudo. A CML é a concentração de composto que inibe o crescimento de 99,9% das bactérias [52]. Para a determinação da CMI e CML, utilizou-se a técnica da microdiluição em meio líquido, onde nos poços das microplacas, são incorporadas várias diluições do linalool no meio de cultura. Assim, a cada poço com uma concentração diferente de linalool foram adicionados os inóculos das estirpes de *A. baumannii* e após incubação foi determinada a CMI.

Os resultados relativos à determinação da CMI e CML dos compostos em estudo estão apresentados na tabela 7.2. A cânfora foi excluída deste ensaio, uma vez que este composto apresentou uma baixa solubilidade aquosa e não se conseguiu dissolver em meio de cultura, exceto em baixas concentrações, mas que não mostraram atividade antibacteriana (resultados não apresentados).

Tabela 7.2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Letal (CML), em $\mu\text{L/mL}$, dos compostos em estudo contra cinco estirpes de *A. baumannii*.

Compostos	LMG 1025		LMG 1041		AcB 10/10		AcB 23/10		AcB 24/10	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
Linalool	2	2	4	4	8	8	8	8	4	4
α -pineno	64	64	64	64	64	>128	64	64	32	32
p-cimeno	256	256	128	128	128	128	256	256	256	256
Acetato de geranil	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64

Através dos resultados obtidos pela determinação da CMI, pode concluir-se que o p-cimeno foi o composto com menor atividade antibacteriana contra as estirpes de *A. baumannii* em estudo, uma vez que apresentou valores de CMI muito elevados para todas as estirpes (tabela 7.2.). Por sua vez, o α -pineno e o acetato de geranil apresentaram valores de CMI mais baixos do que o p-cimeno, apresentando assim uma maior atividade antimicrobiana contra as estirpes em estudo e o linalool foi o composto com melhor atividade antimicrobiana (valores de CMI entre 2 e 8 $\mu\text{L/mL}$). A estirpe de referência LMG 1025 foi a mais suscetível ao linalool (CMI igual 2 $\mu\text{L/mL}$), enquanto as estirpes clínicas AcB 10/10 e AcB 23/10 apresentaram a

maior CMI (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$). De um modo geral, os valores da CML foram iguais à CMI, indicando que os quatro compostos em estudo têm atividade bactericida.

Comparando os resultados obtidos através dos dois métodos de determinação da atividade antimicrobiana, pode concluir-se que os resultados obtidos são semelhantes, uma vez que em ambos os métodos se observou que o linalool foi o composto com melhor atividade antibacteriana e os restantes compostos apresentaram atividade semelhantes entre eles, mas inferior à do linalool.

Um estudo recente do nosso grupo de investigação sobre o efeito antibacteriano do óleo essencial de sementes de *C. sativum* contra estirpes de *A. baumannii*, demonstrou a atividade bactericida deste óleo com valores de CMI de 1 e 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ [44]. No presente estudo, utilizando os compostos maioritários isolados deste mesmo óleo essencial contra estirpes de *A. baumannii*, obtiveram-se, em geral, valores mais elevados de CMI para todos os compostos, observando-se no entanto, o mesmo efeito bactericida. Estes resultados, podem dever-se ao facto de o óleo essencial ser uma mistura de vários compostos, podendo estes atuar sinergicamente e assim o óleo ter melhor atividade antimicrobiana relativamente aos seus compostos isolados [4].

Para outras bactérias, os resultados obtidos por Soković et al., [81] foram semelhantes aos obtidos neste trabalho, uma vez que demonstraram que o linalool apresentou atividade antimicrobiana contra as 11 bactérias em estudo com halos de inibição entre 8-20 mm e CMIs entre 4 e 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No entanto, este composto apresentou baixa atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* (halo de inibição de 8 mm e CMI de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), uma bactéria muito similar a *A. baumannii*. Em relação ao α -pineno, neste estudo demonstrou-se que, este composto teve alguma atividade antibacteriana, apesar de menor que a do linalool, com halos de inibição entre 6 e 11 mm. Resultados semelhantes foram obtidos por Soković et al., [81], no entanto este estudo mostrou mais uma vez que a estirpe de *P. aeruginosa* apresentou menor suscetibilidade a este composto. No mesmo estudo demonstrou-se a atividade antibacteriana da cânfora (halo de inibição entre 8-19 mm), ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo em que este composto não apresentou atividade antimicrobiana, exceto para a estirpe AcB24/10 (halo de inibição de 12.5 mm).

Também um estudo desenvolvido por Carson e Riley, [80], demonstrou a atividade antibacteriana do linalool, com valores de CMI de 0.06 e 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respetivamente. Neste estudo os valores da CML foram iguais aos da CMI, demonstrando a atividade bactericida deste composto, tal como se demonstrou no presente estudo contra *A. baumannii*. Por outro lado, o p-cimeno foi o composto que apresentou menor atividade antimicrobiana, com valores de CMI superiores a 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Estes

dados apoiam os resultados obtidos neste trabalho, confirmando a baixa atividade antimicrobiana do p-cimeno contra *A. baumannii*.

A baixa atividade dos hidrocarbonetos em geral, independentemente da sua estrutura, deve-se às suas limitações nas ligações de hidrogénio e na solubilidade em água [81]. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito, uma vez que os hidrocarbonetos p-cimeno e α -pineno foram os compostos que apresentaram menor atividade antibacteriana contra *A. baumannii*. Também foi descrito que os álcoois são fortes agentes antimicrobianos e a sua atividade é dependente do grupo funcional que os compostos contêm [81]. Os resultados obtidos para o linalool (álcool monoterpeneo) neste trabalho estão de acordo com os dados previamente descritos, uma vez que foi o composto que apresentou melhor atividade antibacteriana.

Em geral, neste trabalho observaram-se diferenças nas atividades antimicrobianas dos compostos testados contra *A. baumannii*, sendo o linalool o composto com melhor atividade. Vários estudos com outros microrganismos também referem o potencial efeito antibacteriano do linalool. No entanto há vários fatores que podem contribuir para as diferenças do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais ou dos seus compostos isolados, nomeadamente, diferenças nas técnicas analíticas, volatilidade e baixa solubilidade do composto, práticas agronómicas e de processamento, sendo assim suscetíveis de influenciar as propriedades antimicrobianas [82].

A determinação da atividade antimicrobiana através do tempo necessário para causar a morte das bactérias apresenta uma relevância clínica, pois permite a otimização da dose para um tratamento mais eficaz [83]. Os agentes antimicrobianos podem apresentar atividade bactericida e/ou bacteriostática. A actividade bacteriostática consiste na inibição do crescimento microbiano, enquanto na actividade bactericida se verifica a morte microbiana [84]. Através das curvas de morte é possível determinar se a inibição bacteriana é dependente da concentração de agente antibacteriano e/ou do tempo de contacto com o mesmo [84]. Deste modo, no presente trabalho laboratorial procedeu-se à avaliação do efeito de diferentes concentrações de linalool (composto com melhor atividade antimicrobiana), durante 24 horas, sobre as cinco estirpes de *A. baumannii* em duas fases de crescimento: fase exponencial (Figura 7.1.) e fase estacionária (Figura 7.2.).

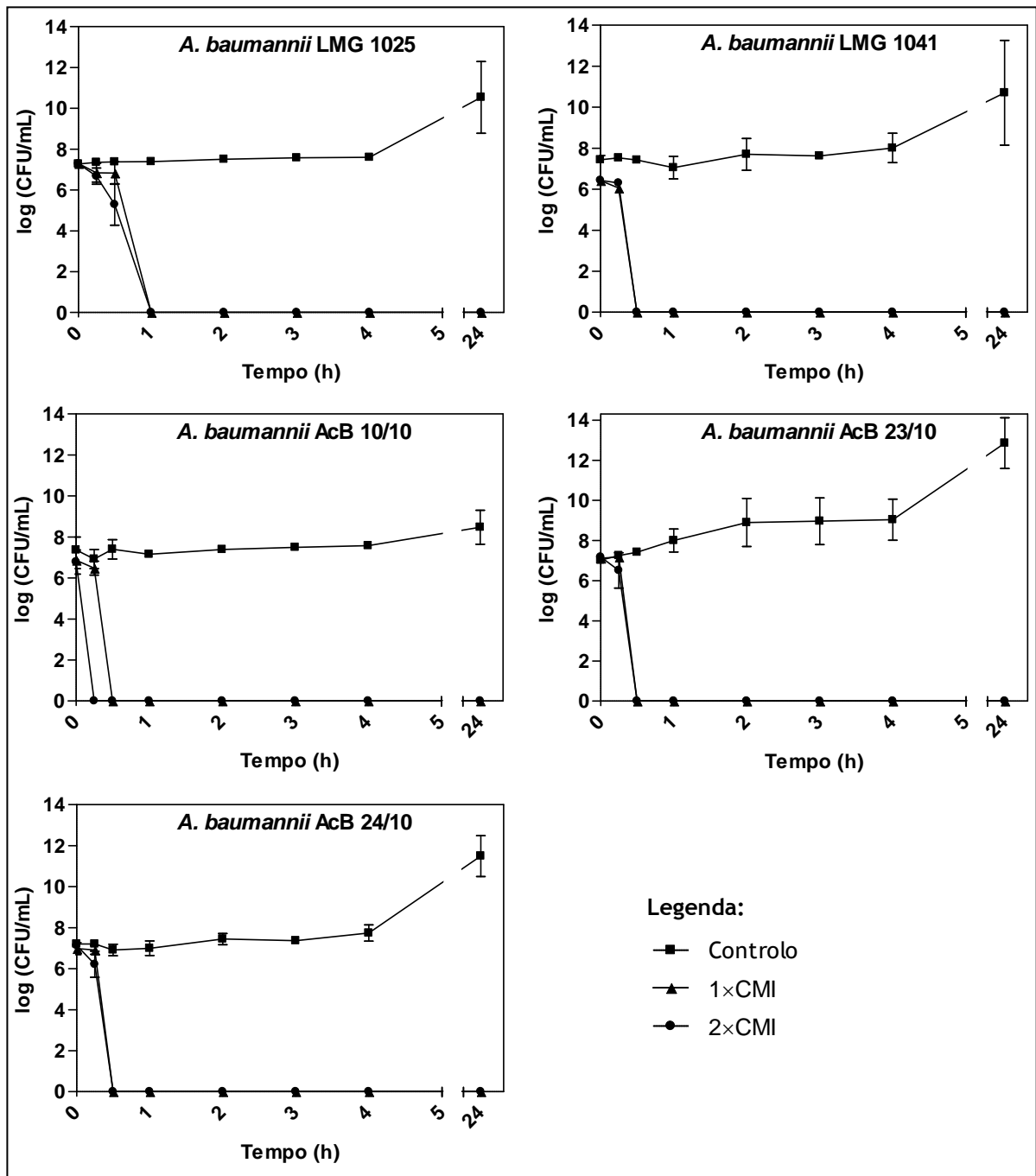


Figura 7.1. Representação gráfica das curvas de morte do efeito do linalool sobre estirpes de *A. baumannii* em fase de crescimento exponencial: efeito de diferentes concentrações de linalool (1x e 2x a CMI) e controlo sobre duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e três estirpes clínicas (AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10) de *A. baumannii*.

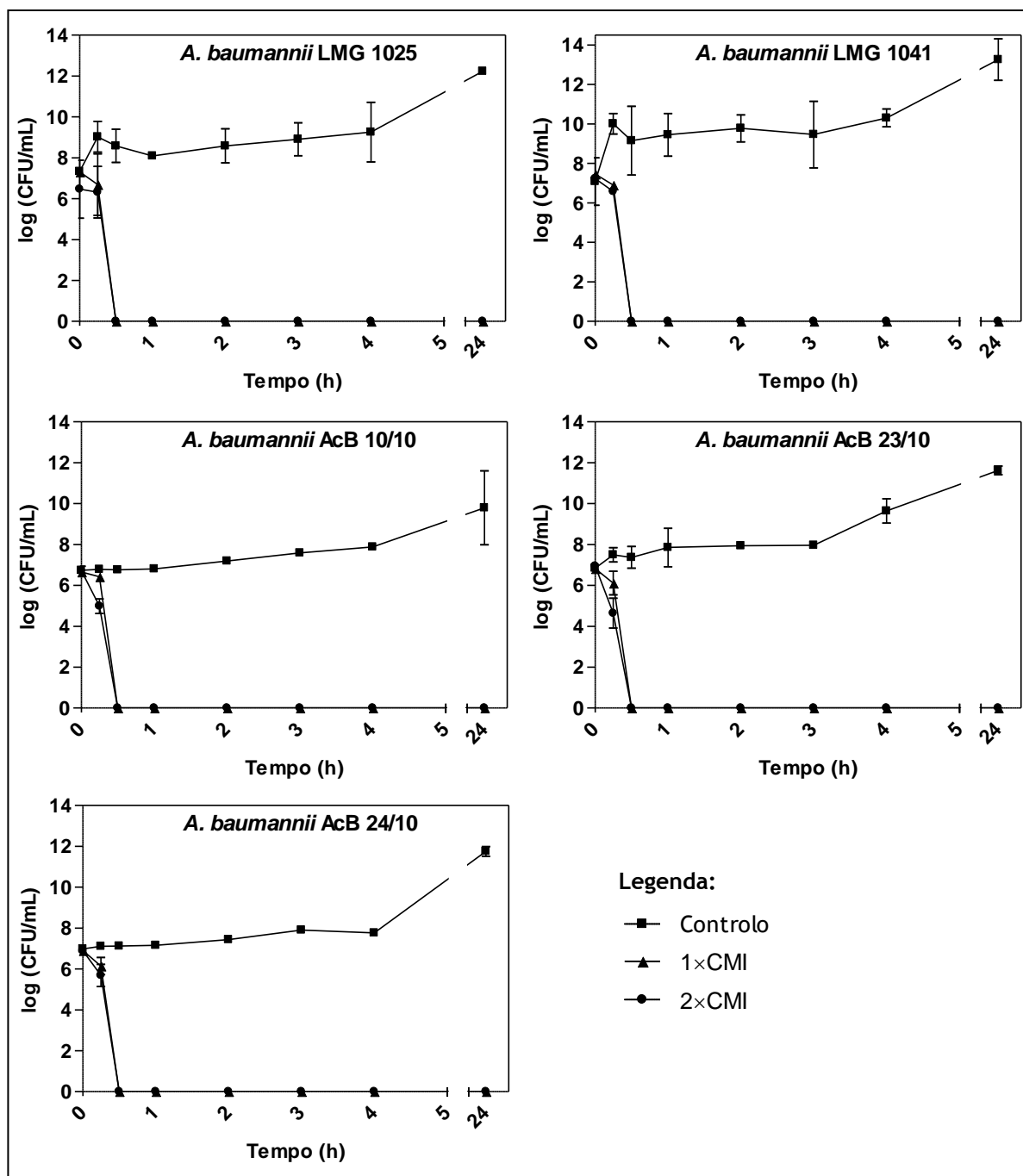


Figura 7.2. Representação gráfica das curvas de morte do efeito do linalool sobre estirpes de *A. baumannii*, em fase de crescimento estacionária: efeito de diferentes concentrações de linalool (1x e 2x a CMI) e controlo sobre duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e três estirpes clínicas (AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10) de *A. baumannii*.

Como se pode observar pelas representações gráficas das curvas de morte (Figuras 7.1. e 7.2.), utilizando duas concentrações inibitórias (1× e 2× a CMI) de linalool nas cinco estirpes de *A. baumannii*, verificou-se que este composto exerceu um efeito bactericida sobre todas as estirpes, tanto em fase exponencial, como em fase estacionária de crescimento. Através do “Controlo” também se pode observar que a concentração de DMSO utilizada não exerce

efeito no crescimento das estirpes em estudo, pois o efeito foi sobreponível ao controlo com meio (resultado não apresentado).

Para melhor se analisarem os resultados obtidos em relação às curvas de morte, fez-se uma tabela onde estão indicados os tempos de incubação com linalool onde se verificou a total inibição do crescimento das cinco estirpes de *A. baumannii* nas duas fases de crescimento estudadas (tabela 7.3.).

Tabela 7.3. Tempo de incubação (em minutos) ao qual se observou total inibição do crescimento das estirpes de *A. baumannii* nas duas fases de crescimento, utilizando duas concentrações inibitórias de linalool.

<i>A. baumannii</i>	1× CMI		2× CMI	
	Fase exponencial	Fase estacionária	Fase exponencial	Fase estacionária
LMG 1025	60	30	60	30
LMG 1041	30	30	30	30
AcB 10/10	30	30	15	30
AcB 23/10	30	30	30	30
AcB 24/10	30	30	30	30

Na fase de crescimento exponencial, verificou-se uma inibição total do crescimento, utilizando as duas concentrações inibitórias de linalool, após 60 minutos de incubação para a estirpe de referência LMG 1025 e após 30 minutos de incubação para todas as outras estirpes, excepto para a estirpe clínica AcB 10/10 onde se verificou inibição do crescimento após 15 minutos de incubação com o dobro da CMI de linalool (Tabela 7.3.). Por outro lado, na fase de crescimento estacionário, verificou-se um efeito inibitório do crescimento de todas as estirpes de *A. baumannii*, utilizando as duas concentrações inibitórias, aos trinta minutos de incubação (Tabela 7.3.). O rápido efeito letal do linalool, pode estar associado à disrupção da membrana celular das estirpes de *A. baumannii* estudadas, uma vez que já se provou que este será o modo de acção do óleo essencial de sementes de *C. sativum* [56].

Os resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de investigação, demonstraram um efeito letal do óleo essencial de *C. sativum*, utilizando a concentração mínima inibitória, aos 30 minutos de incubação para a estirpe de *A. baumannii* LMG 1025 e aos 15 minutos para a estirpes LMG 1041 em fase de crescimento exponencial [44]. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se observar que o linalool tem um efeito antibacteriano ligeiramente mais lento do que o óleo essencial de sementes de *C. sativum* contra as células de *A. baumannii*. Este efeito mais rápido do óleo essencial, em comparação com o linalool isolado, poderá dever-se mais uma vez ao facto do óleo ser uma mistura de vários compostos que podem atuar sinergicamente, aumentando assim o efeito individual de cada composto

[4]. Em relação à fase estacionária, os resultados obtidos anteriormente revelaram um efeito letal do óleo de sementes de *C. sativum* às 3h de incubação para a estirpe LMG 1025 e aos 15 minutos para a estirpe LMG 1041, utilizando uma concentração mínima inibitória [44]. No entanto, ao contrário do verificado com as células em fase exponencial, neste estudo observou-se que o linalool apresenta uma ação mais rápida para a estirpe LMG 1025 (30 min), enquanto o tempo de inibição para a estirpe LMG 1041 manteve-se (30 min). Também, Caplin et al., [85], estudaram o efeito do linalool em estirpes de *S. aureus*, verificando que este composto apenas promoveu a total inibição bacteriana após 2 horas e 30 minutos de incubação. Assim, através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o linalool tem um efeito antibacteriano mais rápido em células de *A. baumannii* do que, por exemplo, em células de *S. aureus*.

De um modo geral, as células de *A. baumannii* apresentaram suscetibilidade idêntica ao linalool, quer na fase de crescimento exponencial, quer na fase estacionária. No entanto, vários estudos, demonstraram que as células na fase exponencial de crescimento são mais sensíveis aos agentes antimicrobianos comparativamente com as células em fase estacionária. Tal como já foi referido, Duarte et al., [44] demonstraram que as células de *A. baumannii* em fase exponencial foram mais susceptíveis à ação do óleo de *C. sativum* do que as células em fase estacionária. Outro estudo revelou uma maior resistência das células de *Escherichia coli* em fase de crescimento estacionária comparativamente à fase exponencial, devido às diferenças fisiológicas e à expressão de genes na fase estacionária [86]. Também Longbottom et al., [87] verificaram que estirpes de *P. aeruginosa* foram mais sensíveis à ação antibacteriana do óleo essencial de *Tea tree* na fase de crescimento exponencial. O mesmo efeito foi observado por Kwieciński et al., [88], sobre o efeito do óleo essencial de *Tea Tree* em células de *Staphylococcus aureus*.

As bactérias no meio e no final da fase de crescimento estacionária crescem sob limitações de nutrientes e na presença de metabolitos tóxicos e, portanto, são mais robustas e heterogêneas relativamente à fase inicial de crescimento. Assim, na fase estacionária as bactérias secretam grandes quantidades de substâncias poliméricas extracelulares, o que pode influenciar as propriedades da superfície das bactérias, tornando-as mais resistentes a agentes antimicrobianos [36]. No entanto e ao contrário do que está descrito na literatura para outras bactérias, no presente estudo verificou-se que o efeito do linalool nas duas fases de crescimento de *A. baumannii* foi semelhante. Este resultado poderá dever-se ao fato do linalool ser um álcool e atuar rapidamente sobre a parede celular das bactérias, no entanto para justificar estes resultados serão necessários fazer mais estudos.

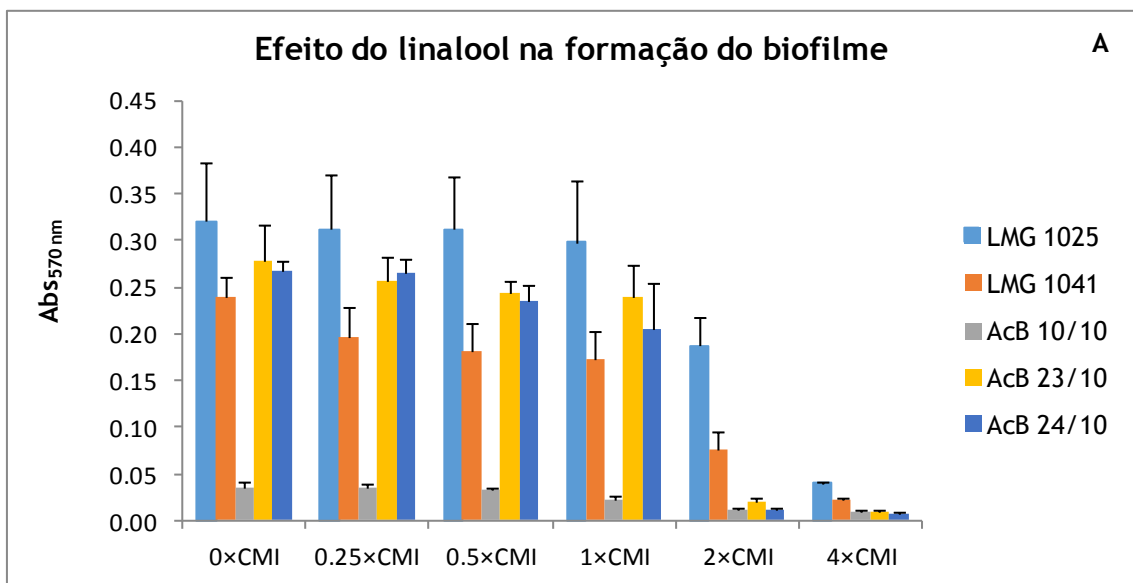
Em suma, tendo em conta os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o linalool apresentou um rápido e eficaz efeito bactericida contra as cinco estirpes de *A. baumannii*,

podendo ser um potencial agente antibacteriano no controlo de infeções por este patógeno hospitalar.

7.2. Efeito do linalool em biofilmes de *A. baumannii*

7.2.1.1. Efeito do linalool na formação de biofilmes de *A. baumannii*

A. baumannii é um patógeno clinicamente relevante, pois apresenta resistência a vários antibióticos comercialmente disponíveis, devido a vários fatores, entre eles a sua capacidade de formar biofilmes. Assim, torna-se importante o estudo de novos agentes antimicrobianos, na inibição da formação de biofilmes de *A. baumannii*. Assim, avaliou-se a ação de cinco concentrações de linalool (0.25, 0.5, 1, 2 e 4 × CMI), sobre a formação de biofilmes de *A. baumannii*, através da quantificação da biomassa total de biofilme formado pelo ensaio do VC. Os resultados obtidos foram expressos através da absorvância obtida a 570 nm após coloração com o VC (Fig. 7.3. A) e calculou-se a percentagem de inibição da formação do biofilme (Fig. 7.3. B).



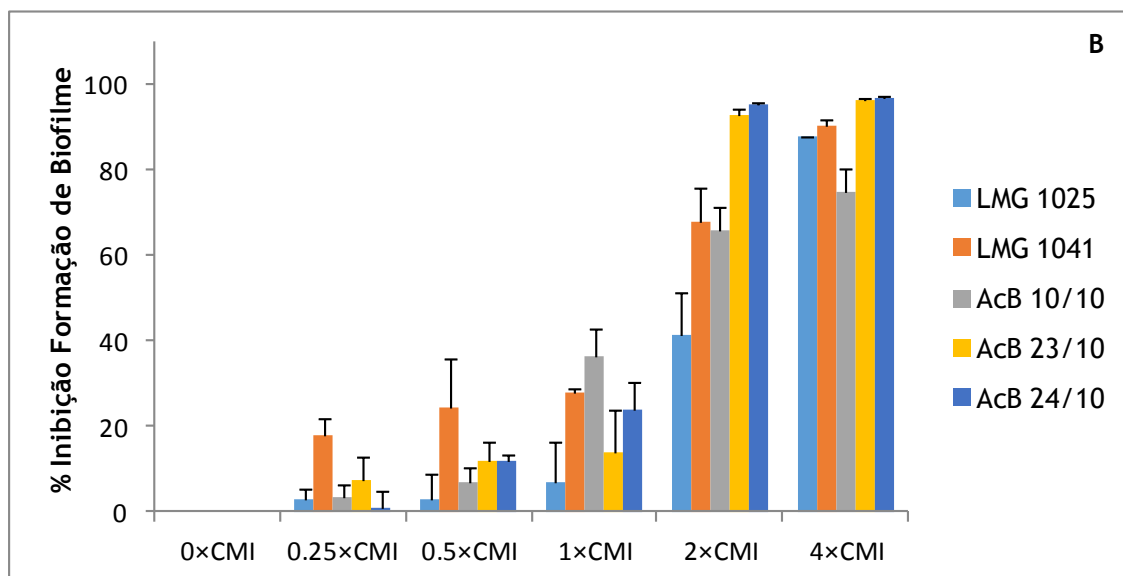


Figura 7.3. Efeito do linalool sobre a formação do biofilme de *A. baumannii*. Quantificação da biomassa total de biofilme pelo método do Violeta de Cristal (A) e percentagem de inibição de biofilme formado (B).

Através dos resultados obtidos e considerando a formação de biofilme sem adição de linalool (0x CMI), pode observar-se que a estirpe de *A. baumannii* LMG 1025 é a que apresenta maior capacidade de formação de biofilme, seguida das estirpes AcB 23/10 e AcB24/10. Por sua vez, a estirpe AcB 10/10 é a que apresenta menor capacidade de formar biofilme (Fig. 7.3. A).

Em relação ao efeito do linalool na capacidade de formação de biofilmes das cinco estirpes de *A. baumannii*, verificou-se que as concentrações sub-inibitórias de linalool testadas (0.25x e 0.5x a CMI) tiveram um efeito inibitório na formação de biofilmes pelas cinco estirpes de *A. baumannii*. Utilizando as concentrações sub-inibitórias de linalool 0.25x e 0.5x a CMI observaram-se as menores percentagens de inibição (2.78% e 2.74%) para a estirpe LMG 1025 e as maiores (17.88% e 24.29%) para a estirpe LMG 1041. Em relação às estirpes clínicas o efeito inibitório foi semelhante para as três, AcB10/10 (3.66% e 6.78%), AcB23/10 (7.63% e 12.06%) e AcB24/10 (1.08% e 12.07%), sendo a diferença de inibição com as duas concentrações mais evidente para a estirpe AcB 24/10 (Figura 7.3. B).

Também Szczepanski et al., [35], observaram que as concentrações de óleo de tomilho, orégão e canela inferiores à CMI inibiram a formação de biofilmes por espécies de *Sphingomonas* e de *Acinetobacter*. Neste estudo, obtiveram-se resultados semelhantes, uma vez que as concentrações de linalool inferiores à CMI também mostraram capacidade de inibir a formação de biofilmes por *A. baumannii*.

Tal como esperado, as maiores percentagens de inibição da formação dos biofilmes foram obtidas utilizando 4x a CMI, sendo de 87.66% para a estirpe LMG 1025, 90.63% para a LMG

1041 e 75.06%, 96.37% e 97.10% para as estirpes AcB 10/10, 23/10 e 24/20, respetivamente. Para todas as estirpes observou-se uma inibição máxima igual ou superior a 90%, exceto para as estirpes LMG 1025 e AcB 10/10 onde apenas se observou uma inibição de 87.66% e 75.06%, respetivamente (Figura 7.3. B). Também se observou uma menor formação de biofilme com a utilização de 2x a CMI. No entanto, esperava-se uma menor formação de biofilme quando utilizada 1x a CMI, uma vez que é a concentração mínima capaz de inibir as estirpes bacterianas. As elevadas percentagens de formação de biofilme com 1x a CMI, entre 63.60% e 93.03%, podem dever-se ao facto dos inóculos bacterianos utilizados na determinação da CMI e na formação do biofilme estarem em diferentes fases de crescimento, uma vez que para a determinação da CMI os inóculos foram obtidos diretamente do meio sólido e para a formação de biofilmes os inóculos foram sujeitos a um crescimento prévio em meio de cultura líquido. Outra explicação poderá ser devido a facto do linalool inibir unicamente as células de *A. baumannii* das camadas superficiais do biofilme, permanecendo células viáveis nas camadas mais internas [49].

Estudos anteriores, demonstraram que o óleo essencial de *C. sativum*, cujo composto maioritário é o linalool, apresentou percentagens de inibição da formação de biofilmes por estirpes de *A. baumannii* superiores a 85% ao utilizar 2x a CMI. Também demonstraram que concentrações inferiores à CMI tiveram efeito inibitório na formação de biofilmes [44]. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, demonstrando assim que a atividade anti-biofilme do óleo essencial de *C. sativum*, poderá dever-se maioritariamente ao linalool. Kwieciński et al., [88] determinaram a influência de várias concentrações de óleo essencial de *tea tree* na formação de biofilmes de *S. aureus*. Ao contrário do observado no presente estudo, utilizando concentrações de óleo inferiores à CMI não se verificou alteração no número de células do biofilme, mas observou-se um aumento da atividade metabólica das mesmas. Porém, ao utilizarem 1x e 2x a CMI observou-se uma diminuição no número de células e da atividade metabólica.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a ação do linalool na inibição da formação de biofilmes, por cinco estirpes de *A. baumannii*, podendo assim ser utilizado futuramente, por exemplo como desinfetante, no combate de biofilmes formados por este patógeno.

7.2.1.2. Efeito do linalool em biofilmes pré-formados de *A. baumannii*

Os biofilmes apresentam elevada resistência a antibióticos e desinfetantes, comparativamente com as células planctónicas [42]. Assim, torna-se relevante o estudo do efeito de agentes antimicrobianos naturais, como o linalool, na dispersão de biofilmes de estirpes de *A. baumannii*, podendo este ser utilizado futuramente na desinfecção de superfícies contaminadas por este patógeno. Deste modo, procedeu-se ao estudo da ação de

cinco concentrações de linalool (0.25, 0.5, 1, 2 e 4× a CMI) sobre os biofilmes previamente formados pelas cinco estirpes de *A. baumannii*.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 7.4., onde os resultados foram expressos através da absorvância obtida a 570 nm após coloração com o VC (Fig. 7.4. A) e pela percentagem de inibição do biofilme formado (Fig. 7.4. B).

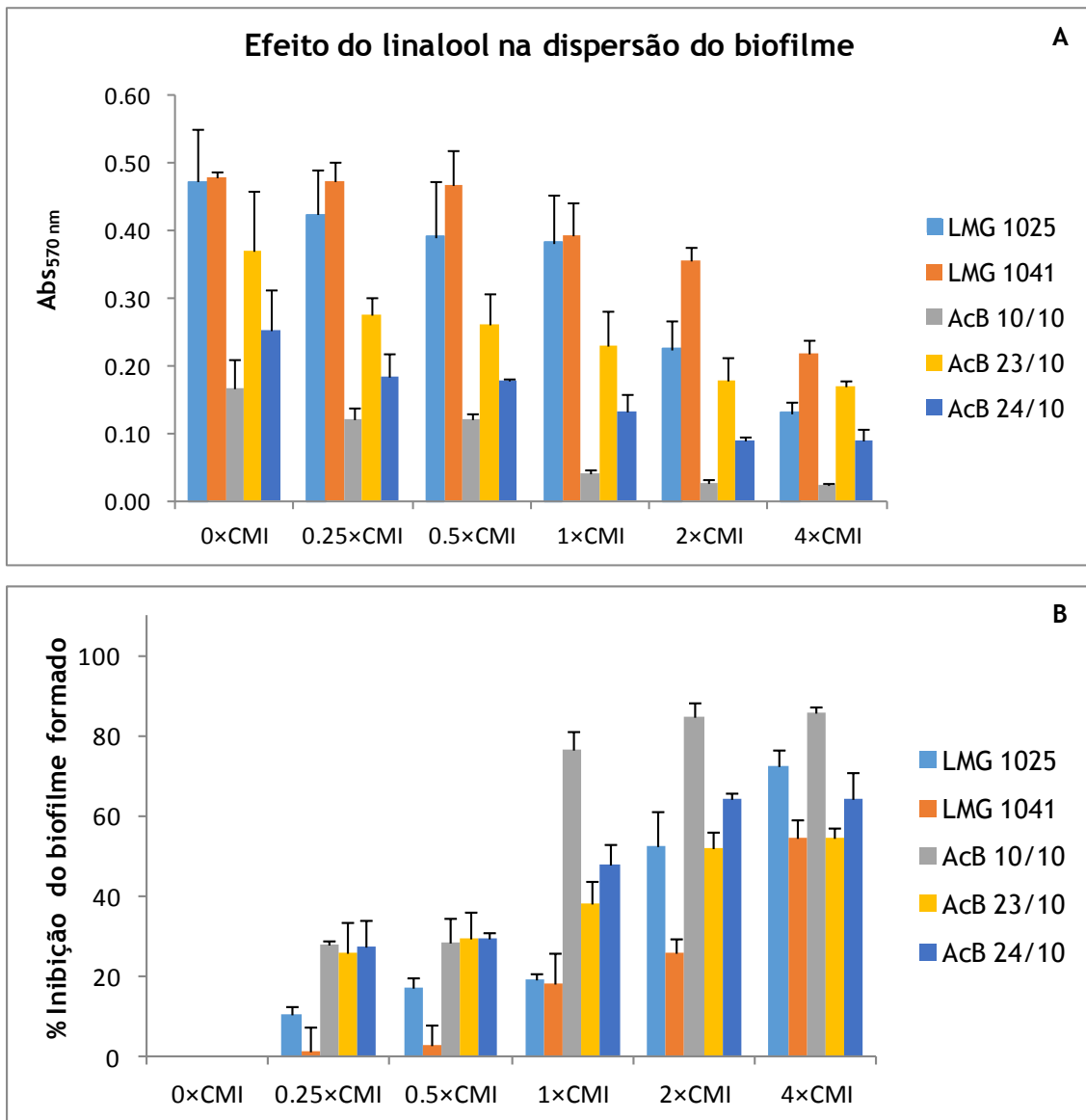


Figura 7.4. Efeito do linalool sobre o biofilme previamente formado de *A. baumannii*. Quantificação da biomassa total de biofilme pelo método do Violeta de Cristal (A) e percentagem de inibição do biofilme formado (B).

As estirpes de *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041 foram as estirpes que apresentaram maior capacidade de formação de biofilme, sem tratamento com o linalool, e, como verificado anteriormente, a estirpe AcB 10/10 apresentou a menor capacidade.

Como esperado, utilizando as concentrações sub-inibitória de linalool, nomeadamente 0.25x e 0.5x a CMI, verificou-se uma baixa capacidade do linalool inibir o biofilme previamente formado, para todas as estirpes de *A. baumannii*. Por sua vez, as maiores percentagens de inibição do biofilme pré-formado foram de aproximadamente, 73/52%, 55/26%, 86/85%, 55/52% e 64.4/64.3%, utilizando 4/2x a CMI de linalool para as estirpes LMG 1025, LMG 1041, AcB 10/10, AcB 23/10 e AcB 24/10, respetivamente. Com 1x a CMI não se verificou uma elevada inibição do biofilme previamente formado por todas as estirpes, o que seria de esperar uma vez que o biofilme previamente formado está completamente constituído e assim torna-se mais resistente aos agentes antimicrobianos. Deste modo, demonstrou-se que com o aumento da concentração de linalool houve um aumento da percentagem de inibição do biofilme previamente formado.

Os resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de investigação demonstraram que o óleo essencial de sementes de *C. sativum* também inibiu eficazmente o biofilme pré-formado de todas as estirpes de *A. baumannii* em estudo, com valores de inibição elevados, entre 75% e 93%, utilizando 4x a CMI [44]. Por outro lado, com uma baixa concentração de óleo (0.25x a CMI) verificou-se uma baixa diminuição do efeito inibitório sobre o biofilme previamente formado [44]. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos no presente estudo, no entanto o linalool mostrou um efeito inibitório menor que o óleo essencial. Isto pode dever-se, uma vez mais, ao facto do óleo ser uma mistura de vários compostos.

De modo semelhante ao obtido neste estudo, Jadhav et al., [89] verificaram que utilizando a CMI de óleo essencial de *yarrow* (milefólio), observou-se uma inibição do biofilme pré-formado de *L. innocua* e *L. monocytogenes* de apenas 28.7% e 52.2%, respetivamente. Também, Nostro et al., [68] verificaram que os óleos essenciais de orégão, carvacrol e timol inibiram a formação e o biofilme previamente formado por estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, com concentrações inibitórias duas ou quatro vezes superiores à CMI.

Deste modo pode-se concluir que o linalool é uma promissora estratégia natural no controlo da formação do biofilme de *A. baumannii*, bem como, da dispersão dos biofilmes previamente formados, ainda que as células do biofilme pré-formado sejam mais resistentes aos agentes antimicrobianos que as células planctónicas ou até mesmo biofilmes em formação [42]. Assim, este agente antimicrobiano poderá ser utilizado na elaboração de desinfetantes e em terapias antimicrobianas, de modo a superar a resistência de *A. baumannii* aos antibióticos e desinfetantes atualmente disponíveis.

7.2.1.3. Análise da formação do biofilme por microscopia electrónica de varrimento

Recorrendo à técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento, pretendeu-se confirmar a formação do biofilme pelas estirpes de *A. baumannii* e analisar a estrutura morfológica do biofilme formado. Assim, escolheu-se a estirpe de *A. baumannii* LMG 1041, uma vez que os resultados prévios mostraram uma forte capacidade desta estirpe para formar biofilme e avaliou-se a morfologia de um biofilme formado durante 48h. Com as imagens obtidas (Figura 7.5.) confirmou-se a efetiva formação de biofilme pela estirpe LMG 1041, estando o biofilme aderido à superfície de poliestireno e observando-se o volume do biofilme. A técnica de microscopia electrónica de varrimento a pressão variável é vantajosa, pois evita-se a prévia preparação demorada da amostra, uma vez que a amostra, não precisa de ser desidratada nem sofrer o processo de fixação. No entanto, a qualidade da imagem é afetada, como se pode observar pelas imagens obtidas.

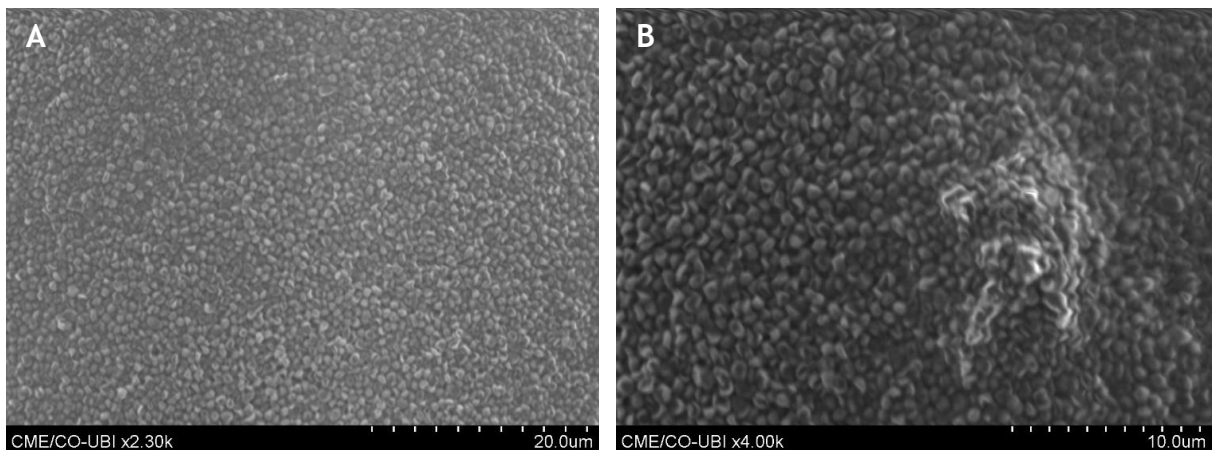


Figura 7.5. Imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento a pressão variável. Biofilme da estirpe de *A. baumannii* LMG 1041, formado sobre uma superfície de poliestireno a 2300× (A) e 4000× (B).

7.2.2. Avaliação da adesão e formação de biofilmes de *A. baumannii* em diferentes superfícies - efeito do linalool

7.2.2.1. Avaliação da adesão de *A. baumannii* a diferentes superfícies através da medição do ângulo de contacto e energia de adesão

Como abordado anteriormente, o primeiro passo na formação do biofilme consiste na adesão à superfície. Assim, para o estudo termodinâmico da adesão das estirpes de *A. baumannii* a superfícies comuns em ambiente hospitalar (aço inoxidável, alumínio anodizado, cloreto de polivinilo, latex, poliestireno e tubo de plástico extraído de um cateter) determinou-se a energia livre de adesão através da medição dos ângulos de contacto, pela técnica da gota

séssil (figura 7.6.). A realização deste ensaio teve como objetivo prever teoricamente a capacidade das estirpes de *A. baumannii* aderirem às diferentes superfícies testadas, com e sem tratamento com o linalool.

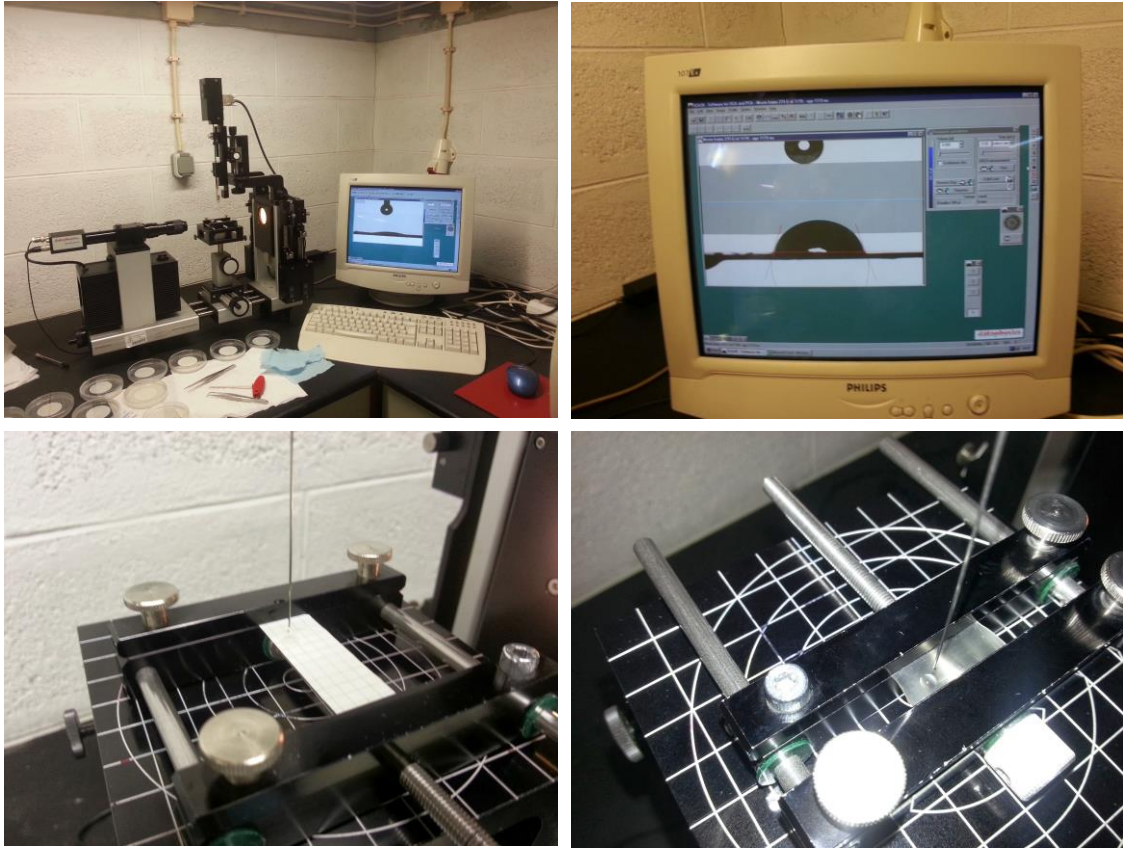


Figura 7.6. Equipamento OCAH 200 da DataPhysics Instruments, utilizado na determinação do ângulo de contacto através da técnica da gota séssil.

Os resultados da energia livre de adesão obtidos (ΔG_{Adh}^{Total}), são apresentados na tabela 7.4.

Tabela 7.4. Energia livre de adesão das bactérias de *A. baumannii* às diferentes superfícies, com e sem tratamento prévio com o linalool.

<i>A. baumannii</i>	ΔG_{Adh}^{Total} (mN/m)					
	Aço Inoxidável	Alumínio Anodizado	Latex	PVC	PS	Tubo Plástico (Cateter)
LMG 1025	-13.47	-7.00	-4.22	-13.34	-22.52	-21,57
LMG 1025 (linalool)	-0.46	7.04	8.20	0.13	-12.90	-15,00
LMG 1041	8.02	15.39	16.52	7.25	-1.18	-3,06
LMG 1041 (linalool)	4.74	11.46	11.76	5.44	-7.18	-10,19
ACB 10/10	4.21	11.83	12.86	4.26	-7.29	-9,57
ACB 10/10 (linalool)	-1.86	5.60	6.64	-0.92	-15.12	-17,41
ACB 23/10	8.78	14.27	15.10	7.76	2.93	1,59
ACB 23/10 (linalool)	-3.81	2.33	2.81	-2.14	-16.95	-19,55
ACB 24/10	-9.81	-3.00	-0.26	-10.13	-18.41	-17,63
ACB 24/10 (linalool)	3.76	10.99	11.85	4.00	-7.66	-10,02

Através dos valores da energia de adesão pode-se avaliar se a adesão às superfícies é termodinamicamente favorável ou desfavorável, sendo que: $\Delta G_{Total} (adh) < 0$ a adesão é favorecida; $\Delta G_{Total} (adh) > 0$ a adesão não é favorecida. Assim, pode-se concluir que quando aumenta $\Delta G_{Total} (adh)$ a adesão das bactérias às superfícies diminui.

Deste modo, através dos valores da energia de adesão obtidos, pode-se concluir que sem tratamento com linalool, as estirpes de *A. baumannii* LMG 1025 e AcB 24/10, apresentam adesão termodinamicamente favorável ($\Delta G_{Total} (adh) < 0$) a todas as superfícies testadas. A estirpe AcB 23/10 não apresenta adesão favorável para nenhuma das superfícies e as estirpes LMG 1041 e AcB 10/10, apenas têm adesão favorecida para o poliestireno (PS) e para o tubo de plástico. No entanto, quando estas bactérias foram tratadas com o linalool, comparativamente com a estirpe sem tratamento, a adesão a todas as superfícies apenas foi desfavorável (aumento $\Delta G_{Total} (adh)$) para as estirpes *A. baumannii* LMG 1025 e AcB 24/10. Para as restantes estirpes verificou-se uma diminuição da $\Delta G_{Total} (adh)$ para o tratamento com linalool em relação ao controlo, indicando que o tratamento com linalool, ao contrário do que seria de esperar, aumentou a capacidade termodinâmica das bactérias aderirem às superfícies. No entanto, é importante referir que para a maioria das estirpes, apesar de ter diminuído a energia livre de adesão, esta manteve-se positiva, ou seja, a adesão não foi termodinamicamente favorável.

Por exemplo, a adesão da estirpe LMG 1041 às superfícies de PVC, latex, aço inoxidável e alumínio anodizado foi termodinamicamente desfavorável e apesar do tratamento com linalool ter diminuído a energia livre de adesão, a adesão das bactérias a estas superfícies permaneceu desfavorável ($\Delta G_{Total} (adh) > 0$). Relativamente às superfícies de PS e do tubo de

plástico do cateter, a adesão é favorecida ($\Delta G_{Total} (adh) > 0$) e após o tratamento com linalool aumenta a sua capacidade de adesão.

Borges et al., [34] testarem os efeitos do ácido gálico (AG) e do ácido ferúlico (AF) na adesão de algumas bactérias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*) a superfícies de poliestireno, através da caracterização termodinâmica da energia livre de adesão. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma adesão energeticamente desfavorável de todas as bactérias, exceto de *P. aeruginosa*, ao poliestireno. Quando tratadas com os compostos, a adesão de todas as bactérias foi menos favorável, excepto para *E. coli*, onde se observou uma adesão mais favorável. No presente estudo, observaram-se resultados semelhantes, uma vez que, após o tratamento com linalool, a adesão foi energeticamente desfavorável para duas estirpes, enquanto as restantes tiveram um comportamento oposto.

A previsão termodinâmica da adesão das estirpes de *A. baumannii* às diferentes superfícies após tratamento com o linalool não corresponde ao esperado, uma vez que era expectável uma diminuição da adesão bacteriana após o tratamento com o linalool. No entanto, sabe-se que a adesão bacteriana a superfícies é um processo complexo influenciado por diversos fatores. Entre estes fatores incluem-se as características físico - químicas das bactérias, as propriedades da superfície dos materiais (como, por exemplo a hidrofobicidade) e os fatores ambientais. As variações no acabamento das superfícies, bem como, o tratamento de limpeza também podem influenciar a adesão bacteriana. As propriedades biológicas das bactérias, tais como a presença de apêndices celulares (*pilus*) e a produção de substâncias poliméricas extracelulares, também influenciam o processo de adesão. Por outro lado, os microrganismos também podem adaptar as suas estratégias de adesão de acordo com a natureza da superfície e dos fatores externos através de mecanismos de comunicação celular (*quorum-sensing*) [19,34,90,91].

7.2.2.2. Avaliação da formação de biofilmes de *A. baumannii* em diferentes superfícies e efeito do tratamento com linalool

Um dos fatores de patogenicidade e virulência da bactéria *A. baumannii* deve-se à capacidade deste patógeno aderir a superfícies e formar biofilmes. Estes biofilmes representam uma problemática, uma vez que apresentam elevada resistência aos antimicrobianos disponíveis atualmente. Deste modo, torna-se urgente a procura de alternativas antimicrobianas para controlar a formação de biofilmes pela bactéria nosocomial *A. baumannii*.

Da previsão termodinâmica da adesão celular, obtida pela determinação do ângulo de contacto (ponto 7.2.2.1.), verificou-se que as duas estirpes de referência (*A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041) apresentaram um comportamento distinto após o tratamento com o linalool, ou seja, para a estirpe LMG 1025 verificou-se que a adesão foi energeticamente não

favorável, enquanto que para a LMG 1041 a adesão foi energeticamente favorável. Assim, estas duas estirpes foram selecionadas para avaliar a capacidade de formação de biofilme, bem como, o efeito do linalool na formação de biofilme sobre superfícies, normalmente presentes em ambiente hospitalar (aço inoxidável, alumínio anodizado, latex e PVC).

Assim, a capacidade de formação de biofilmes pelas duas estirpes de referência nas diferentes superfícies, foi avaliada através da quantificação da biomassa total do biofilme formado através do método do VC e os resultados estão apresentados na figura 7.7.

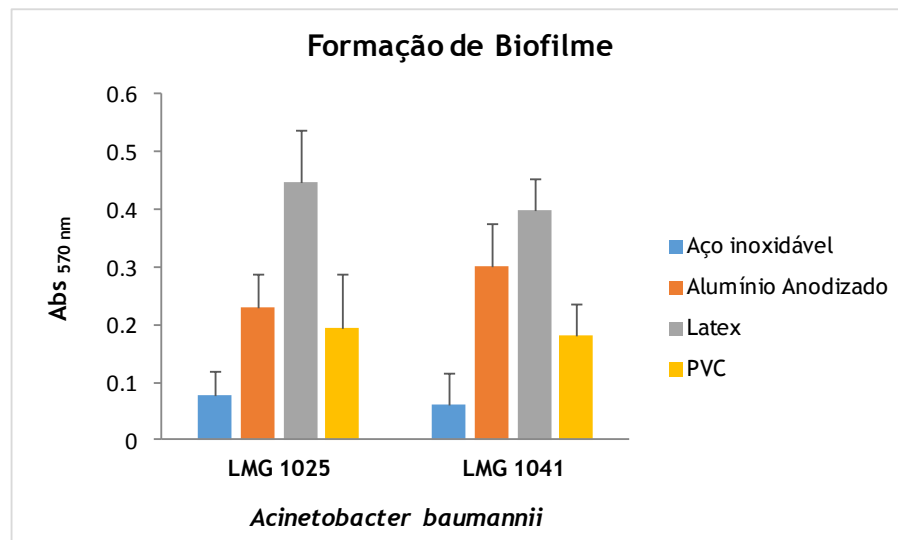


Figura 7.7. Formação de biofilme pelas estirpes de referência de *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041 em aço inoxidável, alumínio anodizado, latex e cloreto de polivinilo, através da quantificação da biomassa total do biofilme. De modo a comparar os resultados, estes foram padronizados de modo a corresponderem a uma área superficial de 1cm².

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que as duas estirpes de referência apresentaram capacidade de formar biofilme sobre as diferentes superfícies em estudo, verificando-se que a maior quantidade de biofilme foi formado sobre as superfícies de latex, seguido do alumínio anodizado, enquanto a menor formação de biofilme se verificou sobre o aço inoxidável (imagens representativas na figura 7.8.).

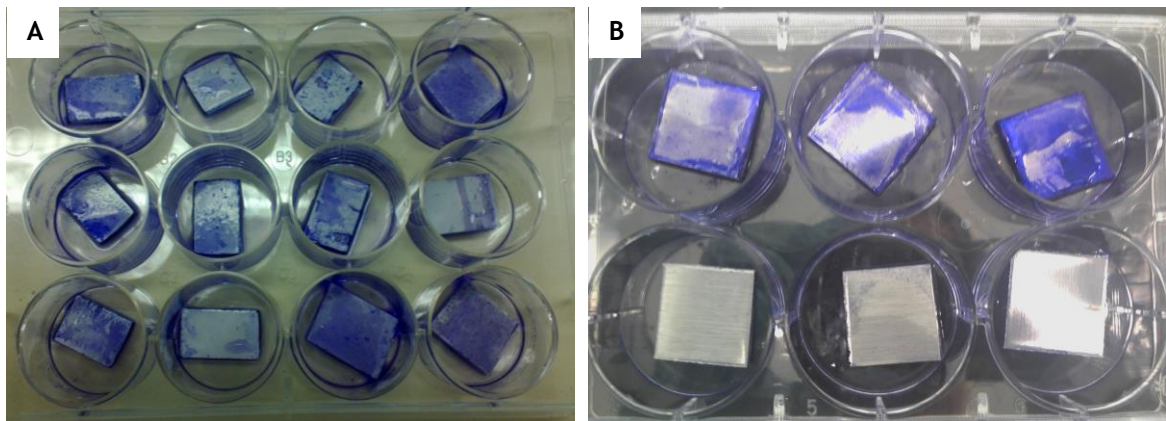


Figura 7.8. Representação do biofilme formado sobre as superfícies de PVC (6 poços à direita) e alumínio anodizado (6 poços à esquerda) (A) e aço inoxidável (poços superiores com biofilme e poços inferiores controlo) (B).

Através da previsão termodinâmica de adesão foi observado que, ao contrário da estirpe LMG 1041, a adesão a todas as superfícies foi termodinamicamente favorável para a estirpe LMG 1025, no entanto os resultados obtidos através da quantificação da biomassa do biofilmes mostram que ambas as estirpes apresentam semelhante capacidade de formar biofilmes. O latex foi a superfície onde houve maior formação de biofilme, no entanto, segundo os resultados termodinâmicos, para esta superfície a adesão não era a mais favorável. Como o latex é um material muito poroso, poderá ter influenciado a quantificação do biofilme formado, pelo ensaio com o corante VC. Por outro lado, o PVC foi a superfície energeticamente mais favorecida para a adesão celular das estirpes de referência, no entanto, pelo método de coloração com VC verificou-se a menor formação de biofilme sobre esta superfície. Estes resultados mostram que o processo de adesão às superfícies é um passo inicial da formação de biofilmes, podendo não ter influência no biofilme formado, pois como foi demonstrado, uma adesão à superfície favorecida, nem sempre é sinónimo de um maior biofilme formado. Sabe-se que os biofilmes são formados em vários passos, sendo que a adesão à superfície é o inicial, podendo ainda haver muitos fatores a influenciarem o biofilme final [12,33].

O efeito do linalool na formação dos biofilmes nas superfícies, também foi avaliado utilizando uma concentração sub-inibitória ($0.5 \times$ a CMI). O efeito foi avaliado pela quantificação da biomassa total do biofilme através do método do VC (figura 7.9.).

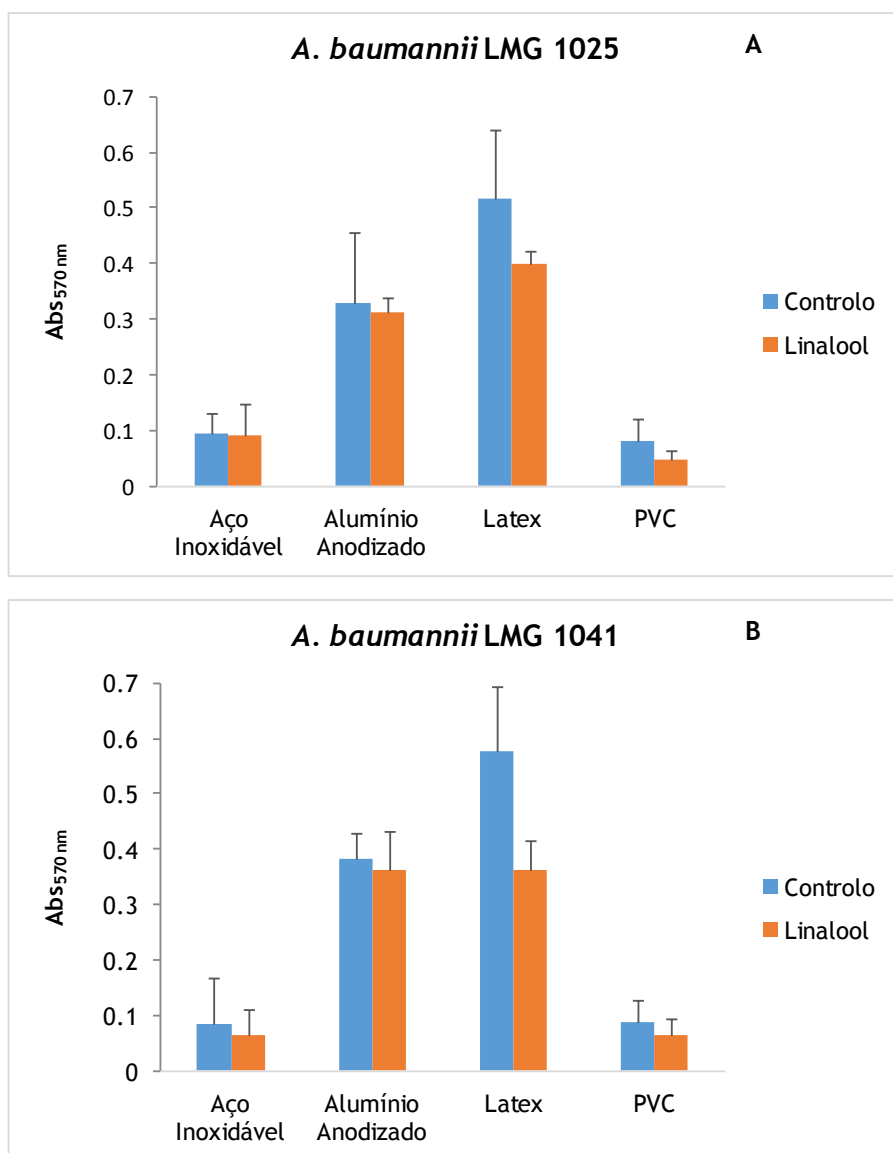


Figura 7.9. Efeito do linalool na formação de biofilme pelas estirpes de referência de *A. baumannii* LMG 1025 (A) e LMG 1041 (B) em aço inoxidável, alumínio anodizado, latex e cloreto de polivinilo. De modo a comparar os resultados, estes foram padronizados de modo a corresponderem a uma área superficial de 1cm².

Para melhor avaliar o efeito do linalool na formação de biofilme sobre as superfícies testadas calculou-se a percentagem de inibição do biofilme formado (tabela 7.5.), pelo qual se verificou um ligeiro efeito inibitório do linalool na formação do biofilme pelas duas estirpes de referência nas quatro superfícies.

Tabela 7.5. Percentagem de inibição do biofilme formado pelas duas estirpes de referência de *A. baumannii* (LMG 1025 e LMG 1041), sobre quatro superfícies, através do efeito do linalool.

Superfície	Inibição do Biofilme Formado (%)	
	<i>A. baumannii</i> LMG 1025	<i>A. baumannii</i> LMG 1041
Aço Inoxidável	5.00	24.31
Alumínio Anodizado	4.82	5.19
Latex	22.62	37.02
PVC	42.38	28.36

A partir da análise da figura 7.9. e da tabela 7.5., verificou-se que o linalool inibe a formação de biofilmes pelas duas estirpes em todas as superfícies testadas. O maior efeito inibitório do linalool verificou-se na formação de biofilme sobre o PVC (42.38 %) para a estirpe LMG 1025 e sobre o latex (37.02%) para a estirpe LMG 1041. Por outro lado, a menor inibição, aproximadamente 5%, verificou-se na formação de biofilme sobre o alumínio anodizado, para as duas estirpes de referência. Os resultados referentes à estirpe LMG 1025, são concordantes com os resultados obtidos pela previsão termodinâmica da adesão às superfícies. Para esta estirpe foi observado que o tratamento com linalool, diminuiu a capacidade de adesão da bactéria a todas as superfícies. Esta capacidade de adesão foi menos favorável para o PVC, onde se observou um aumento da energia livre de adesão de -13.34 para 0.13, estando este resultados coerentes com os obtidos através da quantificação da biomassa total do biofilme formado, onde se observou uma inibição de 42.38%. Os resultados termodinâmicos relativamente ao latex também suportam os resultados obtidos na formação do biofilme. No entanto seria de esperar uma maior inibição do biofilme relativamente ao alumínio anodizado, uma vez que a adesão foi desfavorecida com o tratamento com linalool. Em relação à estirpe LMG 1041, ao contrário da previsão da adesão termodinâmica, observou-se uma maior inibição da formação do biofilme. Isto pode ser explicado pelo fato das energias de adesão desta estirpe a todas as superfícies serem positivas com valores bastante elevados, indicando que a adesão desta estirpe, com e sem tratamento com linalool, não é favorável a nenhuma das superfícies. Assim, torna-se mais fácil a ação do agente antimicrobiano.

Sabe-se que a adesão bacteriana pode ser influenciada por vários fatores, nomeadamente pela superfície da célula e pela superfície de adesão, mas os compostos extracelulares como os exopolissacarídeos, também são responsáveis pela formação de biofilme e pela resistência a agentes antimicrobianos [33,43]. Estudos com exopolissacarídeos, mostraram inibição da adesão inicial das células de *E. coli* ao aço inoxidável, não se verificando, no entanto, inibição do desenvolvimento e maturação do biofilme [92]. Oh et al., [93], também verificaram que as características da superfície dos materiais, como a rugosidade,

influenciam a adesão celular, concluindo que existe uma maior adesão celular às superfícies rugosas e conseqüentemente uma maior formação de biofilme.

Assim, através dos resultados de adesão celular e formação de biofilmes, podemos concluir que o linalool é um composto antibacteriano promissor no controle de *A. baumannii*, apresentando atividade antibacteriana tanto em células planctônicas, como em biofilmes. Deste modo, este composto poderá ser eventualmente utilizado no futuro na elaboração de desinfetantes para as superfícies hospitalares e até mesmo na incorporação deste composto em luvas utilizadas pelos profissionais de saúde, para diminuir a propagação de estirpes de *A. baumannii*, assim como a formação de biofilmes.

7.3. Atividade Anti- *Quorum-sensing* (QS)

O QS consiste na comunicação bacteriana célula - célula, mediada por autoindutores, como as N-acil-homoserina lactonas nas bactérias Gram-negativas. Este autoindutor regula a transcrição de genes, assim como alguns fatores de virulência como a adesão bacteriana, formação de biofilme e motilidade [7,38,39,94].

Assim, no presente trabalho, estudou-se a influência do linalool no QS, utilizando a estirpe biossensor *Chromobacterium violaceum*. Como resultado da atividade QS, através da libertação do autoindutor esta bactéria sintetiza um pigmento violeta - violaceína [94]. Assim, testou-se o efeito do linalool na inibição da produção da violaceína pela *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, o que se traduz numa inibição dos mecanismos de QS desta bactéria Gram-negativa. Para isto, realizou-se o teste de difusão em disco e os resultados da inibição do pigmento pelo linalool estão representados na tabela 7.6.

Tabela 7.6. Diâmetro (mm) do halo de inibição do pigmento violeta pelo linalool e controle (DMSO) para a estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (Média ± Desvio Padrão).

Estirpe biossensor <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Halo de inibição (mm)	
	Linalool	DMSO
Inibição do crescimento	45 ± 2	6 ± 0
Inibição do pigmento	52 ± 1	6 ± 0

De acordo com os resultados obtidos (tabela 7.6.), verificou-se que o linalool inibiu a produção do pigmento violaceína da estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, observando-se um halo de inibição de crescimento de aproximadamente 4.5 cm e ainda 0.7 cm sem inibição de crescimento, mas com inibição do pigmento. Assim, verificou-se que o linalool interferiu na atividade QS, verificando-se a inibição do pigmento da estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (Ver figura 7.10).

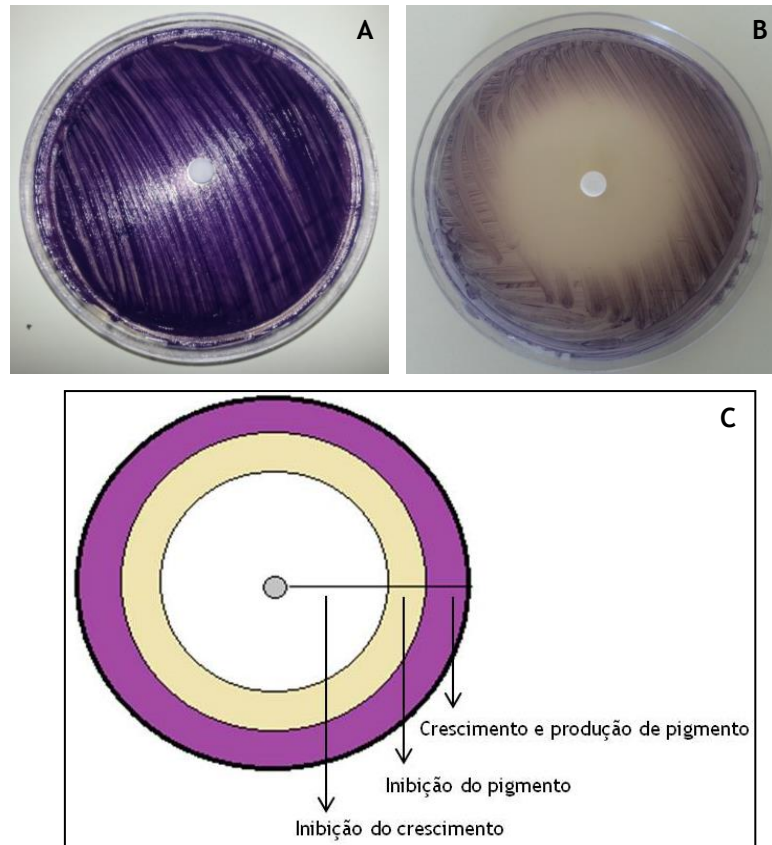


Figura 7.10. Imagens do halo de inibição do linalool para estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando DMSO (A), linalool (B) e esquema representativo da inibição de crescimento e pigmento (C).

7.4. Citotoxicidade - hemólise

Para que um agente antimicrobiano possa ser considerado seguro e ser aplicado em seres humanos, os antimicrobianos têm de apresentar baixa toxicidade. Deste modo, neste estudo procedeu-se à determinação da citotoxicidade do linalool em eritrócitos humanos, através do ensaio da hemólise. As células dos eritrócitos humanos são úteis no estudo da toxicidade dos compostos, devido à sua disponibilidade e ao conhecimento das propriedades da membrana e, assim, a lise dos eritrócitos é determinada através da medição da hemoglobina libertada [95]. Como os resultados obtidos anteriormente permitiram verificar que o linalool apresentava uma elevada atividade antibacteriana contra as estirpes de *A. baumannii*, avaliou-se a citotoxicidade deste composto, para assim se verificar a segurança do linalool e permitir a sua aplicação na elaboração de desinfetantes e antimicrobianos.

A avaliação da capacidade de hemólise do linalool em eritrócitos humanos foi feita expondo os mesmos a diferentes concentrações de linalool (32-0.02 $\mu\text{L}/\text{mL}$) durante 1 hora. Deste modo, a partir dos resultados obtidos verificou-se que a percentagem de hemólise aumentou

com o aumento da concentração de linalool testado. A maior percentagem de hemólise (35%) obteve-se com a máxima concentração de linalool (32 $\mu\text{L}/\text{mL}$) testada, mas com concentrações inferiores a 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ observou-se a inexistência de atividade hemolítica. Para as CMI (2, 4 e 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) do linalool contra as estirpes em estudo, verificou-se 0%, 0.50% e 10% de hemólise, respetivamente. Deste modo, verificou-se que, em geral, o linalool apresenta uma baixa citotoxicidade sobre eritrócitos humanos. De um modo semelhante, o nosso grupo de investigação verificou que concentrações mínimas inibitórias do óleo essencial de *C. sativum* apresentaram uma baixa citotoxicidade sobre as membranas dos eritrócitos humanos [44]. Também Togashi et al., [96], avaliaram o efeito de diferentes concentrações de linalool sobre eritrócitos de coelho, verificando que o linalool não apresentou atividade hemolítica.

Tendo em conta que o linalool apresentou uma baixa ou nula citotoxicidade em eritrócitos humanos, este poderá ser utilizado seguramente em novas formulações e aplicações para o controlo de *A. baumannii*.

Capítulo 8 - Conclusões e Perspetivas futuras

Os ensaios realizados no presente trabalho permitiram um conhecimento aprofundado da atividade antimicrobiana do linalool sobre duas estirpes de referência e três isolados clínicos de *A. baumannii*, bem como o efeito inibitório do linalool na formação de biofilmes em diferentes superfícies comuns em ambiente hospitalar. Deste modo, as principais conclusões após a realização deste trabalho foram:

- A avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos maioritários do óleo essencial de *C. sativum* (linalool, α -pineno, p-cimeno, acetato de geranyl e cânfora), através do método de difusão em disco e da determinação da concentração mínima inibitória (CMI), demonstrou que o linalool foi o composto que apresentou melhor atividade antibacteriana contra as estirpes de *A. baumannii* testadas, com valores de CMI a variar entre 2 e 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

- O estudo da suscetibilidade das estirpes de *A. baumannii* ao linalool em diferentes fases de crescimento (fase exponencial e estacionária), revelaram uma rápida ação bactericida do linalool sobre as estirpes de *A. baumannii* estudadas.

- A quantificação da biomassa total do biofilme formado, pelo método da coloração com o violeta de cristal (VC), demonstraram o efeito do linalool na inibição da formação do biofilme, bem como, na inibição do biofilme pré-formado, mesmo utilizando concentrações sub-inibitórias.

- A capacidade de adesão das estirpes de *A. baumannii* a diferentes superfícies (aço inoxidável, alumínio anodizado, latex, PS e PVC), comuns em superfícies e equipamentos hospitalares, foi determinada pela medição do ângulo de contacto. Ao contrário do que seria esperado, verificou-se uma adesão energeticamente mais favorável das estirpes LMG 1041, AcB 10/10 e AcB 23/10 após o tratamento com o linalool, comparativamente com o controlo. No entanto, a adesão das estirpes LMG 1025 e AcB 24/10 foi energeticamente menos favorável, após o tratamento com linalool.

- Através da quantificação da biomassa total de biofilme formado sobre as diferentes superfícies testadas (aço inoxidável, alumínio anodizado, latex, PS e PVC), observou-se que o linalool apresentou uma ação inibitória na formação do biofilme sobre estas superfícies.

- O ensaio da difusão em disco para a avaliação do efeito do linalool sobre o *quorum-sensing* (QS), utilizando a estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, revelou que este composto apresentou atividade anti-QS, uma vez que inibiu a produção do pigmento violaceína.

- A análise da citotoxicidade do linalool em eritrócitos humanos, revelou que este agente antibacteriano apresenta uma baixa toxicidade.

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores, indicando que o linalool possa ser utilizado futuramente no controlo de células planctónicas e biofilmes do patógeno *A. baumannii*.

Estudos futuros para uma avaliação mais aprofundada da citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* do linalool serão importantes, para garantir a segurança de posteriores aplicações. Novas estratégias terapêuticas poderão ser desenvolvidas com o linalool, no controlo da virulência e patogenicidade de *A. baumannii*, resultante da adesão celular a superfícies e equipamentos hospitalares e, conseqüentemente, da capacidade de formação de biofilmes. Estudos sobre a impregnação de linalool em luvas de latex, utilizadas pelos profissionais de saúde, também poderão ser úteis, uma vez que muitas das vezes a disseminação da bactéria *A. baumannii* verifica-se através dos profissionais de saúde que estiveram em contacto com os doentes colonizados. Como a maioria dos métodos de desinfeção existentes em meio hospitalar são ineficazes no controlo deste patógeno, a elaboração de desinfetantes com base no linalool seria importante no controlo da problemática da resistência de *A. baumannii* em ambiente hospitalar.

Referências Bibliográficas

- [1] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94:223-53.
- [2] Rajeshwari U, Andallu B. Medicinal benefits of coriander (*Coriandrum Sativum L*). *Spat DD - Peer Rev J Complement Med Drug Discov* 2011;1:51-8.
- [3] Burdock GA, Carabin IG. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil as a food ingredient. *Food Chem Toxicol* 2009;47:22-34.
- [4] Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 2011;19:42-7.
- [5] Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, et al. Efficacy of Colistin versus β -Lactams, Aminoglycosides, and Rifampin as Monotherapy in a Mouse Model of Pneumonia Caused by Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1946-52.
- [6] Al-Mariri A, Swied G, Oda A, Al Hallab L. Antibacterial Activity of *Thymus Syriacus* Boiss Essential Oil and Its Components against Some Syrian Gram-Negative Bacteria Isolates. *Iran J Med Sci* 2013;38:180-6.
- [7] Prashanth K, Vasanth T, Saranathan R, Makki AR, Pagal S. Antibiotic Resistance, Biofilms and Quorum Sensing in *Acinetobacter* Species. *Antibiot. Resist. Bact. - A Contin. Chall. New Millenn.*, 2012, p. 180-212.
- [8] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538-82.
- [9] Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* : the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries* 2009;3:335-41.
- [10] Araújo EA, Andrade NJ De, Carvalho AF, Ramos AF, Silva CAS. *Quim. Nova.*,. *Quim Nov* 2010;33:1940-8.
- [11] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia medica*. Sesta Ediz. 2010.
- [12] Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* 2008;190:1036-44.
- [13] Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 2007;21:601-14.
- [14] Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo A, Denaro C, Pennisi C, et al. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212:330-7.
- [15] Soon RL, Li J, Boyce JD, Harper M, Adler B, Larson I, et al. Cell surface hydrophobicity of colistin-susceptible vs resistant *Acinetobacter baumannii* determined by contact angles: methodological considerations and implications. *J Appl Microbiol* 2012;113:940-51.

- [16] Lee H-W, Koh YM, Kim J, Lee J-C, Lee Y-C, Seol S-Y, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:49-54.
- [17] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:939-51.
- [18] Wang H-M, Chen C-Y, Chen H-A, Huang W-C, Lin W-R, Chen T-C, et al. *Zingiber officinale* (ginger) compounds have tetracycline-resistance modifying effects against clinical extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Phytother Res* 2010;24:1825-30.
- [19] McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:130-55.
- [20] Camp C, Tatum OL. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Lab Med* 2010;41:649-57.
- [21] Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2011;323:44-51.
- [22] Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* 2011;6:1-10.
- [23] Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LS. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003;149:3473-84.
- [24] Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148-65.
- [25] Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. *Acinetobacter baumannii* Strain M2 Produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but Not Surface-Associated Motility. *MBio* 2013;4:e00360-13.
- [26] Nwugo CC, Arivett BA, Zimble DL, Gaddy JA, Richards AM, Actis LA. Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2012;7:e51936.
- [27] Jacobs AC, Blanchard CE, Catherman SC, Dunman PM, Murata Y. An ribonuclease T2 family protein modulates *Acinetobacter baumannii* abiotic surface colonization. *PLoS One* 2014;9:e85729.
- [28] Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998;27 Suppl 1:S93-9.
- [29] Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:219-26.
- [30] Fournier PE, Richet H. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. *Clin Infect Dis* 2006;42:42-692.
- [31] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471-84.

- [32] Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2010;83:89-105.
- [33] Luís Â, Silva F, Sousa S, Duarte AP, Domingues F. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling* 2014;30:69-79.
- [34] Borges A, Saavedra MJ, Simões M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling* 2012;28:755-67.
- [35] Szczepanski S, Lipski A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control* 2014;36:224-9.
- [36] Kumar A, Ting Y-P. Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;111C:747-54.
- [37] Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009;77:3150-60.
- [38] Tay SB, Yew WS. Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Mol Sci* 2013;14:16570-99.
- [39] Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, Blackwell HE. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native N-Acyl homoserine lactones. *ACS Chem Biol* 2012;7:1719-28.
- [40] Rodríguez-Bano J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microb Infect* 2008;14:276-8.
- [41] Toole GO, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm Formation As Microbial Development. *Annu Rev Microb* 2000;54:49-79.
- [42] Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 2008;19:1070-5.
- [43] Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001;33:1387-92.
- [44] Duarte AF, Ferreira S, Oliveira R, Domingues FC. Effect of Coriander Oil (*Coriandrum sativum*) on Planktonic and Biofilm Cells of *Acinetobacter baumannii*. *Nat Prod Commun* 2013;8:673-8.
- [45] Djeribi R, Boucherit Z, Bouchloukh W, Zouaoui W, Latrache H, Hamadi F, et al. A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;102:540-5.
- [46] Bayouhd S, Othmane A, Bettaieb F, Bakhrouf A, Ouada H Ben, Ponsonnet L. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Mater Sci Eng C* 2006;26:300-5.
- [47] García-Quintanilla M, Pulido MR, López-Rojas R, Pachón J, McConnell MJ. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol* 2013;21:157-63.

- [48] Duarte A, Ferreira S, Silva F, Domingues FC. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine* 2012;19:236-8.
- [49] Alviano WS, Mendonça-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Pradón T, Rodrigues ML, et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:101-5.
- [50] Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;88:308-16.
- [51] Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:565-73.
- [52] Park S-N, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook J-K. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe* 2012;18:369-72.
- [53] Magiatis P, Skaltsounis A-L, Chinou I, Haroutounian SA. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. *Z Naturforsch C* 2002;57:287-90.
- [54] Bagamboula C., Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol* 2004;21:33-42.
- [55] Diao W-R, Hu Q-P, Feng S-S, Li W-Q, Xu J-G. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against selected foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 2013;61:6044-9.
- [56] Silva F, Ferreira S, Queiroz JA, Domingues FC. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J Med Microbiol* 2011;60:1479-86.
- [57] Re* L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, et al. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol Res* 2000;42:177-82.
- [58] Lahlou M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr J* 2004;19:159-65.
- [59] Guleria S, Tiku AK, Koul A, Gupta S, Singh G, Razdan VK. Antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil and extracts of *Zanthoxylum alatum* grown in north-western Himalaya. *Sci World J* 2013;2013:1-9.
- [60] Bouzouita N, Kachouri F, Hamdi M, Chaabouni MM. Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour Fragr J* 2003;18:380-3.
- [61] Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr J* 2002;17:15-9.
- [62] Mazzanti G, Battinelli L, Salvatore G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour Fragrance J* 1998;13:289-94.

- [63] Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol* 2008;99:8788-95.
- [64] Custódio JBA, Ribeiro M V, Silva FS, Machado M, Sousa MC. The essential oils component p -cymene induces proton leak through Fo-ATP synthase and uncoupling of mitochondrial respiration. *J Exp Pharmacol* 2011;3:69-76.
- [65] Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 2001;49:4168-70.
- [66] Filipowicz N, Kamiński M, Kurlenda J, Asztemborska M, Ochocka JR. Antibacterial and antifungal activity of *juniper berry* oil and its selected components. *Phytother Res* 2003;17:227-31.
- [67] Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könönen E, Uitto V-J. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe* 2009;15:164-7.
- [68] Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol* 2007;56:519-23.
- [69] Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud J-M, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:572-6.
- [70] Schillaci D, Arizza V, Dayton T, Camarda L, Stefano VD. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. *Lett Appl Microbiol* 2008;47:433-8.
- [71] Msaada K, Hosni K, Taarit M Ben, Chahed T, Kchouk ME, Marzouk B. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chem* 2007;102:1131-4.
- [72] Gomes-Carneiro MR, Felzenszwalb I, Paumgarten FJR. Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)- menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res* 1998;416:129-36.
- [73] Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MDL. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 2002;9:721-6.
- [74] Wright SJ, Caunt P, Carter D, Baker PB. Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;23:224-7.
- [75] Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão : Norma Aprovada - Oitava Edição. vol. 23. 2003.
- [76] Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada - Sexta Edição. vol. 23. 2003.
- [77] Chen C-Y, Nace GW, Irwin PL. A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2003;55:475-9.

- [78] Joubert L-M. Visualization of Hydrogels with Variable-Pressure SEM. *Microsc Microanal* 2009;15:1308-9.
- [79] Singh BN, Singh BR, Singh RL, Prakash D, Sarma BK, Singh HB. Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food Chem Toxicol* 2009;47:778-86.
- [80] Carson CF, Riley T V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* 1995;78:264-9.
- [81] Sokovi M, Marin PD, Brkic D, Griensven LJLD van. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Food* 2007.
- [82] Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* 2002;74:101-9.
- [83] Guerra FQS, Mendes JM, Oliveira WA de, Souza FS de, Trajano VN, Coutinho HDM, et al. Antibacterial activity of the essential oil of Citrus limon against multidrug resistant *Acinetobacter* strains. *Brazilian J Pharm* 2013;94:142-7.
- [84] Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2004;38:864-70.
- [85] Caplin JL, Allan I, Hanlon GW. Enhancing the in vitro activity of Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* by blending oils from specific cultivars. *Int J Essent Oil Ther* 2009;3:35-9.
- [86] Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 1998;26:194-8.
- [87] Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, Mee BJ, Riley T V. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:386-92.
- [88] Kwieciński J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:343-7.
- [89] Jadhav S, Shah R, Bhave M, Palombo EA. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control* 2013;29:125-30.
- [90] Simões M, Simões LC, Cleto S, Pereira MO, Vieira MJ. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *Int J Food Microbiol* 2008;121:335-41.
- [91] Simões LC, Simões M, Oliveira R, Vieira MJ. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *J Basic Microbiol* 2007;47:174-83.
- [92] Ryu J-H, Beuchat LR. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157 : H7 on Stainless Steel : Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:247-54.

- [93] Oh YJ, Lee NR, Jo W, Jung WK, Lim JS. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 2009;109:874-80.
- [94] Choo JH, Rukayadi Y, Hwang J-K. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol* 2006;42:637-41.
- [95] He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2007;163:137-43.
- [96] Togashi N, Hamashima H, Shiraishi A, Inoue Y, Takano A. Antibacterial Activities Against *Staphylococcus aureus* of Terpene Alcohols With Aliphatic Carbon Chains. *J Essent Oil Res* 2010;22:263-9.
- [97] Good RJ, van Oss CJ. *Modern approaches to wettability: theory and applications*. Plenum Press;1-27.

Anexos

Anexo I - Comunicação em painel para *IX Annual CICS Symposium 2014*

S. Alves, A. Duarte, S. Sousa, F.C. Domingues. “Linalool: a natural strategy to control planktonic and biofilm cells of *Acinetobacter baumannii*”. Aceite para IX Annual CICS Symposium 2014. Covilhã, Portugal. 30 junho - 1 julho, 2014.

Anexo II - Comunicação em painel para ICAR 2014

S. Alves, A. Duarte, S. Sousa, F.C. Domingues. “Linalool: a natural strategy to control biofilms of *Acinetobacter baumannii*”. Aceite para ICAR 2014 - II International Conference on Antimicrobial Research. Madrid, Espanha. 1-3 outubro, 2014.

Anexo I - Comunicação em painel para IX Annual CICS Symposium 2014

Linalool: a natural strategy to control planktonic and biofilm cells of *Acinetobacter baumannii*

S. Alves¹, A. Duarte¹, S. Sousa² and F. C. Domingues¹

¹ CICS-UBI-Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Avenida Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

² Paper & Textile Materials Research Unit, University of Beira Interior, Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal

Acinetobacter baumannii is a common pathogen that causes several nosocomial infections. This pathogen has ability to adhere to common equipment and surfaces in the hospital environment and in addition it forms biofilms. These biofilms are known to be highly resistant to available drugs and disinfectants, making it important to identify new antimicrobials. Linalool is a natural compound present in numerous essential oils, known to have antimicrobial properties, which could be a natural alternative to the actual antimicrobials to control *A. baumannii*'s infections. The objective of this work was to determine the inhibitory effect of linalool on planktonic and biofilm cells of several *A. baumannii* strains, as well as its effect on the adhesion of *A. baumannii* to different surfaces. To assess the effect of linalool on adhesion and biofilm formation of *A. baumannii* strains to several surfaces (polystyrene, polyvinyl chloride, latex, anodized aluminum and stainless steel), the sessile drop contact angle measurements and the quantification of biofilm biomass using the crystal violet (CV) assay were used. Since quorum-sensing (QS) has been associated to the initial bacterial adhesion and biofilm formation to the surfaces, the effect of linalool on QS was studied using a biosensor strain. Finally, the cytotoxicity of linalool in human erythrocytes was assessed through hemolysis assay. The linalool showed antibacterial activity against the five tested strains, with MIC values between 2 and 8 $\mu\text{L/mL}$, the bactericidal effect was observed by the time-kill curves. With the contact angle measurements, it was found that the adhesion of two strains to the surfaces was less thermodynamically favourable when subjected to treatment with linalool when compared to cells without treatment. On the other hand, for the remaining three strains it was found that after treatment with linalool, the adhesion to the surfaces was thermodynamically most favored. While the reference strains (LMG 1025 and LMG 1041) showed a distinct behaviour in the contact angle measurements, these strains were selected to further assess the ability of biofilm formation and the effect of linalool in biofilm formation on common hospital surfaces, by the CV method. These strains showed similar ability to form biofilms on the tested surfaces, and a decrease in biomass of biofilm with the linalool's treatment was observed. Concerning the effect of linalool on the QS mechanism, it was observed that this compound may interfere with QS, since it promoted the inhibition of the pigmentation of the biosensor strain. Regarding the cytotoxicity, it was

observed that linalool had a low hemolytic activity on human erythrocytes. In sum, linalool is a promising antimicrobial agent, with low cytotoxicity, for controlling the formation of biofilms of *A. baumannii* on abiotic surfaces, particularly those used in this study, which are common surfaces in hospitals.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; linalool; adhesion; biofilm inhibition; cytotoxicity.

Anexo II - Comunicação em painel para ICAR 2014

Linalool: a natural strategy to control biofilms of *Acinetobacter baumannii*

S. Alves¹, A. Duarte¹, S. Sousa² and F. C. Domingues¹

¹CICS-UBI-Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Avenida Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

²Paper & Textile Materials Research Unit, University of Beira Interior, Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal

Acinetobacter baumannii is an opportunist microorganism capable of causing nosocomial infections and responsible for high mortality and morbidity rates, mainly in intensive care units. One of the *factors leading to the* virulence and pathogenicity of *A. baumannii* is the ability to adhere to biotic and abiotic surfaces, and to form biofilms. Biofilm increases the ability of bacteria to resist antimicrobial treatments, disinfectants and other environmental stresses. In sum, the increasing incidence of hospital-acquired infections caused by *Acinetobacter baumannii*, coupled with the low efficacy of available drugs and disinfectants has increased the interest in the potential antimicrobial properties of natural products, such as linalool. The main objective of this work was to determine the potential of linalool to inhibit biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains and its effect on the ability of *A. baumannii* to adhere to different surfaces. The minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool against two reference strains and three clinical isolates of *A. baumannii* was determined using a microdilution broth susceptibility assay. The ability of *A. baumannii* to form biofilms, as well as, the effect of linalool on biofilm formation on different surfaces (stainless steel, polystyrene, polyvinyl chloride, latex and anodized aluminum) was evaluated by the sessile drop contact angle measurements and by the quantification of biofilm biomass using the crystal violet assay (CV). The contact angle measurements were used to calculate the free energy of adhesion between the *A. baumannii* strains with and without linalool treatment and the different surfaces. Furthermore, for a quantitative analysis, we used the CV assay to evaluate the biofilm biomass of *A. baumannii* biofilms after 24h of treatment with linalool. The antibacterial activity of linalool against the five tested strains was determined and the minimum inhibitory concentration values ranged from 2 to 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$. With the contact angle measurements, it was found that after linalool treatment, the adhesion of two strains (LMG 1025 and AcB24/10) to the surfaces was less thermodynamically favourable (lower ΔG) when compared to cells without treatment. However, for the other strains (LMG 1041, AcB10/10 and AcB23/10) it was found that the adhesion was thermodynamically most favored after treatment with linalool. Since the reference strains (LMG 1025 and LMG 1041) showed a distinct behavior in the contact angle measurements, these two strains were selected for further assessing not only their ability to form biofilms, but also test the effect of linalool on

their ability to form biofilms in the abiotic surfaces. It was observed that the two tested strains showed similar ability to form biofilm on the various tested surfaces and, in general, after the treatment with linalool, the biofilm biomass decreased, meaning that biofilm formation was inhibited. In conclusion, linalool is a promising antimicrobial agent for controlling the formation of biofilms of *A. baumannii* on abiotic surfaces, particularly those used in this study, which are common surfaces in equipments in hospitals and are susceptible to colonization by *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; linalool; biofilm inhibition; abiotic surfaces.