



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Avaliação da atividade anti-*Arcobacter* de complexos de inclusão com resveratrol e ciclodextrinas

Ana Catarina Natividade Alves

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

Orientador: Prof.^a Doutora Filomena Silva
Co- Orientador: Mestre Susana Ferreira

Covilhã, Junho de 2014

Agradecimentos

Primeiro que tudo, gostaria de expressar a minha sincera gratidão à minha orientadora, a Professora Doutora Filomena Silva e à minha co-orientadora, a Mestre Susana Ferreira por toda a orientação, experiência e disponibilidade. A ajuda delas tornou-se crucial para o desenvolvimento deste trabalho. Por todo o seu vasto conhecimento, críticas, sugestões e correções, o meu muito obrigado.

À Andreia Duarte, pela experiência e conhecimentos que me transmitiu, e que desta forma facilitaram a realização do meu trabalho, assim como aos meus colegas de laboratório, o meu obrigado.

Aos meus amigos e colegas de curso, aqui anónimos mas por mim nunca esquecidos, pela amizade, pela preocupação e pelos gestos que, mesmo parecendo pequenos, demonstraram ser fontes de grande apoio e ânimo. Obrigado por acreditarem em mim e conseguirem com a vossa presença recompensar os dias menos bons.

À minha mãe, o meu grande exemplo de vida e força, e à minha irmã, por todo o carinho e compreensão, pois sem elas nada seria possível e ao resto da minha família pelo apoio e coragem que me foi transmitida. Obrigado pelo amor que nunca me faltou e que fez com que nunca baixa-se os braços.

Por fim, agradecer ainda ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde e à Universidade da Beira Interior.

Resumo

O género *Arcobacter* tem atualmente 18 espécies descritas, das quais se destaca a espécie *A. butzleri*, uma vez que esta é atualmente considerada um agente enteropatogénico zoonótico emergente tanto para animais como para humanos. Este microrganismo é geralmente detetado em produtos de origem alimentar e em água, possuindo também elevada resistência antimicrobiana a antibióticos e desinfetantes o que tem conduzido, nos últimos anos, à necessidade de desenvolver novas técnicas e investigar novos compostos para o controlo e, em última instância, erradicação desta bactéria. O resveratrol, principal composto da família das fitoalexinas, possui inúmeras propriedades bioativas, nomeadamente a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tendo sido recentemente demonstrada a sua inibição sobre espécies de *Arcobacter*. De modo a fomentar a utilização deste composto em diversas aplicações, a sua baixa estabilidade e solubilidade aquosa têm vindo a ser ultrapassadas pela sua complexação e inclusão em diversos polímeros como, por exemplo, ciclodextrinas, sais biliares e microesferas poliméricas. De facto, a complexação do resveratrol com ciclodextrinas modificadas demonstrou um aumento considerável da solubilidade aquosa e da fotoestabilidade deste composto. Desta forma, o objetivo deste trabalho residiu no estudo da atividade antimicrobiana do resveratrol (RV), sob a forma de complexos de inclusão com a ciclodextrina modificada hidroxipropil-gama-ciclodextrina (HP- γ -CD) contra uma estirpe de referência de *A. butzleri* (LMG 10828), dois isolados de origem animal (AB 17/11 e AB 36/11) e dois isolados de origem clínica (INSA 593 e INSA 776).

Primeiramente procedeu-se à determinação dos fatores de virulência, onde os dois isolados clínicos revelaram a presença dos genes *cadF*, *tlyA*, *cj1349*, *hecA*, *pldA*, *ciaB* e *mviN*; a estirpe AB 36/11, apresentou mais um gene, o *hecB*, enquanto as estirpes LMG 10828 e AB 17/11 além dos oito genes descritos anteriormente, apresentaram no seu genoma o gene *irgA*. A resistência das estirpes a 9 antibióticos comuns foi também determinada, observando-se para a estirpe de referência e para os isolados clínicos a resistência à ampicilina, à amoxicilina, à vancomicina, à cefoperazona, à piperacilina e ao trimetoprim. Para além de apresentar resistência a estes antibióticos, a estirpe AB 36/11 tem resistência à ciprofloxacina. A estirpe AB 17/11 foi de todas elas, aquela que apresentou maior suscetibilidade, uma vez que o seu perfil de resistência inclui apenas os antibióticos vancomicina, ciprofloxacina e trimetoprim. A suscetibilidade do microrganismo aos complexos de inclusão (CI) formados foi determinada pelo método de microdiluição, onde se observou uma concentração mínima inibitória (CMI) de 256 $\mu\text{g/mL}$ para as estirpes LMG 10828 e INSA 776 e 64 $\mu\text{g/mL}$ para AB 36/11, AB 17/11 e INSA 593. Nesta fase foi também avaliada a suscetibilidade na presença de RV livre, obtendo-se uma CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$ para as cinco

estirpes. De modo a determinar a ação bacteriostática ou bactericida dos CIs foram realizadas curvas de morte para um isolado clínico (INSA 776) e um de origem animal (AB 36/11), o que permitiu concluir que os CIs possuem atividade bactericida dependente tanto do tempo de incubação como da concentração de agente antimicrobiano. Para concentrações de CI correspondentes a 2x e 4x a CMI a viabilidade celular é semelhante para os dois isolados, sendo que o isolado de origem humana demonstrou ser mais suscetível. Para o RV livre, o efeito bactericida ocorre de forma mais rápida para 1x, 2x e 4xCMI em ambos os isolados. O mecanismo de ação dos CI foi avaliado por citometria de fluxo para estes dois isolados, usando os fluorocromos SYTO® 40 para marcação de todas as células, bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (BOX) e 5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio (CTC), para avaliação de alterações a nível do potencial de membrana e atividade metabólica, respetivamente. Os resultados de citometria de fluxo demonstraram que, com o aumento da concentração de CI, ocorre a diminuição da atividade metabólica das células e, conseqüentemente, o aumento da despolarização da membrana das mesmas.

Dado que a formação de biofilmes por parte dos microrganismos está associada com a sua virulência, colonização e resistência a antibióticos, torna-se importante a sua monitorização bem como o estudo de formas que inibam o seu desenvolvimento. Assim sendo, foi também evidenciada a ação dos CIs e do RV livre na formação e na promoção da dispersão de biofilmes pré-formados, com elevada redução de biomassa de biofilme para as concentrações de 1x, 2x e 4x a CMI.

De forma geral, os resultados demonstram que os CIs apresentam atividade antimicrobiana sobre os isolados de *A. butzleri* tanto em células planctónicas como em biofilmes, sugerindo a aplicação destas formulações como soluções de origem natural para a indústria alimentar contra o desenvolvimento de *Arcobacter* spp.

Palavras-chave

Resveratrol; ciclodextrina; complexo de inclusão; *Arcobacter butzleri*; atividade antimicrobiana; biofilme.

Abstract

Currently, the genus *Arcobacter* has 18 described species, with the most relevant being *A. butzleri* since it is now considered an emerging zoonotic enteropathogenic agent for both animals and humans. This microorganism is usually detected in food products and water environments and also presents a high antimicrobial resistance to antimicrobials and disinfectants which has led, in recent years, to the need to develop new techniques and to search new compounds for the control and, even, eradication of this bacterium. Resveratrol, the main compound of the phytoalexins family, has innumerable bioactive properties, including antimicrobial activity against fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria, and recently its inhibition over *Arcobacter* species was demonstrated. In order to promote the use of this compound in various applications, its low stability and water solubility have been overcome by its complexation and inclusion in various polymers such as cyclodextrins, bile salts and polymeric microspheres. In fact, resveratrol complexation with modified cyclodextrins showed a considerable increase in the aqueous solubility and photostability of this compound. Thus, the main goal of this work was the evaluation of resveratrol antimicrobial activity, inclusion complexes with modified cyclodextrin hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (HP- γ -CD) against an *A. butzleri* reference strain (LMG 10828), two animal origin (AB 17/11 and AB 36/11) and two clinical origin (INSA 593 and INSA 776) isolates.

The first step of the study was the determination of the virulence factors where both clinical isolates presented the *cadF*, *tlyA*, *cj1349*, *hecA*, *pldA*, *ciaB* and *mviN* genes, the strain AB 36/11 presented one more gene, *hecB* while the strains LMG 10828 and AB 17/11 presented in their genome the gen *irgA* besides the eight ones already described for the other strains. The antimicrobial resistance profile to 9 common antibiotics was also evaluated and the results showed that both the reference strain and the clinical isolates were resistant to ampicillin, amoxicillin, vancomycin, cefoperazone, piperacillin and trimethoprim. Besides being resistant to all antibiotics previously mentioned, the strain AB 36/11 also presented resistance to ciprofloxacin. The strain AB 17/11 was the one that exhibited the highest susceptibility since its resistance profile only included vancomycin, ciprofloxacin and trimethoprim. This microorganism's susceptibility to the inclusion complexes (ICs) was determined by the microdilution method where minimum inhibitory concentrations (MIC) of resveratrol contained in the IC of 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for strains LMG 10828 and INSA 776 and 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for AB 36/11, AB 17/11 and INSA 593 were obtained. At this stage, the susceptibility of all strains to free RV was also assessed, obtaining a MIC of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the five strains studied. In order to determine the bacteriostatic or bactericidal action of ICs, time-kill curves were performed for a clinical (INSA 776) and an animal origin (AB 36/11) isolates, which showed that the observed bactericidal activity of the ICs was dependent on both incubation time and

antimicrobial agent concentration. For IC concentrations corresponding to 2x and 4x MIC, cell viability is similar for both isolates, with the clinical origin isolate exhibiting a higher susceptibility when exposed to concentrations equal to MIC values. For free RV, the bactericidal effect occurs more quickly for 1x, 2x e 4xMIC in both isolates. The ICs mechanism of action was evaluated by flow cytometry for these two isolates, using SYTO[®] 40 fluorochrome for total cell staining and bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (BOX) and 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) for the evaluation of cell membrane potential and metabolic activity, respectively. Flow cytometry results showed that increasing IC concentration led to increased reduction of the metabolic activity of cells which, in turn, resulted in increased cell membrane depolarization. A microorganism's ability to form biofilms is commonly associated with its increased virulence, colonization and resistance to antibiotics, thus being of extreme relevance to monitor these biofilms' formation while studying new ways to prevent or inhibit their development. Given this, this work also evidenced ICs and free RV action on biofilm formation as well as dispersion of pre-formed biofilms showing a high reduction in the biofilm's biomass for concentrations of 1x, 2x and 4x CMI.

Overall, the results obtained in this work showed that the ICs exhibited antimicrobial activity over *A. butzleri* reference strain and isolates both in planktonic cells and biofilms, suggesting the application of these natural-origin formulations in the food industry to prevent *Arcobacter* spp. development.

Keywords

Resveratrol; cyclodextrin; inclusion complex; *Arcobacter butzleri*; antibacterial activity; biofilm.

Índice

1. Introdução	1
1.1. O género <i>Arcobacter</i>	1
1.1.1. Taxonomia	1
1.1.2. Caraterísticas gerais.....	2
1.1.3. Identificação genómica	4
1.1.4. Distribuição	4
1.1.5. Vias de transmissão.....	5
1.1.6. Manifestações clínicas	6
1.1.7. Fatores de virulência.....	6
1.1.8. Resistência a antibióticos	8
1.1.9. Estudos anti- <i>Arcobacter</i>	9
1.1.10. A espécie <i>Arcobacter butzleri</i>	10
1.2. Biofilmes	11
1.2.1. Formação de biofilmes.....	11
1.2.2. Resistência a antibióticos	13
1.2.3. Controlo de biofilmes	14
1.3. Resveratrol.....	15
1.3.1. Atividades biológicas do resveratrol.....	16
1.3.1.1. Atividade antimicrobiana.....	17
1.3.1.2. Atividade antioxidante.....	18
1.3.1.3. Outras propriedades.....	18
1.3.2. Estabilidade do resveratrol	19
1.3.3. Formulações para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol	19
1.4. Ciclodextrina	20
1.4.1. Propriedades das ciclodextrinas.....	20
1.4.2. Toxicidade das ciclodextrinas	22
1.4.3. Formação de complexos de inclusão	22
1.4.4. Aplicação das ciclodextrinas.....	24

1.5. Objetivo	25
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1. Reagentes	26
2.2. Formação dos complexos de inclusão	26
2.3. Quantificação da concentração de resveratrol nos complexos de inclusão formados..	26
2.4. Microrganismos.....	27
2.5. Armazenamento e manutenção das estirpes	27
2.6. Caracterização das estirpes clínicas.....	27
2.6.1. Identificação dos isolados bacterianos clínicos.....	28
2.6.2. Ocorrência de possíveis fatores de virulência nos isolados clínicos	28
2.6.3. Suscetibilidade a antibióticos	29
2.7. Suscetibilidade aos complexos de inclusão formados e ao resveratrol livre	30
2.8. Curvas de morte em células planctónicas.....	30
2.9. Ensaio de Citometria de Fluxo	31
2.10. Efeito dos complexos de inclusão e de resveratrol na formação de biofilmes	33
2.11. Efeito dos complexos de inclusão e de resveratrol na dispersão de biofilmes já estabelecidos.....	33
3. Resultados e Discussão	35
3.1. Complexos de Inclusão.....	35
3.2. Caracterização dos isolados	36
3.3. Atividade dos complexos de inclusão e do resveratrol livre sobre <i>A. butzleri</i>	42
3.4. Mecanismo de ação dos complexos de inclusão sobre isolados de <i>A. butzleri</i>	48
3.5. Efeito dos complexos de inclusão e do resveratrol livre em biofilmes de <i>Arcobacter butzleri</i>	51
4. Conclusão	58
5. Perspetivas Futuras	60
6. Referências Bibliográficas	61

Índice de Figuras

Figura 1. Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Arcobacter</i> , tendo por base a similaridade da sequência do gene 16S do rRNA.	2
Figura 2. Mecanismo de virulência proposta para <i>A. butzleri</i>	7
Figura 3. Etapas da formação de biofilme.	12
Figura 4. Estruturas dos isômeros de resveratrol <i>cis</i> - e <i>trans</i> -.....	16
Figura 5. Síntese de <i>trans</i> -resveratrol em células vegetais.	16
Figura 6. Estrutura da alfa-ciclodextrina.....	20
Figura 7. Formação de complexos de inclusão em solução aquosa.	22
Figura 8. Perfis de solubilidade de fases e classificação dos complexos de acordo com Higuchi e Connors. S_0 representa a solubilidade intrínseca da molécula hóspede no meio de complexação aquoso, quando nenhuma CD está presente.	23
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.	37
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados relativos aos genes que codificam fatores de virulência.....	38
Figura 11. Representação gráfica das curvas de crescimento das estirpes de <i>A. butzleri</i> LMG 10828, AB 17/11, AB 36/11, INSA 593 e INSA 776.....	44
Figura 12. Representação gráfica das curvas de morte das estirpes de <i>A. butzleri</i> AB 36/11 (gráfico A) e INSA 776 (gráfico B) quando incubadas com complexo de inclusão.	45
Figura 13. Representação gráfica das curvas de morte das estirpes de <i>A. butzleri</i> AB 36/11 (gráfico A) e INSA 776 (gráfico B) quando incubadas com resveratrol livre.	46
Figura 14. “Dot plots” de fluorescência das células de <i>A. butzleri</i> AB 36/11 e INSA 776 marcadas com BOX e após 15 minutos de incubação com meio (A e F), com HP- γ -CD (B e G) e com complexo de inclusão com concentrações de 1xCMI (C e H), 2xCMI (D e I) e 4xCMI (E e J).	49

Figura 15. “Dot plots” de fluorescência das células de <i>A. butzleri</i> AB 36/11 e INSA 776 marcadas com CTC e após 2 horas de incubação com meio (A e F), com HP- γ -CD (B e G) e com complexo de inclusão com concentrações de 1xCMI (C e H), 2xCMI (D e I) e 4xCMI (E e J). ...	50
Figura 16. Absorvância a 570 nm dos biofilmes formados pelas estirpes em estudo e classificação da capacidade de formação de biofilme.	52
Figura 17. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de <i>A. butzleri</i> LMG 10828.	52
Figura 18. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de <i>A. butzleri</i> AB 17/11.	53
Figura 19. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de <i>A. butzleri</i> AB 36/11.	53
Figura 20. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de <i>A. butzleri</i> INSA 593.	53
Figura 21. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de <i>A. butzleri</i> INSA 776.	54
Figura 22. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de <i>A. butzleri</i> LMG 10828.	55
Figura 23. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de <i>A. butzleri</i> AB 17/11.	55
Figura 24. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de <i>A. butzleri</i> AB 36/11.	56
Figura 25. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de <i>A. butzleri</i> INSA 593.	56
Figura 26. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de <i>A. butzleri</i> INSA 776.	56

Índice de Tabelas

Tabela 1. Representação taxonômica do gênero <i>Arcobacter</i>	1
Tabela 2. Principais características bioquímicas de <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> e <i>A. skirrowii</i>	4
Tabela 3. Propriedades das ciclodextrinas naturais.	21
Tabela 4. Sequências dos “primers” utilizados na identificação por PCR ao nível da espécie.	28
Tabela 5. Sequência de “primers” usados para detetar a presença de fatores de virulência nos isolados clínicos.	29
Tabela 6. Concentração dissolvida de resveratrol e estequiometria dos complexos de inclusão. O resultado é apresentado como média \pm desvio padrão de todos os ensaios.	35
Tabela 7. Caracterização das estirpes em estudo no que respeita à presença/ausência dos genes codificantes para os fatores de virulência.	38
Tabela 8. Perfis de resistência a antibióticos dos isolados clínicos, animais e estirpe de referência e respetivo fenótipo de resistência.	40
Tabela 9. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para o complexo de inclusão e para o resveratrol livre contra as estirpes de <i>A. butzleri</i> . Os valores são apresentados em ug/mL.	42
Tabela 10. Percentagem de células de <i>A. butzleri</i> positivas para BOX (BOX+) e CTC (CTC+) na presença de várias concentrações de complexo de inclusão. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes.	48

Lista de Acrónimos

AMX	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
BHI	Brain Heart Infusion
BOX	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol
CD	Ciclodextrina
CFP	Cefoperazona
CGTase	Glucanotransferase da ciclodextrina
CHL	Cloranfenicol
CI	Complexo de inclusão
CIP	Ciprofloxacina
CMI	Concentração mínima inibitória
CTC	5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio
DO	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigénio
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
GEN	Gentamicina
HP- α -CD	Hidroxipropil-alfa-ciclodextrina
HP- β -CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HP- γ -CD	Hidroxipropil-gama-ciclodextrina
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução com detetor de díodos
MHB	Mueller-Hinton Broth
M- β -CD	Metil- β -ciclodextrina
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PIP	Piperacilina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RM- β -CD	Beta-ciclodextrina aleatoriamente metilada
RV	Resveratrol
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
STS	Estilbeno sintase

TAE	Tris-Acetato-EDTA
TMP	Trimetoprim
UFC	Unidades formadoras de colónias
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta resolução
UV	Ultra-violeta
VAN	Vancomicina

1. Introdução

A relevância clínica e a incidência das espécies de *Arcobacter* como potencial agente patogénico humano podem ter sido subestimadas devido à falta de métodos de deteção e identificação deste organismo (Vandenberg *et al.*, 2004). No entanto, a sua presença foi descrita em alimentos (maioritariamente de origem animal), em águas, instalações de processamento e manipulação de alimentos e em amostras humanas (Ho *et al.*, 2007). Desde o seu primeiro isolamento, três das espécies deste género, *Arcobacter butzleri* e, mais raramente, *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter skirrowii* foram associadas com doenças animais, incluindo diarreias e abortos (Rivas *et al.*, 2004) e com doenças humanas como enterites e, em alguns casos, bacteriemias (Lehner *et al.*, 2005; Vandenberg *et al.*, 2004).

1.1. O género *Arcobacter*

1.1.1. Taxonomia

Incluída na classe ϵ -*Proteobacteria*, a família *Campylobacteraceae* apresenta três géneros distintos: *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* (Levican *et al.*, 2012). O género *Arcobacter* (Tabela 1) foi proposto em 1991 por Vandamme *et al.* para incluir duas espécies inicialmente consideradas como *Campylobacter*-aerotolerantes, *Campylobacter cryaerophilus* e *Campylobacter nitrofigilis*, sendo estas espécies atualmente denominadas como *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter nitrofigilis*, respetivamente (ColladoeFigueras, 2011).

Tabela 1. Representação taxonómica do género *Arcobacter*.

Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Classe	ϵ - <i>Proteobacteria</i>
Ordem	<i>Campylobacterales</i>
Família	<i>Campylobacteraceae</i>
Género	<i>Arcobacter</i>

Até ao momento, foram já reconhecidas 18 espécies do género *Arcobacter* (Levican *et al.*, 2013; Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). A taxonomia deste género baseia-se, principalmente, na análise do gene 16S do rRNA e, atualmente, na análise filogenética “multilocus”, uma técnica

mais discriminativa baseada na concatenação de fragmentos internos de genes “housekeeping” (Calvo *et al.*, 2013; Collado e Figueras, 2011; Levican *et al.*, 2012, 2013). Para todas as espécies de *Arcobacter* já descritas, existe um nível de similaridade interespecífica baseada na sequência do gene 16S do rRNA, sendo as espécies *A. cloacae* e *A. ellisii* as mais relacionadas (Figura 1), com 99,6% de similaridade (Levican *et al.*, 2013). Num estudo efetuado em 2008 onde se procedeu à análise filogenética de 60 genes a partir de genomas de *A. butzleri*, de outros membros da família *Campylobacteraceae* e de outras bactérias relacionadas, foi demonstrado que a espécie filogeneticamente mais próxima de *A. butzleri* é a espécie *Sulfurimonas denitrificans*, o que começou a levantar algumas dúvidas sobre a inclusão desta espécie na família *Campylobacteraceae* (Collado e Figueras, 2011).

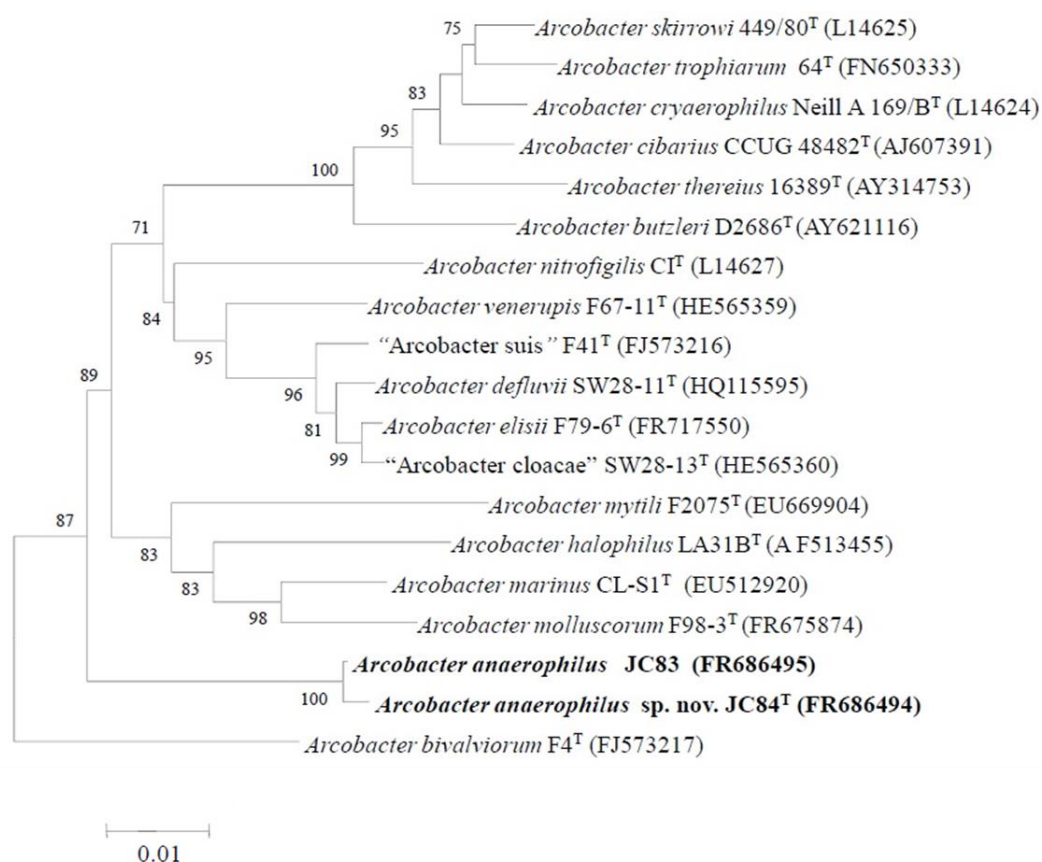


Figura 1. Árvore filogenética das espécies do género *Arcobacter*, tendo por base a similaridade da sequência do gene 16S do rRNA. Fonte: Sasi Jyothsna *et al.*, 2013

1.1.2. Características gerais

As espécies do género *Arcobacter* fazem parte do grande grupo de bactérias Gram-negativas com características fastidiosas (Arias *et al.*, 2011; Lehner *et al.*, 2005; Phillips, 2002; Vandenberg *et al.*, 2004). Como bactérias Gram-negativas, a sua parede celular é formada por uma membrana rígida de peptidoglicano disposta em monocamada, uma membrana

externa e o espaço periplasmático (onde se encontra o periplasma). Devido a esta complexa estrutura, a parede celular das bactérias Gram-negativas torna-se, assim, num fator limitante à entrada de antibióticos na célula, podendo ser um dos principais motivos pela maior resistência das bactérias Gram-negativas a agentes antibacterianos (Ferreira *et al.*, 2010; Prescott *et al.*, 2002).

Os microrganismos deste género apresentam forma de bacilos curvados com um comprimento entre 0,5 a 3,0 μm e uma largura entre 0,2 a 0,9 μm . Após incubação em placas de agar sangue, as colónias apresentam uma coloração cinzenta esbranquiçada, com um diâmetro entre 2 e 4 mm (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). Estas bactérias estão caracterizadas como não formadoras de esporos, possuindo flagelos polares simples numa das extremidades da célula, o que lhes confere motilidade (de Boer *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2007). Contudo, a recente descoberta da existência da espécie *Arcobacter anaerophilus* levou à alteração da descrição deste género, dado que esta possui características divergentes das restantes espécies, por exemplo, esta espécie não apresenta flagelos e o seu crescimento não é possível em agar sangue contrariamente ao que se verifica com todas as outras espécies pertencentes ao género (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). De uma forma geral, algumas das espécies da família *Campylobacteraceae* são patogénicas e/ou estão associadas a um hospedeiro em particular (Miller *et al.*, 2007). No caso do género *Arcobacter*, apenas três das dezoito espécies descritas são consideradas patogénicas, havendo outras espécies que não estão associadas a qualquer tipo de hospedeiro, não apresentando, desta forma, patogenicidade para os organismos vivos (Cervenka, 2007; Miller *et al.*, 2007).

Os géneros *Campylobacter* e *Arcobacter* apresentam morfologia e taxonomia semelhante; contudo, enquanto as espécies de *Campylobacter* necessitam de uma atmosfera específica com baixo teor de oxigénio, microaerofilia, para crescerem e se desenvolverem, as espécies de *Arcobacter* têm a capacidade de o fazer nestas condições e também na presença de concentrações mais elevadas de oxigénio (Miller *et al.*, 2007), com a exceção de *A. anaerophilus* cujo crescimento só é possível em condições de anaerobiose (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). Uma outra característica que permite distinguir estes dois géneros passa pela temperatura a que as espécies são capazes de crescer. Enquanto as espécies de *Campylobacter* só se desenvolvem a temperaturas mais elevadas, entre 37 e 42 °C, as espécies do género *Arcobacter* têm a capacidade de crescer a temperaturas mais baixas, num intervalo de temperatura entre 15 e 37 °C (Collado e Figueras, 2011; Zanetti *et al.*, 1996), tendo sido também descritas algumas espécies com a capacidade de se desenvolverem igualmente a 42 °C (Shah *et al.*, 2011). Outra diferença entre os dois géneros reside no grau de halotolerância, uma vez que as bactérias do género *Arcobacter* são geralmente reconhecidas como resistentes a um nível de salinidade superior, ou seja, a um nível mais baixo de atividade da água (Cervenka, 2007).

Quanto às suas características bioquímicas, as bactérias do género *Arcobacter* são catalase-positivas, com exceção das espécies *A. halophilus*, *A. marinus* e *A. anaerophilus*, e oxidase-positivas, são capazes de reduzir nitratos, excluindo as espécies *A. cibarius*, *A. trophiarum*, *A. mytilii*, *A. bivalviorum* e a maioria das estirpes de *A. cryaerophilus*, e de hidrolisar o acetato de indoxilo (exceto *A. mytili* e *A. molluscorum*), não sendo, no entanto, capazes de hidrolisar o hipurato (Arias *et al.*, 2011; Collado e Figueras, 2011; Levican *et al.*, 2013). Na tabela 2 estão representadas as características bioquímicas das três espécies do género *Arcobacter* consideradas patogénicas.

Tabela 2. Principais características bioquímicas de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*.

Características	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Urease	-	-	-
Redução de Nitratos	+	+	+
Hidrólise de Hipurato	-	-	-
Hidrólise de Indoxil Acetato	+	+	+

1.1.3. Identificação genómica

Até à data, ainda não existe nenhum método padronizado para a deteção de *Arcobacter*, apesar de várias abordagens como testes bioquímicos, perfis proteicos e perfis de ácidos gordos terem já sido utilizadas para diferenciar entre espécies deste género. Os métodos de deteção e identificação moleculares têm sido das ferramentas mais utilizadas em laboratórios de microbiologia clínica para a deteção e identificação de *Arcobacter* (de Boer *et al.*, 2013). Até à data, foram já desenvolvidos vários protocolos de reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”, PCR) diferentes e específicos para a identificação de *Arcobacter*, sendo, até ao momento, o método de “Multiplex-PCR” desenvolvido em 2000 por Houf e colaboradores, o mais utilizado a nível mundial (Collado e Figueras, 2011).

1.1.4. Distribuição

As espécies de *Arcobacter* são frequentemente isoladas de produtos de origem animal. Apesar da frequência descrita, o facto de não existir um método de deteção padrão, poderá ter resultado numa subestimação da verdadeira ocorrência destes microrganismos em alimentos (Cervenka, 2007). Foram já realizados vários estudos para o isolamento e identificação de espécies deste género, em amostras de produtos de origem animal, como carcaças de aves

domesticas, carnes de porco e de vaca (Atabay *et al.*, 2003; Houf e Stephan, 2007; Johnson, 2002; Kabeya *et al.*, 2004; Ohlendorf e Murano, 2002) que mostraram que, a espécie que é mais comumente isolada é *A. butzleri*, seguindo-se *A. cryaerophilus* (de Boer *et al.*, 2013; Rivas *et al.*, 2004).

No que respeita à presença de *Arcobacter* em fontes de água, as espécies de *Arcobacter* têm sido detetadas em vários tipos de água, incluindo baías, águas subterrâneas, águas superficiais, águas marinhas e no esgoto bruto (Diergaardt *et al.*, 2004; Lehner *et al.*, 2005). As águas residuais são um importante reservatório de *A. butzleri*, sendo esta a única espécie do género isolada a partir de poços de água usados como fontes de água potável (Rice *et al.*, 1999). Talvez devido à sua existência em fontes de água, a presença desta espécie foi também descrita em plâncton, sendo estas bactérias mais abundantes quando associadas a este do que na sua forma livre (Fera *et al.*, 2008). Neste sentido, é igualmente importante salientar a habilidade que *A. butzleri* tem de estabelecer endossimbiose com amebas de vida livre, que além de lhe servirem de transporte, servem também como agentes protetores de fatores ambientais adversos (Fernández *et al.*, 2012).

1.1.5. Vias de transmissão

A transmissão de *Arcobacter* é altamente favorecida pelas características da própria bactéria, uma vez que tem a capacidade de sobreviver em ambientes adversos, devido à sua tolerância a elevadas concentrações de hipoclorito de sódio, metais pesados e a capacidade de crescer a baixas temperaturas, em ambientes secos e aderir a diversas superfícies (Cervenka, 2007).

Apesar da imensa variedade de bactérias que fazem parte da flora intestinal do ser humano, nenhuma espécie de *Arcobacter* faz parte desse grupo, levando a crer que a via de transmissão mais provável destes microrganismos passa pelo consumo de água e/ou alimentos de origem animal (carne, leite ou mariscos) já contaminados (Arias *et al.*, 2011; Collado e Figueras, 2011; Lehner *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2007). O contacto com as fezes de animais domésticos contaminados e, em certos casos, com a sua saliva pode, também, representar uma forma de transmissão (Collado e Figueras, 2011).

De forma semelhante à que ocorre no ser humano, pensa-se que a transmissão de *Arcobacter* aos animais é efetuada, do mesmo modo, pelo consumo de águas contaminadas (Snelling *et al.*, 2006). Contudo, se não ocorrer contaminação dos animais ainda vivos, o posterior contacto das suas carcaças com fezes de animais contaminados durante o processamento das carnes pode ser a fonte de transmissão deste microrganismo (Aydin *et al.*, 2007).

1.1.6. Manifestações clínicas

Têm sido identificadas inúmeras doenças emergentes que afetam o ser humano, na sua maioria de origem infecciosa, incluindo doenças bacterianas, virais, parasíticas que são, por vezes, de difícil classificação. Muitas destas enfermidades são de origem zoonótica, ou seja, resultam da transmissão a humanos de agentes patogénicos de outras espécies animais como é o caso do género *Arcobacter*, bactéria classificada como agente zoonótico emergente e de grande importância pública (Calvo *et al.*, 2013). Uma vez que este microrganismo é mais frequentemente isolado de amostras de fezes diarreicas do que amostras de fezes não diarreicas, é sugerido que esta bactéria não é meramente um comensal humano, mas sim um microrganismo com relevância clínica (Miller *et al.*, 2007).

Nos casos já reportados, a bactéria *A. butzleri* encontra-se associada a doenças intestinais humanas (Phillips, 2002), onde o quadro clínico associado à infeção por este microrganismo se traduz maioritariamente por diarreias aquosas persistentes acompanhadas de dor abdominal, cólicas e vômitos, podendo, em alguns casos, ocorrer febre (Vandenberg *et al.*, 2004). Este microrganismo foi relacionado com bacteriemias em crianças e em adultos, nomeadamente num paciente com cirrose hepática e em dois pacientes que sofriam de doença crónica subjacente (Phillips, 2002; Arias *et al.*, 2011). Além de ter sido associada a diarreia crónica, esta bactéria foi igualmente ligada a casos de diarreia de viajantes, uma vez que um estudo revelou a presença de *A. butzleri* em 13 % das refeições servidas nos cinco melhores restaurantes de Bangkok (Teague *et al.*, 2010) e 8 % dos visitantes das cidades de Guatemala, México e Índia apresentaram casos positivos de diarreia; porém, uma vez que *A. butzleri* foi detetada conjuntamente com outros microrganismos, não é possível associar diretamente *A. butzleri* como o agente causador da infeção dos pacientes em estudo (Jiang *et al.*, 2010).

1.1.7. Fatores de virulência

O termo virulência refere-se ao grau ou intensidade da patogenicidade, ou seja, ao potencial de um organismo originar doença. Várias características físicas e químicas contribuem para esta patogenicidade, sendo estas características individuais que conferem virulência denominadas de fatores de virulência. A virulência de um microrganismo depende de vários fatores, como a capacidade de entrar, aderir e colonizar um hospedeiro de forma a evitar, subverter ou ultrapassar as defesas inatas do mesmo, o que lhe permitirá, posteriormente multiplicar-se ou persistir, causando lesão tecidual ou doença, podendo ter a capacidade de sair e transmitir a infeção a outros hospedeiros (Ferreira, 2010; Prescott, 2002).

Com a finalidade de compreender mais capazmente os mecanismo de virulência e patogenicidade de *Arcobacter*, nos últimos anos, têm sido realizados vários estudos com o intuito de demonstrar a capacidade de aderência (Carbone *et al.*, 2003; Gugliandolo *et al.*,

2008; Ho *et al.*, 2007; Houf e Stephan, 2007; Vandenberg *et al.*, 2004), invasão (Fernández *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 2007; Vandenberg *et al.*, 2004) e citotoxicidade (Carbone *et al.*, 2003; Gugliandolo *et al.*, 2008; Johnson, L. G., 2002; Vandenberg *et al.*, 2004) desta bactéria em diversas linhas celulares. Considerando os estudos apresentados até 2011, de um modo geral, para as três espécies consideradas patogênicas, os estudos concluíram que cerca de 55 % das estirpes apresentam capacidade de aderência (53/97), 21 % de capacidade invasiva (9/42) e 85 % de citotoxicidade (164/194) (Collado e Figueras, 2011).

Num estudo realizado em 2009, células epiteliais do cólon humano HT-29/B6 foram infectadas com duas estirpes de *A. butzleri* para tentar compreender o mecanismo pelo qual este microrganismo causa diarreia. Os resultados indicaram uma redução na expressão de algumas proteínas das junções apertadas, mais concretamente das claudinas 1, 5 e 8, originando uma disfunção na barreira epitelial, um aumento concomitante do transporte paracelular e a apoptose das células, podendo levar assim a uma diarreia persistente (Figura 2) (Bücker *et al.*, 2009).

Um dos maiores fatores de virulência associado a outras bactérias da família *Campylobacteraceae* passa pela capacidade de indução da expressão de citocina pró-inflamatória interleucina-8 (IL-8), que promove a quimiotaxia dos neutrófilos no processo inflamatório. Esta capacidade foi igualmente relatada para estirpes de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, e *A. cibarius*. No entanto, apesar de todas as estirpes mostrarem capacidade de induzir a expressão de IL-8 em linhas celulares tumorais humanas de cancro colorrectal, Caco-2, e em células epiteliais do intestino de porco, não foi encontrada nenhuma correlação com os níveis de adesão e/ou invasão celular (Ho *et al.*, 2007).

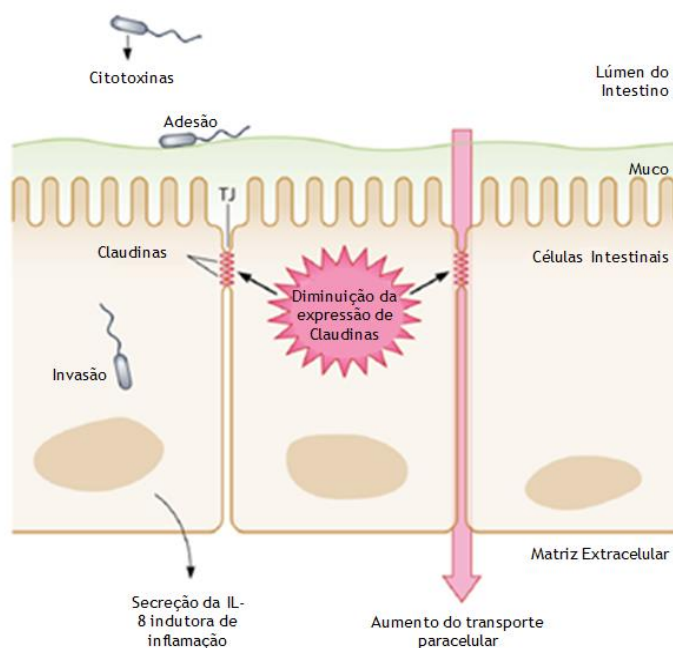


Figura 2. Mecanismo de virulência proposta para *A. butzleri*. Fonte: Collado e Figueras, 2011.

A presença de genes que determinam virulência foi também relatada para *Arcobacter*, tanto em estirpes clínicas como em estirpes não clínicas. Alguns exemplos destes genes são os genes que codificam para proteínas de ligação à fibronectina (*cadF* e *cj1349*), para a fosfolipase A (*pldA*) e para a proteína principal da membrana externa (*porA*). Os genes que codificam antígenos associados à invasão celular (*ciaB*), bem como outros essenciais à biossíntese do peptidoglicano (*mviN*) e o gene da hemolisina (*tlyA*) também estão presentes em *A. butzleri*. Além destes, o gene *hecB* que codifica uma proteína ativadora de hemolisina, *hecA*, membro da família de hemaglutinina filamentosa, e *irgA* que codifica uma proteína da membrana externa regulada por ferro também foram também já relatados para esta espécie (Collado e Figueras, 2011; Doudah *et al.*, 2012; Karadas *et al.*, 2013). No entanto, ainda não se determinou se as funções destes genes são semelhantes às já descritas para outras espécies homólogas (Karadas *et al.*, 2013).

Os flagelos bacterianos e as suas subunidades proteicas, as flagelinas, além de estarem envolvidos na motilidade e na quimiotaxia das células, desempenham, também, um importante papel na colonização e invasão celular. Tanto os genes da flagelina *flaA* como *flaB* foram encontrados em estirpes de *A. butzleri*, sendo que apenas o primeiro foi descrito como necessário para a motilidade da célula. No entanto, os estudos realizados ainda não são suficientes para elucidar se o flagelo presente na célula pode ser considerado um fator de virulência essencial para colonização do trato gastrointestinal (Collado e Figueras, 2011; Ho *et al.*, 2008).

1.1.8. Resistência a antibióticos

Na era pré-antibiótica, as doenças infecciosas eram a principal causa de morte. No entanto, com a industrialização da sociedade, a indústria farmacêutica tornou-se umas das maiores áreas de desenvolvimento técnico-científico, tendo como objetivo principal a descoberta de novas moléculas terapêuticas cada vez mais potentes e eficazes, sem quaisquer efeitos tóxicos e com poucos ou nenhuns efeitos secundários. Desta forma, a medicina moderna tornou-se dependente destes agentes que destroem ou inibem o crescimento dos microrganismos patogénicos a concentrações tão baixas que não são possíveis de causar danos no hospedeiro. Após o acaso da descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, por Alexander Fleming, o avanço na procura de agentes antimicrobianos e a sua utilização no tratamento de doenças infecciosas não tem cessado. (Ferreira, 2010; Prescott, 2002).

A elevada eficácia dos antibióticos conduziu à sua utilização em larga escala, tanto no tratamento de doenças no Homem como em animais, o que resultou no desenvolvimento de estirpes microbianas resistentes a estes agentes antibacterianos, com uma maior incidência a nível hospitalar, dificultando, desta forma, o tratamento de doenças infecciosas por falta de opções terapêuticas (Ferreira, 2010; Son *et al.*, 2007).

No caso de infecção por espécies de *Arcobacter*, e da mesma forma que acontece com *Campylobacter*, alguns dos casos reportados de enterites e bacteriemia foram, aparentemente, autolimitados, não tendo sido necessário o uso de qualquer tipo de tratamento antibacteriano. Porém, se for verificada um aumento de gravidade ou o prolongamento dos sintomas, o tratamento destes casos poderá justificar o uso de antibióticos (Calvo *et al.*, 2013; Collado e Figueras, 2011; Ho *et al.*, 2008).

Como já foi referido anteriormente, a espécie *A. butzleri* é, de entre as espécies do género, aquela que mais importância tem a nível de patogenicidade para com o Homem e outros animais e, além da sua vasta distribuição e variabilidade genética, esta espécie apresenta ainda resistência a vários agentes antimicrobianos (Ferreira *et al.*, 2013). Uma vez que ainda não existem critérios internacionalmente aceites para os pontos de corte e testes de suscetibilidade para *Arcobacter* (Son *et al.*, 2007), atualmente os dados disponíveis resultam da realização de diversos métodos, como E-teste, métodos de diluição em agar, de difusão em agar com disco e métodos de microdiluição (Fera *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2013; Houf *et al.*, 2004, 2001; Son *et al.*, 2007; Teague *et al.*, 2010; Vandenberg *et al.*, 2006). Os resultados destes estudos têm demonstrado que muitas estirpes de *A. butzleri* são resistentes a vários antibióticos como a azitromicina, a clindamicina, a ciprofloxacina, o metronidazol, a carbenicilina, a cefoperazona, ao ácido nalidíxico, à ampicilina e cloranfenicol (Calvo *et al.*, 2013; Collado e Figueras, 2011).

É importante salientar que os estudos de suscetibilidade antimicrobiana com estirpes de *A. butzleri*, tanto de origem animal como humana são muito reduzidos, e na ausência de um tratamento específico recomendado, este torna-se empírico (Collado e Figueras, 2011). O tratamento com fluoroquinolonas e tetraciclina, tal como com aminoglicosídeos foi proposto para as infeções causadas por *Arcobacter* em humanos e animais, uma vez que estes apresentam uma boa atividade contra estirpes deste género (Calvo *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2007).

1.1.9. Estudos anti-*Arcobacter*

Vários estudos têm sido realizados de forma a eliminar estes microrganismos através do uso de conservantes químicos (Phillips e Duggan, 2001), métodos físicos (Hilton *et al.*, 2001) ou aplicação de extratos de plantas (Adesiji e Adefioye, 2012) e óleos essenciais (Irkinet *et al.*, 2011). Cervenka e colaboradores (2004) estudaram o efeito do pH e da atividade da água (a_w) sobre *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* utilizando vários ácidos orgânicos fracos, para o controlo de pH e humectantes para controlar a a_w . Verificou-se que, para o ácido fórmico, tartárico e cítrico ocorre a inibição de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* a pH 5,5 e 6,0, respetivamente, e ambas as espécies demonstraram ser extremamente sensíveis a valores de a_w inferiores a 0,98, quando utilizados cloreto de sódio (NaCl), glicerol e sacarose como humectantes. Estas características de crescimento podem ser restrições importantes para a sobrevivência de

Arcobacter spp. em alimentos e produtos alimentares (Cervenka *et al.*, 2004). Num outro estudo, avaliou-se a concentração inibitória de vários ácidos orgânicos, como ácido benzoico, acético e palmítico, sobre espécies de *Arcobacter*, onde se observou a inibição de todas as estirpes testadas pelos ácidos orgânicos em estudos *in vitro*. Posteriormente, foi testado o efeito de oito dos ácidos orgânicos em estudo contra *A. butzleri* inoculado em carcaças de galinha demonstrando que os oito ácidos testados suprimiram a proliferação bacteriana (Skřivanová *et al.*, 2011). As combinações de nisina com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e de nisina com fosfato trisódico também demonstraram ser boas opções para a eliminação de espécies de *Arcobacter*, uma vez que estes tratamentos combinados quando aplicados em alimentos contaminados com *Arcobacter* demonstraram ser mais efetivos em comparação com os tratamentos de EDTA e fosfato trisódico realizados de forma isolada (Phillips e Duggan, 2001).

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de clorofórmio ou metanólicos de dezassete especiarias e extratos de plantas medicinais contra *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* pelo método de difusão em disco demonstrou a inibição do crescimento das três espécies de *Arcobacter* por todos os extratos testados, sendo que os extratos metanólicos de canela, uva-de-urso, camomila, salvia e alecrim foram aqueles que mostraram a atividade antimicrobiana mais forte (Cervenka *et al.*, 2006). Seguindo uma linha semelhante, Irkin e colaboradores investigaram a atividade de óleos essenciais comerciais contra espécies de *Arcobacter* utilizando o método de difusão em disco, concluindo que os óleos de alecrim, canela, louro e cravo-da-índia têm uma forte atividade inibitória contra estirpes de *A. butzleri* e *A. skirrowii*. Uma vez que, geralmente, a composição do alimento reduz a atividade antimicrobiana dos compostos, um estudo investigou o efeito do óleo essencial de alecrim (0,5 % (v/m)) sobre *A. butzleri* num sistema de carne picada cozinhada mantida a 4 °C, tendo sido observada a inibição completa da estirpe testada (Irkin *et al.*, 2011).

1.1.10. A espécie *Arcobacter butzleri*

De entre as espécies reconhecidas pertencentes ao género *Arcobacter*, a espécie *A. butzleri* é considerada a mais importante e prevalente. Foi classificada como um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (Collado e Figueras, 2011) e é considerada, atualmente, como um enteropatogénico zoonótico emergente para animais e humanos (Arias *et al.*, 2011; de Boer *et al.*, 2013; Vandenberg *et al.*, 2004). Como já foi referido, a verdadeira incidência e importância clínica deste agente patogénico podem ter vindo a ser subestimadas devido à inexistência de métodos padronizados para a sua identificação (de Boer *et al.*, 2013; Vandenberg *et al.*, 2004); contudo, e apesar dos problemas associados à sua deteção, foram já descritos diversos casos sobre o isolamento de *A. butzleri* e a associação deste microrganismo a doenças entéricas em animais e humanos (Fera *et al.*, 2004). Esta bactéria foi isolada pela primeira vez em 1991

por Kiehlbauch e colaboradores a partir de humanos, principalmente com doença diarreica, e de animais de vários continentes. Neste primeiro isolamento foi denominada por *Campylobacter butzleri*, sendo, um ano mais tarde, esta classificação revista e incluída no género *Arcobacter* por Vandamme e colegas (1992). A sua ampla distribuição tem sido associada a uma elevada variabilidade genética, com múltiplos genótipos que podem ser encontrados num único local ou mesmo num único animal (Ferreira *et al.*, 2013). *A. butzleri* está naturalmente presente em ambientes aquosos, tanto de água doce como de água salgada (Miller *et al.*, 2007) e em diversos produtos de origem animal, com significativa prevalência em carcaças e miudezas de aves domésticas, seguindo-se a carne de porco e de vaca (Driessche e Houf, 2007), tendo já sido isolada do trato intestinal e de fezes destes e de outros animais (Collado e Figueras, 2011; Fernández *et al.*, 2007; Patyal *et al.*, 2011). A sua presença foi também descrita em moluscos e leite de vaca obtido de animais com e sem mastites (Patyal *et al.*, 2011; Pianta *et al.*, 2007; Vandamme *et al.*, 1992) e nos matadouros e superfícies utilizadas para o processamento de carnes, principalmente de carnes de aves, podendo esta última, ser uma fonte de contaminação cruzada das carnes em processamento (Ferreira *et al.*, 2013). A temperatura ótima de crescimento de *A. butzleri* é 30 °C, mas está descrito que o seu crescimento é possível dentro de um intervalo de temperaturas entre 10 e 37 °C, não tendo sido detetado qualquer tipo de crescimento desta espécie à temperatura de 40 °C, ao contrário do que se verifica com outras espécies do género. Quanto ao pH, esta bactéria consegue desenvolver-se entre valores de pH de 5 e 8,5, sendo que o pH ótimo para o crescimento se situa entre 6 e 8 para uma temperatura de 30 °C (Jette Kjeldgaard e Jørgensen, 2009; Lehner *et al.*, 2005).

1.2. Biofilmes

1.2.1. Formação de biofilmes

Na maior parte dos ambientes naturais, industriais ou clínicos, as bactérias são encontradas maioritariamente aderidas a determinada superfície inerte, ou seja, na forma de biofilmes (Parsek e Singh, 2003). Os dados em que esta teoria se baseia foram obtidos principalmente dos ecossistemas aquáticos naturais, em que observações microscópicas diretas e técnicas de recuperação direta mostraram que 99,9% das bactérias crescem em biofilmes numa grande variedade de superfícies (Donlan, 2002).

Os biofilmes formam-se a partir do momento em que microrganismos livres, no seu estado planctónico, em resposta a estímulos ambientais específicos, como a disponibilidade de nutrientes, aderem e crescem numa determinada superfície e produzem polímeros extracelulares que facilitam a sua fixação e a formação de uma matriz, o que permite a existência de uma comunidade de microrganismos ligados a essa mesma superfície (O'Toole

et al., 2000). Desta forma, a formação de um biofilmes pode ser compreendida por duas etapas principais, adesão e desenvolvimento, após o desenvolvimento o biofilme pode propagar-se através da dispersão do mesmo (Figura 3) (Donlan, 2001).

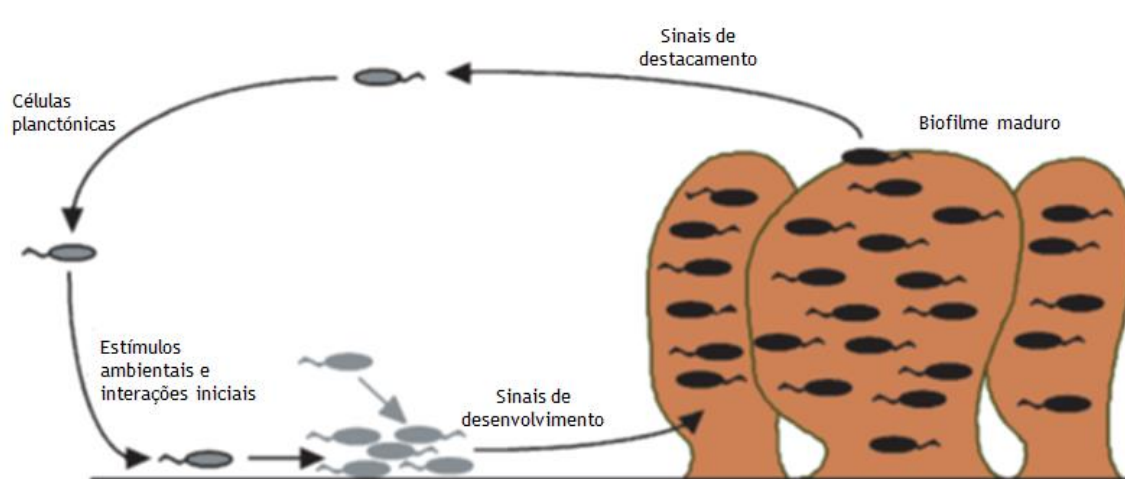


Figura 3. Etapas da formação de biofilme. Fonte: O'Toole *et al.*, 2000.

Para se compreender a primeira etapa, isto é, a adesão das bactérias, é necessário conhecer tanto as propriedades da superfície à qual os organismos irão aderir, como a superfície das próprias células. Os materiais destas superfícies de adesão podem ter características muito distintas como serem hidrofóbicos ou hidrofílicos ou apresentarem superfícies mais rugosas ou suaves. As características do material têm um efeito significativo na taxa de ligação e extensão dos microrganismos do biofilme, sendo que, geralmente, os materiais com características mais rugosas e mais hidrofóbicos provocam um desenvolvimento mais rápido do biofilme. No que toca às características das bactérias, a presença de flagelo, pili ou fímbria é uma mais-valia para a capacidade de adesão das mesmas, uma vez que a presença destes elementos permite que as células sejam capazes de ultrapassar as forças de repulsão comuns a todos os materiais e que, assim, permaneçam ligadas à superfície (Donlan, 2001). Existem várias alterações funcionais evidentes em células presentes em biofilme, uma vez que ocorre uma alteração no fenótipo dos microrganismos no que diz respeito à sua taxa de crescimento e à transcrição de genes (Donlan, 2001; Donlan e Costerton, 2002), levando a alterações na sua fisiologia, superfície celular, resistência a agressões ambientais, entre outras características (O'Toole *et al.*, 2000).

Após as células aderirem a uma superfície, o biofilme começa a desenvolver-se, ou seja, as células começam a sua divisão celular, formando microcolónias e produzindo substâncias poliméricas extracelulares (SPE), principalmente polissacarídeos, que formam a matriz do biofilme. Esta matriz é altamente hidratada e fortemente ligada à superfície adjacente (Donlan, 2001; O'Toole *et al.*, 2000). A estrutura do biofilme é extremamente heterogênea

(O'Toole *et al.*, 2000), tanto espacial como temporalmente. Estão presentes canais de água que permitem o transporte de nutrientes essenciais e de oxigênio para as células que crescem dentro do biofilme. Estes canais atuam como um tipo de filtro que retém minerais e componentes do hospedeiro, como a fibrina, glóbulos vermelhos e plaquetas (Donlan, 2001).

Quanto ao crescimento das células em biofilme, verifica-se que os microrganismos aderidos ao biofilme crescem de forma mais lenta que as células planctônicas, provavelmente pela limitação de nutrientes e/ou oxigênio (Donlan, 2001). Enquanto os nutrientes forem capazes de chegar ao seu interior, o biofilme desenvolve-se continuamente; porém, quando as bactérias são privadas dos mesmos, destacam-se da superfície e retornam à forma planctônica (O'Toole *et al.*, 2000). São três os principais processos de destacamento do biofilme: erosão ou separação, baseada na remoção contínua de pequenas porções do biofilme; descamação, onde ocorre uma rápida remoção em massa; e abrasão, sendo que neste caso o destacamento é provocado pela colisão de partículas contra o biofilme (Nunes *et al.*, 2007). Aparentemente, a forma de destacamento dos biofilmes afeta as características fenotípicas dos microrganismos, já que, em células que se separam como resultado da multiplicação celular, podem voltar rapidamente ao fenótipo de células planctônicas, enquanto que os agregados que se separam do biofilme tendem a manter determinadas características como a resistência a antibióticos (Donlan, 2001; Donlan e Costerton, 2002) podendo posteriormente causar uma infecção sistêmica que depende de vários fatores, incluindo a resposta do sistema imunitário do hospedeiro (Donlan, 2001).

No que respeita à capacidade de formação de biofilmes, as bactérias pertencentes ao gênero *Arcobacter* foram isoladas a partir de biofilmes de carcaça de lagosta viva, das superfícies de instalações de retenção de águas e ainda num biofilme multi-espécie dentro de um reator de tratamento de águas residuais (Fernández *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2011). A espécie *A. butzleri*, em concreto, pode aderir a vários materiais de tubulação de águas (Assanta *et al.*, 2002) da mesma forma que pode residir e proliferar em ambientes de matadouros devido à sua capacidade de formar biofilme em condições de refrigeração (Kjeldgaard e Jørgensen, 2009).

1.2.2. Resistência a antibióticos

Está confirmado que os biofilmes têm uma grande importância para a saúde pública, pois a associação de microrganismos em forma de biofilme reduz drasticamente a exposição e a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (Donlan e Costerton, 2002), levando a que as células dentro do biofilme se tornem insensíveis a antissépticos e microbicidas (Huigens *et al.*, 2008), aumentando assim a sua resistência a tratamentos antimicrobianos. Esta resistência pode ser considerada intrínseca, como resultado natural do crescimento do biofilme, ou

adquirida, através da transferência de plasmídeos de resistência. No caso da resistência intrínseca, os dois fatores considerados mais relevantes são a matriz de SPE e a própria cinética de crescimento dos microrganismos quando se encontram em biofilme. A matriz de SPE retarda a difusão dos agentes antimicrobianos reagindo quimicamente com as moléculas ou limitando a taxa de transporte das mesmas para o interior do biofilme. No que respeita à cinética de crescimento, uma vez que as taxas de crescimento dos microrganismos são mais lentas, a taxa de entrada do antimicrobiano para a célula também é mais reduzida, afetando a cinética de inativação dos compostos (Donlan, 2001). No que diz respeito à resistência adquirida, algumas espécies bacterianas apresentam plasmídeos que codificam genes de resistência a vários agentes antimicrobianos, como por exemplo β -lactâmicos, eritromicina, aminoglicosídeos, entre outros, e algumas delas possuem ainda a capacidade de transferir estes plasmídeos para outras espécies bacterianas, normalmente por conjugação (Donlan, 2001; Donlan e Costerton, 2002; Donlan, 2002).

1.2.3. Controlo de biofilmes

Muitas infeções na corrente sanguínea e no trato urinário estão associadas a biofilmes, desconhecendo-se, até ao momento tratamentos efetivos contra este tipo de biofilmes (Donlan, 2001), uma vez que, como já foi referido, as bactérias de um biofilme são muito resistentes aos antibióticos convencionais, o que constitui um entrave à terapia antimicrobiana. Dada a amplitude dos efeitos prejudiciais causados pelo biofilme, foram desenvolvidas várias pequenas moléculas, como homoserina lactonas, furanonas bromadas e triterpenos ursano que têm como função inibir a formação destes, tendo por princípio que, as bactérias, sendo mantidas na sua forma planctónica podem ou não anexar-se a uma superfície e/ou que posteriormente podem ser mortas por uma baixa dose de agente microbicida. Contudo, a capacidade destas moléculas em dispersar o biofilme pré-formado ainda não foi descrita (Huigens *et al.*, 2008).

O aumento da resistência microbiana a agentes antimicrobianos comuns (antibióticos) torna necessária a procura de novos agentes com potencial atividade antimicrobiana. No caso de *A. butzleri*, espécie considerada como a mais predominante e mais patogénica do género devido à sua elevada resistência a antimicrobianos comuns (Collado e Figueras, 2011), não existe, ainda, nenhum procedimento eficaz para o tratamento de infeções provocadas por esta bactéria. De igual forma, ainda não existem estudos sobre o efeito de agentes antimicrobianos e/ou compostos naturais contra a formação de biofilmes ou sobre biofilmes formados por este microrganismo.

1.3. Resveratrol

As plantas são capazes de produzir um conjunto de diversos compostos de baixo peso molecular designados de metabolitos secundários. Estes metabolitos não são essenciais para o metabolismo básico das plantas, sendo normalmente sintetizados em resposta a condições de stress biótico ou abiótico. Até à data, foram já descritas duas classes de moléculas antimicrobianas secundárias: as fitoalexinas, moléculas sintetizadas *de novo* e as fitoanticipinas que são moléculas previamente sintetizadas (Cucciolla e Ragione, 2007).

O resveratrol (RV), 3,4',5-trihidroxiestilbeno ($C_{14}H_{12}O_3$), é o principal composto da família das fitoalexinas com diversas propriedades bioativas já descritas (Frkmont, 2000; Pervaiz S, 2003). Este composto tem um peso molecular de 228,25 g/mol e um ponto de fusão situado entre 253 e 255 °C (Amri *et al.*, 2012), estando normalmente presente em uvas, vinhos, sumo de uva, algumas bagas e legumes, amendoins e pistácios (Burns *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2011).

Algumas plantas que sintetizam resveratrol, como por exemplo a *Polygonum cuspidatum*, têm sido usadas durante séculos na China e no Japão na medicina tradicional no tratamento de infeções fúngicas e bacterianas (Trela e Waterhouse, 1996), inflamações de pele, bem como em doenças cardiovasculares e hepáticas (Mukherjee *et al.*, 2010). A sua presença foi documentada em videiras da espécie *Vitis vinífera* em 1976 e mais tarde, em 1992 no vinho (Pervaiz, 1975). Vários estudos demonstraram que, quando comparado com vinhos brancos e rosés, o vinho tinto é aquele que possuiu maior concentração deste composto, uma vez que durante o processo de fermentação a pele das uvas e as sementes, locais onde se encontram as maiores concentrações de resveratrol, estão em contacto com o mosto (Fernández-mar *et al.*, 2012). No início dos anos 90, este composto recebeu especial importância no contexto do “Paradoxo Francês”, fenómeno este que explica a baixa probabilidade da população de França sofrer de doenças cardíacas apesar da sua dieta com elevado teor de gorduras. Esta cardioproteção foi então atribuída ao consumo regular de vinho tinto rico em resveratrol, encontrando, assim, uma explicação para este paradoxo (Mukherjee *et al.*, 2010).

Esta molécula coexiste sob a forma de dois isómeros, *cis*- e *trans*-resveratrol (Figura 4) e, uma vez que apresenta dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla, a configuração *trans*- torna-se mais estável, além de biologicamente mais ativa (Amri *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2010)). A isomerização de *trans*- para *cis*-resveratrol pode ser causada por diversos fatores como temperatura, pH e exposição da molécula à luz UV ou visível (Pervaiz, 1975).

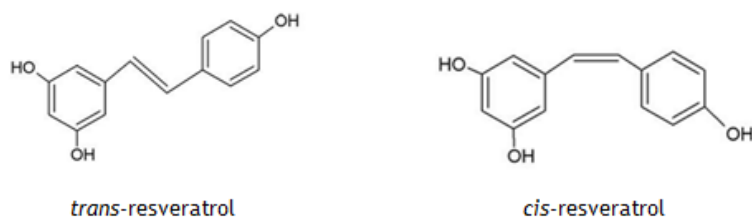


Figura 4. Estruturas dos isômeros de resveratrol *cis*- e *trans*-.

Como já foi referido, a produção de resveratrol ocorre como resposta a vários estímulos externos provocados por vários fatores, como infecções fúngicas, exposição à luz UV, algum tipo de dano causado na planta (Trela e Waterhouse, 1996), por compostos naturais que desencadeiem uma resposta de defesa na planta (Jeandet *et al.*, 2012) e até pela privação de água (Mukherjee *et al.*, 2010). A sua síntese acontece pela via fenilpropanóide (Shin *et al.*, 2011) onde, a partir da fenilalanina ou da tirosina, se origina ácido *p*-cumárico que, por ação da coenzima A liase, é convertido em *p*-coumaroil-Coenzima A que, após condensação com três moléculas de malonil-Coenzima A pela ação da estilbeno sintase (STS), conduz à formação de *trans*-resveratrol (Jeandet *et al.*, 2012). Esta enzima normalmente não está ativa ou é expressa nas plantas, sendo apenas produzida em resposta a algum stress, levando a um aumento da sua concentração na planta (Pervaiz, 1975). A figura 5 elucida as vias de síntese de *trans*-resveratrol.

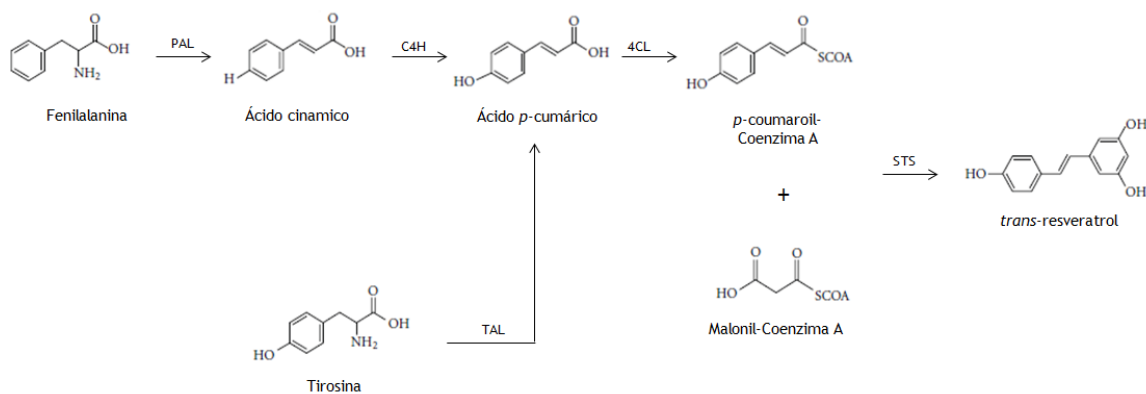


Figura 5. Síntese de *trans*-resveratrol em células vegetais.

1.3.1. Atividades biológicas do resveratrol

Os efeitos benéficos a que a molécula de resveratrol está associada têm levado a um crescente interesse por parte da comunidade científica na exploração deste composto como composto bioativo para utilizar nas indústrias alimentar, farmacêutica e nutracêutica (Paulo *et al.*, 2011). Desta forma, foram propostos inúmeros alvos assim como mecanismos de ação. De entre todas as atividades biológicas já descritas para este composto, destacam-se a

atividade antimicrobiana e a atividade antioxidante (Frkmont, 2000; Paulo *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011).

1.3.1.1. Atividade antimicrobiana

O resveratrol apresenta propriedades antifúngicas (Jeandet *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2007), antibacterianas (Akan, 2009; Ferreira *et al.*, 2014) e antivirais (Evers *et al.*, 2004). No que respeita à atividade antibacteriana, está documentada a ação deste composto contra várias bactérias que afetam o organismo humano como, por exemplo, *Chlamydia pneumoniae*, responsável por infeções agudas no trato respiratório (Jeandet *et al.*, 2012) e *Helicobacter pylori*, o principal agente causador de gastrites crónicas (Paulo *et al.*, 2010). O resveratrol também causa a inibição do crescimento das principais bactérias responsáveis pelas infeções da pele, ou seja, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Chan, 2002; Paulo *et al.*, 2010), tendo efeito sobre outras bactérias patogénicas humanas Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae* (Paulo *et al.*, 2010). A sua ação contra microrganismos de origem alimentar foi também já descrita por vários autores (Boban *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Paulo *et al.*, 2010), sendo que um dos microrganismos sobre o qual recai grande atenção nestes estudos é a *Escherichia coli*. A atividade antimicrobiana do resveratrol contra este microrganismo foi estudada por vários métodos, como a difusão em disco (Pettit *et al.*, 2009), microdiluição (Tegos *et al.*, 2002) e diluição em agar (Kato *et al.*, 2009). De facto, o estudo dos efeitos antimicrobianos do resveratrol contra outros microrganismos de origem alimentar, como *Salmonella typhimurium* ou *Bacillus cereus* (Paulo *et al.*, 2010; Shan *et al.*, 2008)), e recentemente, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* (Ferreira *et al.*, 2014) demonstram o potencial uso deste composto pela indústria alimentar.

O resveratrol tem também um forte efeito antifúngico em plantas, podendo levar ao desenvolvimento de resistências microbianas pelas mesmas (Jeandet *et al.*, 2012). Já foi relatada a sua eficaz ação contra os fungos *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger* (Filip, 2003). Da mesma forma, a sua eficácia contra fungos associados a humanos como *Candida albicans* foi também descrita, tornando este composto um forte candidato para o tratamento de infeções provocadas por este fungo (Jeandet *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2007).

O modo de ação que o resveratrol tem sobre os microrganismos ainda não está totalmente elucidado, no entanto sabe-se que esta molécula afeta o ciclo celular das bactérias, causando uma diminuição do conteúdo intracelular de DNA, resultando num possível bloqueio da divisão celular e, conseqüentemente, afetando o crescimento do microrganismo em questão (Ferreira *et al.*, 2014; Paulo *et al.*, 2010).

1.3.1.2. Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigénio (ERO) são produzidas continuamente pelo funcionamento normal do organismo na respiração e em algumas funções celulares. Estas incluem radicais livres de oxigénio que, em concentrações elevadas, podem causar danos no DNA resultando em mutações. Desta forma, os antioxidantes protegem o corpo humano destes radicais e dos seus efeitos (Gülçin, 2010). O resveratrol tem um forte poder antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica, um forte indicador de possíveis danos provocados pelas EROs (Pervaiz , 2003). Pensa-se que este poder antioxidante está sobretudo ligado ao facto de o resveratrol ser capaz de aumentar a síntese de óxido nítrico, que atua então como antioxidante (Mukherjee *et al.*, 2010). A sua capacidade em proteger as membranas das células e prevenir os efeitos do stress oxidativo, leva a uma proteção dos componentes celulares e subcelulares, conduzindo a uma redução na morte das células (Frkmont, 2000). De uma forma geral, os efeitos antioxidantes do resveratrol estão ligados a outras propriedades biológicas deste composto como a cardioproteção e a neuroprotecção (Pervaiz , 2003), sendo que pode ser igualmente aplicado na indústria alimentar como conservante, impedindo a oxidação de óleos e margarinas e suprimindo a deterioração de alimentos (Frkmont, 2000).

1.3.1.3. Outras propriedades

Estão confirmados vários benefícios do resveratrol, sendo que na sua maioria, as áreas de atuação estão interligadas umas com as outras (Sinha *et al.*, 2002). Este composto apresenta ação cardioprotetora, associada com o aumento da produção de óxido nítrico, que promove a vasodilatação (Baxter, 2008; Wu e Hsieh, 2011), além de que é responsável pela regulação positiva da atividade da catalase do miocárdio e pela redução da apoptose em cardiomiócitos (Mukherjee *et al.*, 2010). Este estilbeno foi considerado como agente antiproliferativo de células cancerígenas, exercendo uma atividade antitumoral quando combinado com agentes citostáticos ou citotóxicos em vários tipos de cancro (Jeandet *et al.*, 2012). A sua ação anti-inflamatória também foi documentada, sendo que, durante a resposta inflamatória, o resveratrol induziu efeitos inibidores em todas as fases fisiopatológicas, sugerindo que pode ser um composto eficaz na farmacoterapia (De La Lastra e Villegas, 2005). A capacidade que o resveratrol tem em atravessar a barreira hemato-encefálica (Baxter, 2008) confere-lhe capacidades neuroprotetoras, tendo um forte potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Marambaud *et al.*, 2005), doença de Huntington (Mukherjee *et al.*, 2010) ou a doença de Parkinson (Baxter, 2008).

1.3.2. Estabilidade do resveratrol

Como já foi anteriormente referido, a forma *trans*- do resveratrol é mais estável que a forma *cis*-, muito provavelmente porque se encontra numa conformação não-planar (Amri *et al.*, 2012). O resveratrol, em semelhança a outros polifenóis, apresenta uma extrema fotossensibilidade requerendo elevada proteção da luz no seu manuseamento. Por exemplo, o isómero *trans*-resveratrol, quando protegido da luz, mantém-se estável cerca de 28 dias em tampão com pH entre 1 e 7, enquanto o isómero *cis*-resveratrol apenas se mantém estável a pH neutro e completamente protegido da luz (Amri *et al.*, 2012; Trela e Waterhouse, 1996).

Um outro estudo demonstrou que o *trans*-resveratrol se mantém estável a -20 °C durante 5 dias e 3 dias quando colocado a 4 °C. Contudo, quando exposto à luz e a temperatura ambiente, apenas 70 % do resveratrol se mantém no espaço de 4 horas. Um outro estudo demonstrou que 80-90 % deste isómero em solução é convertido em *cis*-resveratrol quando exposto à luz solar durante 1 hora (Vian *et al.*, 2005). Por outro lado, quando o isómero *trans*- é irradiado com luz UV durante 120 minutos a 366 nm, 90,6 % é convertido em *cis*-resveratrol (Amri *et al.*, 2012; Trela e Waterhouse, 1996).

1.3.3. Formulações para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol

A sua capacidade antimicrobiana natural e o seu potencial terapêutico e funcional tornam o resveratrol num importante composto com potencial, tanto na prática clínica, como na preservação de diversos alimentos (Paulo *et al.*, 2010). Tendo isso em consideração, têm sido desenvolvidas várias formulações onde são usadas formas multiparticuladas entre o milímetro e o micrómetro, assim como portadores coloidais em escala manométrica. O principal propósito destes trabalhos passa pela estabilização e proteção do resveratrol, assim como pelo aumento da sua solubilidade aquosa (Amri *et al.*, 2012). Relativamente às formulações para aumentar a solubilidade deste composto em água, vários estudos referem que a complexação do resveratrol com ciclodextrinas (CDs) leva ao aumento da solubilidade deste composto em sistemas aquosos, melhorando a sua estabilidade e a sua bioatividade (Das *et al.*, 2008; López-Nicolás *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2009; Lucas-Abellán *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014). Da mesma forma, a solubilização do RV com várias soluções micelares de sais biliares também está documentada (Atanacković *et al.* 2009; Silva *et al.*, 2014). Para estabilizar e proteger o resveratrol, várias formulações têm sido descritas (Nam *et al.*, 2005; Shi, *et al.*, 2008). Por exemplo, Nam e colaboradores (2005) utilizaram microesferas porosas funcionalizadas com grupos ciano para a estabilização do resveratrol e verificaram que nas microesferas, a atividade antioxidante do resveratrol foi preservada em 93 % comparando com o resveratrol livre e a biodisponibilidade do composto foi mantida por 5 dias. Um outro estudo onde o resveratrol foi encapsulado em *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou a

ocorrência de uma reduzida fotodecomposição e o aumento da sua estabilidade (Shi *et al.* 2008).

1.4. Ciclodextrina

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos de glicose não-reduzida, compostas por seis (α -CD), sete (β -CD), oito (γ -CD) ou mais resíduos de D-glicopiranosose unidos por ligações α -1,4-glicosídicas e são produzidas como resultado da reação de transglicosilação intramolecular na degradação do amido pela enzima glucanotransferase da ciclodextrina (CGTase) (Del Valle, 2004). As unidades de glicopiranosose dispõem-se em cadeia, o que confere às moléculas de CD uma forma cônica com grupos hidroxilo secundários que se prolongam da extremidade mais larga e os grupos hidroxilo primários que se encontram na borda mais estreita (Loftsson e Brewster, 2010). Esta forma fornece à CD uma estrutura com uma cavidade central hidrofóbica e a uma superfície exterior hidrofílica (Figura 6) que lhe confere a possibilidade de formar complexos de inclusão em água com uma variedade de moléculas orgânicas, aumentando a solubilidade aquosa e a estabilidade química de diferentes compostos, garantindo a sua proteção à ação de agentes externos (Loftsson, 1996; López-Nicolás *et al.*, 2009).

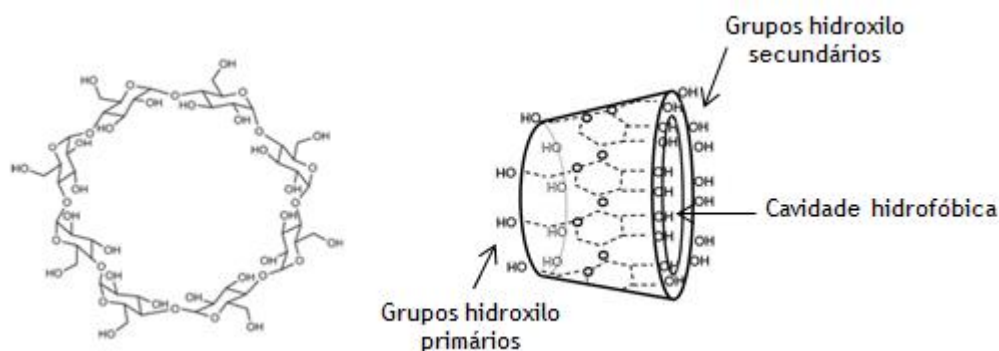


Figura 6. Estrutura da alfa-ciclodextrina. Adaptado de Pahari *et al.*, 2014.

1.4.1. Propriedades das ciclodextrinas

Existem três tipos de ciclodextrinas denominadas de primeira geração, parentais ou naturais: α -, β - e γ -CDs. As principais propriedades destas CDs naturais estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3. Propriedades das ciclodextrinas naturais (Loftsson e Brewster, 2010).

Propriedades	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
Número de unidades de glucopiranoses	6	7	8
Peso Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C (%w/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura da cavidade (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

Embora as CD naturais e os seus complexos sejam hidrofílicos, a sua solubilidade em água pode ser limitada, principalmente no caso da β -CD. Pensa-se que isto acontece devido à forte ligação das moléculas de CD no estado cristalino. Esta limitação na solubilidade pode ser ultrapassada pela substituição dos grupos hidroxilo (Loftsson e Brewster, 2010) transformando as CDs naturais em ciclodextrinas derivadas ou modificadas. As modificações normalmente resultam de aminações, esterificações ou eterificações dos grupos hidroxilo primários ou secundários. Dependendo do substituinte adicionado, da sua localização no interior da CD e do número de substituintes, a solubilidade da CD modificada normalmente difere da sua parental. Além disso, estas modificações alteram o volume na cavidade hidrofóbica, aumentam a estabilidade contra a luz e o oxigénio e ajudam a controlar a atividade química das moléculas hóspedes (Del Valle, 2004; Loftsson e Brewster, 2010). De uma forma geral, as CDs modificadas mais comuns são as hidroxiladas derivadas de β -CD e de γ -CD denominadas de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD) e as metiladas derivadas de β -CD, designada por metil- β -ciclodextrina (M β -CD) (Brewster, 2007; Szejtli, 1998).

As CDs têm a capacidade de produzir ligações covalentes ou não-covalentes entre si, podendo ser usadas como “blocos” de construção para a formação de complexos supramoleculares. A sua capacidade para acolher moléculas orgânicas na sua cavidade possibilita a construção de linhas supramoleculares. Assim, podem ser construídas arquiteturas moleculares como catenanos, rotaxanos, polirotaxanos e tubos que podem ser usados, por exemplo, na separação de misturas complexas de moléculas e enantiómeros (Del Valle, 2004).

1.4.2. Toxicidade das ciclodextrinas

Os testes de toxicidade já efectuados demonstraram que as CDs administradas de forma oral não apresentam praticamente nenhuma toxicidade, uma vez que a sua absorção no trato gastrointestinal é praticamente nula (Loftsson e Brewster, 2010). Outros estudos realizados com γ -CD, 2-hidroxipropil- β -CD, sulfobutiléter- β -CD, β -CD sulfatada e maltosil- β -CD demonstraram que a administração parental destas moléculas é segura, facto que já não se verifica para α - β -CD e metil- β -CD (Del Valle, 2004). Dos três tipos de CDs naturais, aquelas que menos efeitos adversos apresentam nos ensaios de toxicidade são as γ -CD (Szejtli, 1998).

1.4.3. Formação de complexos de inclusão

A cavidade central da ciclodextrina tem características apolares, tendo a capacidade de promover um microambiente lipofílico às moléculas hóspedes (Loftsson and Brewster, 2010). Quando se encontra em soluções aquosas, este espaço é ocupado por moléculas de água criando-se interações energeticamente desfavoráveis, uma vez que estas moléculas são polares o que faz com que a substituição das moléculas de água por outras moléculas energeticamente mais apropriadas, ou seja, com polaridade inferior, seja facilitada (Figura 7) (Szejtli, 1998). A união resultante entre a CD e a molécula hóspede não é fixa ou permanente, criando-se um equilíbrio dinâmico sustentado por uma constante cujo valor depende do tamanho relativo da molécula complexada e da força das interações estabelecidas entre a CD e a molécula contida no seu interior (Del Valle, 2004). Para que se forme o complexo de inclusão é necessário que se produza uma interação hidrofóbica entre a molécula hóspede e a CD, sendo esta a força motriz para o processo a substituição das moléculas de água no interior da cavidade pelas moléculas do composto alvo (Del Valle, 2004; Rasheed *et al.*, 2008; Szejtli, 1998). Neste processo não se criam ou destroem ligações covalentes (Rasheed *et al.*, 2008), ou seja, as interações criadas são não-covalentes (Silva *et al.*, 2014) como as interações do tipo Van der Waals, formação de pontes de hidrogénio entre a molécula hóspede e os grupos hidroxilo das CDs ou interações de transferência de carga (Rasheed *et al.*, 2008).



Figura 7. Formação de complexos de inclusão em solução aquosa.

As propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes na sua forma livre são diferentes quando estas são complexadas, assim como as propriedades físico-químicas das CDs se alteram quando ocorre a complexação. Teoricamente, qualquer metodologia que possa ser usada para observar estas mudanças nas propriedades físico-químicas (alterações de solubilidade, fluorescência, estabilidade química, entre outras), podem ser usadas para determinar a estequiometria dos complexos formados e os valores numéricos da constante de estabilidade (Hirose, 2001; Loftsson e Brewster, 2010; López-Nicolás *et al.*, 2009).

Higuchi e Connors classificaram os complexos de inclusão com base no seu efeito sobre a solubilidade do substrato, criando um diagrama de solubilidade de fases (Figura 8) que está dividido em dois tipos de curvas: A e B. As curvas do tipo A representam a formação de complexos de inclusão solúveis e estão subdivididas em A_L (a solubilidade das moléculas hóspedes aumenta com o aumento da concentração de CD de forma linear), A_P (desvio positivo na isotérmica) e A_N (desvio negativo na isotérmica). As curvas do tipo B representam a formação de complexos de inclusão com baixa solubilidade e estão subdivididas em B_S (complexos de inclusão de solubilidade limitada) e B_I (indica que os complexos de inclusão formados são insolúveis). Em geral, as CDs modificadas formam perfis de solubilidade do tipo A, enquanto que as CDs naturais menos solúveis formam frequentemente os perfis de solubilidade do tipo B (Del Valle, 2004; Loftsson e Brewster, 2010).

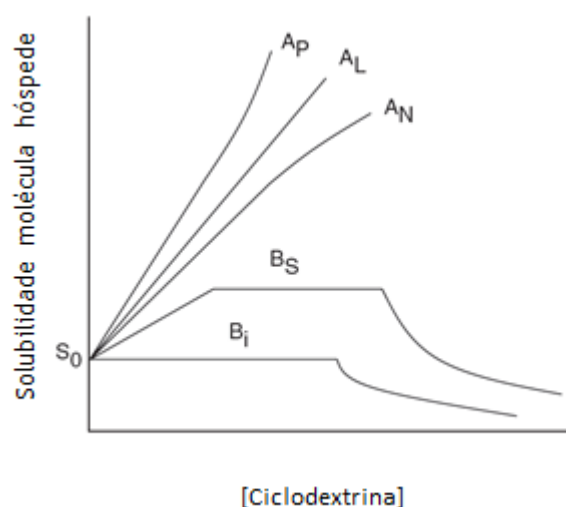
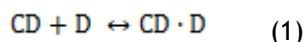


Figura 8. Perfis de solubilidade de fases e classificação dos complexos de acordo com Higuchi e Connors. S_0 representa a solubilidade intrínseca da molécula hóspede no meio de complexação aquoso, quando nenhuma CD está presente. Fonte: Rasheed e Kumar, 2008.

A taxa de formação e dissociação dos complexos está muito próxima dos limites de difusão controlada, o que faz com que os complexos estejam continuamente a ser formados e dissociados (Loftsson e Brewster, 2010), estabelecendo-se um equilíbrio entre as espécies dissociadas e associadas expresso pela constante de estabilidade (constante de equilíbrio - K).

A associação da CD com a molécula hóspede (D) e a dissociação dos complexos formados (equação 1) rege-se por um equilíbrio termodinâmico (equação 2) (Szejtli, 1998):



$$K = \frac{[CD \cdot D]}{[CD][D]} \quad (2)$$

Uma vez que a altura da cavidade hidrofóbica é igual para os três tipos de CDs naturais, o número de unidades de glucose de cada uma determina o diâmetro interior e o volume da cavidade. Com base nestas dimensões, α -CD pode complexar moléculas de baixo peso molecular ou compostos com cadeias laterais alifáticas; as β -CDs podem incluir moléculas aromáticas e heterociclos, enquanto as γ -CDs podem complexar moléculas maiores como macrociclos e esteróides (Del Valle, 2004).

1.4.4. Aplicação das ciclodextrinas

Na formação dos complexos de inclusão, cada molécula hóspede é rodeada de forma individual pela CD, sendo encapsulada de um ponto de vista microscópico, levando a mudanças vantajosas nas suas propriedades químicas e físicas: estabilização de substâncias sensíveis à luz e/ou ao oxigénio; melhoria da solubilidade; modificação da reatividade química, entre outras, como referido anteriormente (Del Valle, 2004; Singh *et al.*, 2002).

A capacidade de complexar vários tipos de compostos levou ao aumento da utilização de CDs em várias áreas como a área alimentar, ambiental e farmacêutica (Del Valle, 2004; López-Nicolás *et al.*, 2009). Na indústria alimentar, o desenvolvimento de embalagens ativas e inteligentes têm vindo a aumentar de forma a substituir as formas de embalagem tradicionais de alimentos e bebidas. A aplicação de complexos de CDs com determinadas fragâncias, corantes, inseticidas, filtros UV, entre outros, em polímeros termoplásticos melhora o material da embalagem e, para além disso, faz com que as substâncias complexadas sejam libertadas lentamente a partir da matriz polimérica (López-Nicolás *et al.*, 2009). As vantagens da aplicação de CDs em embalagens, passa ainda pela libertação diminuída de impurezas e subprodutos voláteis indesejados que são formados durante o fabrico da embalagem, assim como o aumento nas melhorias das funções de barreira, impedindo tanto a entrada de poluentes voláteis no interior da embalagem, como a saída de aromas para o exterior (Wood, 2001).

1.5. Objetivo

A verdadeira incidência de espécies do género *Arcobacter* tem vindo a ser revelada com a implementação de métodos de deteção e isolamento, demonstrando que a espécie *A. butzleri* é das mais importantes do género, sendo considerada como um enteropatogénico zoonótico emergente. Esta bactéria é predominantemente encontrada em produtos de origem animal, apresenta resistência a vários antibióticos, tem capacidade de sobreviver a tratamentos químicos e físicos, estando também descrita a sua capacidade de formar biofilmes. Desta forma, existe a necessidade de desenvolver novas formas para o controlo e/ou erradicação deste microrganismo utilizando compostos alternativos, preferencialmente de origem natural. Assim, este trabalho teve como objetivos específicos:

- Formar complexos de inclusão entre a ciclodextrina modificada hidroxipropil- γ -ciclodextrina e resveratrol;
- Determinar a suscetibilidade antimicrobiana de cinco estirpes de *Arcobacter butzleri* aos complexos formados e ao resveratrol na forma livre, pelo método de microdiluição;
- Avaliar o mecanismo de ação dos complexos de inclusão formados nas estirpes de teste, com recurso à realização de ensaios de curvas de morte e à citometria de fluxo;
- Avaliar a capacidade dos complexos de inclusão e do resveratrol livre em inibir, tanto a formação de biofilmes, bem como a dispersão dos biofilmes pré-estabelecidos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Para a realização deste trabalho, o *trans*-resveratrol foi adquirido à TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Bélgica). Considerando que o resveratrol é um composto sensível à luz, tanto o reagente como as todas as soluções preparadas a partir do mesmo, foram armazenadas e manuseadas no escuro ou protegidas com papel de alumínio. A HP- γ -RV foi obtida da empresa Sigma-Aldrich.

2.2. Formação dos complexos de inclusão

Para a formação dos complexos de inclusão teve-se em conta o procedimento descrito por Silva e colaboradores (2014), com algumas alterações. A solução de ciclodextrina foi preparada com uma concentração de 0.3 M com água ultra-pura obtida através de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Após dissolução, 1 mL desta solução de CD foi adicionada a 22 mg de RV. A suspensão resultante foi homogeneizada num vórtice e sonicada durante 1 hora, num banho de água e gelo, a fim de evitar sobreaquecimento das amostras. Posteriormente, colocou-se a suspensão de CD e RV num agitador orbital a 25 °C, 250 rpm durante 24 horas. Durante todo o procedimento, a suspensão foi protegida da luz. Quando decorrido o tempo de incubação, a solução foi filtrada com filtros de 0,22 μ m (Millipore, EUA) para posterior quantificação por um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de díodos (“*High-performance liquid chromatography with diode array detection*” - HPLC-DAD).

2.3. Quantificação da concentração de resveratrol nos complexos de inclusão formados

Para determinar a concentração de RV complexado foi usado um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta pressão (“*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*” - UPLC), sistema da série Agilent 1290 (Agilent Technologies, EUA) com uma coluna analítica de HPLC de fase reversa Zorbax 300 SB-C₁₈ com 4,6 mm de diâmetro, 150 mm de comprimento e 5 μ m de tamanho de poro. A fase móvel utilizada para a quantificação era composta por uma mistura de ácido fórmico a 0,1 % (v/v) e acetonitrilo, numa proporção de 52:48 (v/v), que foi previamente filtrada a vácuo com filtros de 0,2 μ m e sonicada durante 30 min para eliminar

possíveis bolhas de ar. Quanto às condições cromatográficas, foi utilizado um fluxo isocrático de 1,0 mL/min, a coluna foi mantida a uma temperatura de 35 °C e as amostras e injetor a 4 °C. O comprimento de onda do detetor DAD foi definido a 306 nm para a detecção de *trans*-resveratrol. A concentração de RV foi determinada pelo método validado por Silva e colaboradores (2014), tendo por base a reta de calibração traçada com várias concentrações de RV (1-100 µg/mL) e tendo em conta o fator de ponderação $1/x^2$.

2.4. Microrganismos

Neste trabalho utilizou-se uma estirpe de referência, *A. butzleri* LMG 10828 isolada de fezes diarreicas humanas, obtida da coleção BCCM/LMG *Bacteria collection* (Universidade de Ghent, Bélgica); duas estirpes *A. butzleri* de origem animal, AB 17/11 e AB 36/11, isoladas de aves domésticas por Ferreira *et al.* (2013) e duas estirpes clínicas, INSA 593 e INSA 776 gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Lisboa, Portugal).

2.5. Armazenamento e manutenção das estirpes

As estirpes bacterianas foram armazenadas a -80 °C, em meio Brain Heart Infusion (BHI, Liofilchem, Italy) suplementado com 20 % (v/v) de glicerol. Quando passadas para placas de agar (Blood Agar, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementadas com 5 % (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado (Thermo Scientific), as estirpes foram armazenadas a 4 °C, tendo sido repicadas a cada 7 dias para novas placas de ágar sangue, num máximo de três repicagens.

Anteriormente a cada ensaio, cada estirpe foi inoculada em placas de ágar sangue, de forma a assegurar o crescimento ótimo e pureza das culturas e incubadas durante 18-24 horas, a 37 °C e em condições de microaerofilia (6 % O₂, ± 7.1 % CO₂, 3.6 % H₂ e 83 % N₂).

2.6. Caracterização das estirpes clínicas

Antes de se realizarem os ensaios de suscetibilidade das cinco estirpes em estudo, procedeu-se à identificação e caracterização dos isolados clínicos, INSA 593 e INSA 776, através da avaliação da presença de genes putativos de virulência e da suscetibilidade a antibióticos.

2.6.1. Identificação dos isolados bacterianos clínicos

Para a confirmação da identificação a nível de espécie dos isolados clínicos foi utilizada a técnica de PCR, usando a estirpe de referência como controlo positivo. Para isso, efetuou-se a extração do DNA genómico (gDNA) das estirpes a partir de culturas puras, recorrendo ao kit *Wizard*® Genomic DNA Purification (Promega) conforme as instruções do fornecedor. Após a extração do gDNA, as reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL. Para uma reação de PCR adicionaram-se 12,5 µL de “Supreme NZYtaq 2xGreen Master Mix” (NZYtech, Lisboa, Portugal) que contém a enzima Taq DNA polimerase, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) e tampão de reação; 2 mmol/L de MgCl₂, 1 µmol/L dos “primers” ARCO e BUTZ (Tabela 4), 1,5 µL de água para PCR e 5 µL de gDNA, utilizando-se um termociclador TProfessional Basic (Biometra, Alemanha). Nas reações de amplificação, a desnaturação inicial das cadeias deu-se a 95 °C durante 5 min, após a qual se seguiram 35 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), hibridação dos “primers” (61 °C, 30 s) e síntese das cadeias (72 °C, 30 s). No final destes ciclos, a síntese final das cadeias decorreu durante 7 min a 72 °C. Segundo Houf e colaboradores (2000), o tamanho do fragmento amplificado teria um peso molecular de 401 pares de bases (pb).

Tabela 4. Sequências dos “primers” utilizados na identificação por PCR ao nível da espécie.

Primers	Sequência dos primers	Referência
ARCO	5'-CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'	Houf, 2000
BUTZ	5'-CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA-3'	

Os produtos amplificados por PCR foram então visualizados e separados por eletroforese em gel de agarose (1 %), utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). Os géis de agarose foram posteriormente corados com GreenSafe e visualizados por um sistema de UV.

2.6.2. Ocorrência de possíveis fatores de virulência nos isolados clínicos

A ocorrência de possíveis fatores de virulência (tabela 5) foi verificada apenas para as estirpes INSA 593 e INSA 776, uma vez que para os outros dois isolados em estudo, estes fatores já haviam sido analisados. Para a realização do estudo, procedeu-se primeiramente à extração do gDNA usando o kit *Wizard*® Genomic DNA Purification. O procedimento para a preparação das reações de amplificação foi seguido de forma semelhante à referida no ponto 2.6.1. e, neste caso, foi adicionado 1 µmol/L de primers (tabela 5), correspondentes a cada gene alvo. Quanto às condições de reação, a desnaturação inicial das cadeias de DNA deu-se a 95 °C durante 5 min, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), hibridação dos

“primers” (55 °C ou 56 °C, 30 s) e síntese das cadeias (72 °C, 30 s). No final destes ciclos, a síntese final das cadeias decorreu durante 10 min a 72 °C. Finda a amplificação dos produtos de PCR, estes foram analisados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por um sistema de UV, conforme descrito no ponto anterior.

Tabela 5. Sequência de “primers” usados para detetar a presença de fatores de virulência nos isolados clínicos (Doudah *et al.*, 2012).

Genes Alvo	Primers	Sequência de primers	Tamanho	T _{an}
<i>cadF</i>	<i>cadF</i> -F	5'-TTACTCCTACACCGTAGT-3'	283 pb	55 °C
	<i>cadF</i> -R	5'-AAACTATGCTAACGCTGGTT-3'		
<i>ciaB</i>	<i>ciaB</i> -F	5'-TGGGCAGATGTGGATAGAGCTTGGA-3'	284 pb	56 °C
	<i>ciaB</i> -R	5'-TAGTGCTGGTCGTCACATAAAG-3'		
<i>cj1349</i>	<i>cj1349</i> -F	5'-CCAGAAATCACTGGCTTTTGGAG-3'	629 pb	56 °C
	<i>cj1349</i> -R	5'-GGGCATAAGTTAGATGAGGTTCC-3'		
<i>hecA</i>	<i>hecA</i> -F	5'-GTGGAAGTACAACGATAGCAGGCTC-3'	537 pb	56 °C
	<i>hecA</i> -R	5'-GTCTGTTTTAGTTGCTCTGCACTC-3'		
<i>irgA</i>	<i>irgA</i> -F	5'-TGCAGAGGATACTTGGAGCGTAACT-3'	437 pb	56 °C
	<i>irgA</i> -R	5'-GTATAACCCCATTTGATGAGGAGCA-3'		
<i>mviN</i>	<i>mviN</i> -F	5'-TGCACTTGTTGCAAAACGGTG-3'	294 pb	56 °C
	<i>mviN</i> -R	5'-TGCTGATGGAGCTTTTACGCAAGC-3'		
<i>tlyA</i>	<i>tlyA</i> -F	5'-CAAAGTCGAAACAAAGCGACTG-3'	230 pb	55 °C
	<i>tlyA</i> -R	5'-TCCACCAGTGCTACTTCCTATA-3'		
<i>hecB</i>	<i>hecB</i> -F	5'-CTAAACTCTACAAATCGTGC-3'	528 pb	55 °C
	<i>hecB</i> -R	5'-CTTTTGAGTGTTGACCTC-3'		
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -F	5'-TGCACTTGTTGCAAAACGGTG-3'	293 pb	55 °C
	<i>pldA</i> -R	5'-TGCTGATGGAGCTTTTACGCAAGC-3'		

2.6.3. Suscetibilidade a antibióticos

Para completar a caracterização das duas estirpes clínicas, realizou-se o estudo da suscetibilidade antimicrobiana a 9 antibióticos: Ampicilina (AMP), Vancomicina (VAN), Ciprofloxacina (CIP), Trimetoprim (TMP), Piperacilina (PIP), Cefoperazona (CFP), Cloranfenicol (CHL), Gentamicina (GEN) e Amoxicilina (AMX), uma vez que estes foram os antibióticos utilizados por Ferreira e colaboradores (2013) na caracterização das estirpes de origem animal (AB 17/11 e AB 36/11) em estudo. Os intervalos de concentrações de antibiótico testadas foram: 256-0,125 µg/mL para AMP; 512-0,25 µg/mL para VAN; 8-0,004 µg/mL para CIP; 512-0,25 µg/mL para TMP; 512-0,25 µg/mL para PIP; 512-0,25µg/mL CFP; 128-0,06 µg/mL para CHL; 64-0,03125 µg/mL para GEN; 256-0,125 µg/mL para AMX.

De forma a ser avaliada a suscetibilidade das duas estirpes *A. butzleri* aos antibióticos mencionados, utilizou-se o método de microdiluição em meio líquido, segundo a norma M7-A6 das Metodologias dos Testes de sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbio (NCCLS, 2003). As bactérias foram repicadas em placas de ágar sangue e incubadas durante 18-24 horas a 37 °C e em condições de microaerofilia. Após a preparação das soluções com as concentrações iniciais de cada antibiótico, realizaram-se diluições sucessivas dos mesmos (1:2) nos intervalos de concentrações indicados. Os testes foram realizados com meio Müller Hinton Broth (MHB, Liofilchem, Italy) ajustado com catiões, em placas de 96 poços, com volume final de 100 µL por poço. Para preparação da suspensão bacteriana, após o crescimento em meio sólido, as bactérias foram suspensas diretamente numa solução de NaCl a 0,85 % (m/v), sendo a turbidez desta suspensão posteriormente ajustada a 0,5 unidades de McFarland. De forma a obter uma concentração final de cerca de 5×10^5 unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) em cada poço, a suspensão preparada sofreu uma diluição de 1:100 em meio MHB. Os controlos do método foram realizados de forma semelhante ao já descrito, sendo que, para o controlo positivo de crescimento não foram adicionados os antibióticos em estudo e no controlo negativo de crescimento não foi adicionado inóculo nos respetivos poços. As placas foram incubadas durante 48 horas, a 37 °C, em condições de microaerofilia e os resultados foram avaliados visivelmente, definindo a concentração mínima inibitória (CMI) do antibiótico, como a menor concentração de cada composto sem qualquer crescimento visível a olho nu. Foram realizados três ensaios independentes.

2.7. Suscetibilidade aos complexos de inclusão formados e ao resveratrol livre

Para a determinação da CMI dos complexos de inclusão e do resveratrol, procedeu-se de forma semelhante à descrita no ponto 2.6.4. para os antibióticos. Neste caso, o intervalo de concentrações para o complexo foi de 2048 a 16 µg/mL, sendo que estas concentrações correspondem ao RV dentro do complexo de inclusão, e para o RV livre de 400 a 3,125 µg/mL. Para os ensaios com RV, o meio foi suplementado com 1,5 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) para aumentar a solubilidade do composto. Foram realizados três ensaios de forma independente.

2.8. Curvas de morte em células planctónicas

Para a realização das curvas de morte, escolheram-se dois dos isolados, um clínico (INSA 776) e um não clínico (AB 36/11). Ambos foram selecionados para o ensaio, pois o seu crescimento

e a capacidade para formar biofilmes são maiores, comparativamente aos outros dois isolados.

A partir de culturas bacterianas com 18-24 horas de crescimento em placas de ágar sangue, a 37 °C e em condições de microaerofilia, preparou-se uma suspensão bacteriana que foi adicionada a 20 mL de MHB, com $DO_{620\text{ nm}}$ inicial de 0,05 sendo posteriormente incubada durante 6 horas a 37 °C, 100 rpm e em condições de microaerofilia. Com este tempo de incubação as células encontravam-se em fase exponencial de crescimento, uma vez que anteriormente foram realizadas curvas de crescimento bacteriano com esse mesmo objetivo. Em tubos de vidro prepararam-se as várias concentrações de complexo de inclusão e de RV (1x, 2x e 4x a CMI) aos quais foi posteriormente adicionado 150 µL de suspensão celular com uma $DO_{620\text{ nm}}$ de 0,01 em meio MHB, resultando numa concentração inicial de células de cerca de 1×10^6 UFC/mL, sendo o volume final de cada tubo 1,5 mL.

Nos ensaios com complexo de inclusão, a influência da HP-γ-CD no crescimento celular foi também avaliada. Para tal, utilizou-se uma concentração de CD correspondente a 4xMIC de complexo para cada estirpe, a concentração mais elevada de complexo de inclusão testada, em meio MHB. Nos ensaios com RV procedeu-se da mesma forma, sendo que neste caso foi avaliada a influência do DMSO. Tubos que continham apenas meio de cultura e suspensão celular, foram utilizados como controlo positivo de crescimento. Os tubos foram incubados a 37 °C em aerofilia, sem agitação e na ausência de luz. O efeito dos complexos de inclusão e do RV no progresso do crescimento bacteriano foi avaliado pela recolha de 20 µL de amostra após 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas de incubação. Este volume retirado foi adicionado em microplacas de 96 poços onde foram realizadas diluições sucessivas em meio MHB. Depois de concluídas as diluições, transferiu-se 10 µL de cada poço para placas de ágar sangue, as quais foram incubadas durante 48 horas, a 37 °C e em condições de microaerofilia e as UFC foram posteriormente contadas (Chen, 2003). Os ensaios foram realizados, pelo menos, em triplicado e de forma independente.

2.9. Ensaios de Citometria de Fluxo

A fim de avaliar o mecanismo de ação dos complexos de inclusão, utilizaram-se as mesmas estirpes selecionadas anteriormente para as curvas de morte. Estes ensaios só foram avaliados com os complexos de inclusão, uma vez que já está documentado o estudo com RV livre (Ferreira *et al.*, 2014), e o principal objetivo deste estudo é avaliar o efeito dos complexos de inclusão entre CD e RV sobre as estirpes de *A. butzleri*.

Nos ensaios de citometria de fluxo, foi avaliado o efeito dos complexos de inclusão na possível despolarização da membrana e na atividade metabólica das células bacterianas, as

quais foram marcadas com os fluorocromos SYTO[®] 40 para marcação de células totais e bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (BOX) (Invitrogen, EUA) para avaliação da despolarização de membrana e/ou 5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio (CTC) (Polysciences, Inc.) para a avaliação da atividade metabólica das células. Para tal, as células foram colocadas a crescer em meio MHB até atingirem o início da fase exponencial de crescimento, como descrito para as curvas de morte. Posteriormente, a DO_{620 nm} foi acertada a 0,01 (aproximadamente 1x10⁷ UFC/mL) com meio MHB e foram adicionados 100 µL de suspensão celular aos tubos previamente preparados com as concentrações a testar de complexo de inclusão (0x, 1x, 2x e 4x a CMI) e um tubo com uma concentração de CD correspondente a 4x a CMI, obtendo-se um volume final de 1 mL. Estes tubos foram incubados no escuro, durante 6 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 10 min à temperatura ambiente e 850 µL do sobrenadante foram descartados. Para os ensaios com BOX (Silva *et al.*, 2011), procedeu-se à ressuspensão das células depositadas com tampão fosfato salino (“*phosphate buffered saline*” - PBS) suplementado com 4 mM EDTA e adição de um volume de BOX de modo a que a concentração final fosse 2,5 µg/mL, seguindo-se a incubação dos tubos no escuro durante 15 min à temperatura ambiente. No caso do CTC (Tholozan *et al.*, 1999), adicionou-se meio BHI, água destilada filtrada (filtros 0,22 µm) e uma concentração final de 5 mM de CTC para a ressuspensão das células depositadas. Os tubos foram incubados no escuro, durante 2 horas a 37 °C, sem agitação e em aerofilia. Para ambos os ensaios, após o tempo de incubação as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS + 4mM EDTA com 10 µM de SYTO[®] 40. Os tubos foram incubados no escuro durante 15 min à temperatura ambiente e voltou a realizar-se uma lavagem das células para eliminar o excesso de fluorocromo. Neste caso, após o sobrenadante ser descartado, foi adicionado PBS para a ressuspensão das células, antes da análise no citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter, Inc., Califórnia, EUA), onde os resultados foram adquiridos pelo Software Summit (Beckman Coulter, Inc., Califórnia, EUA). A aquisição dos dados foi baseada na fluorescência e na dispersão de luz resultantes da iluminação dos lasers em estado sólido com 50 mW e 25 mW, a 405 e 488 nm, respetivamente. Os sinais de fluorescência foram recolhidos pelos filtros de banda FL1 (530/40 nm, para BOX), FL4 (680/30 nm, para CTC) e FL6 (450/50 nm, para SYTO[®] 40), sendo adquiridos 5000 eventos para cada amostra. Para a recolha destes dados foram realizados dois ensaios independentes. Para a definição das regiões de células marcadas e células não marcadas quer com BOX quer com CTC bem como para verificação dos protocolos de citometria de fluxo foram previamente realizados ensaios controlo. Em citometria de fluxo, os controlos positivos devem corresponder ao máximo de marcação com o fluorocromo enquanto o controlo negativo deverá corresponder ao mínimo de marcação. No caso do fluorocromo BOX, para o controlo positivo foram utilizadas células sujeitas a um tratamento por calor a 70 °C durante 30 min e para o controlo negativo foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento. No caso do CTC, para o controlo negativo usaram-se células em

fase exponencial de crescimento e como controlo negativo células sujeitas a um tratamento por calor a 70 °C durante 30 min.

2.10. Efeito dos complexos de inclusão e de resveratrol na formação de biofilmes

As potenciais propriedades de inibir a adesão de *A. butzleri* dos complexos de inclusão e do RV livre foram avaliadas. Para isso, as estirpes bacterianas foram repicadas em meio de ágar sangue e incubadas cerca de 24 horas a 37 °C em condições de microaerofilia. Após o crescimento em placa, procedeu-se à cultura das células durante 16-18 horas, em 10 mL de meio MHB, sendo que a $DO_{620\text{ nm}}$ foi ajustada a 0,05 e os tubos incubados a 37 °C em condições de microaerofilia. A partir desta cultura, foram preparadas suspensões bacterianas com $DO_{620\text{ nm}}$ igual a 0,1 (Candon *et al.*, 2007; Fields e Thompson, 2008; Moe *et al.*, 2010). Em placas de 96 poços foram adicionadas as concentrações dos compostos a ser testados correspondentes a 4x, 2x, 1x, 0.5x, 0.25x e 0.125x a CMI do complexo de inclusão e 2x, 1x, 0,5x, 0,25x e 0.125x a CMI para o RV livre, juntando-se posteriormente 50 µL das suspensões bacterianas, obtendo-se um volume final de 100 µL por poço. Os poços sem compostos foram usados como controlo positivo de crescimento e os poços só com meio MHB usados como controlo negativo de crescimento. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas em microaerofilia. No final do tempo de incubação, procedeu-se à quantificação da biomassa de biofilme formado. Para o efeito, o meio de cultura foi descartado e os poços deixados secar completamente, sendo posteriormente lavados duas vezes com água para remover as células não aderidas. A cada poço foram adicionados 100 µL de violeta de cristal (Amresco, Solon Ind.) a 0,1 % (m/v) dissolvido em água destilada, seguindo-se uma incubação de 30 min à temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, o corante foi removido e os poços lavados 3 vezes com água. O corante contido no biofilme foi solubilizado pela adição de 100 µL de etanol a 95 % (v/v) e a absorvância foi lida diretamente na placa a 570 nm (Huigens *et al.*, 2008).

2.11. Efeito dos complexos de inclusão e de resveratrol na dispersão de biofilmes já estabelecidos

O efeito dos complexos de inclusão e do RV livre sobre os biofilmes previamente formados foi avaliado utilizando as mesmas concentrações dos compostos que foram usadas nos ensaios de inibição de formação de biofilmes. Para isso, realizou-se o crescimento bacteriano durante 16-18 horas em meio líquido como descrito no ponto anterior. A cada poço de uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de uma suspensão celular ajustada a uma $DO_{620\text{ nm}}$ de 0,1

(Candon *et al.*, 2007; Fields e Thompson, 2008; Moe *et al.*, 2010), sendo que, para o controle negativo de crescimento, foram apenas adicionados 100 µL de meio. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas e em condições de microaerofilia. No final deste tempo de incubação o meio foi removido e foram adicionados 100 µL de cada composto com as respectivas concentrações e 100 µL de meio nos controles negativos e nos controles positivos de crescimento, voltando a incubar-se durante 48 horas nas mesmas condições. Após a incubação, realizou-se a quantificação pelo método de violeta de cristal como descrito anteriormente para a formação de biofilmes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Complexos de Inclusão

Até à data, inúmeros estudos têm vindo a ser publicados demonstrando os efeitos benéficos do RV, sendo a atividade antimicrobiana uma das propriedades mais importantes relacionadas com este composto (Chan, 2002; Ferreira *et al.*, 2014; Jeandet *et al.*, 2012; Paulo *et al.*, 2011). Não obstante, a fotoestabilidade e a solubilidade em água do resveratrol são relativamente reduzidas, o que levou à necessidade de desenvolver formulações para tentar contornar estas limitações, como por exemplo a complexação do RV com CDs (Amri *et al.*, 2012).

Neste estudo, procedeu-se à formação de complexos de inclusão entre RV e HP- γ -CD, segundo o método validado por Silva e colaboradores (2014). A incorporação do RV com a CDs modificada decorreu durante 24 horas, num agitador orbital, onde a suspensão de RV e CD foi protegida pela luz, de forma a evitar a possível perda das propriedades do composto. Para a quantificação da concentração de RV, utilizou-se uma reta de calibração obtida com vários padrões de RV, com concentrações entre 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tendo como fator de ponderação $1/x^2$. A tabela 6 apresenta a concentração máxima de resveratrol em meio aquoso obtida após a formação dos complexos de inclusão com uma estequiometria de 1:1, ou seja, uma molécula de *trans*-resveratrol é complexada com uma molécula de HP- γ -CD.

Tabela 6. Concentração dissolvida de resveratrol e estequiometria dos complexos de inclusão. O resultado é apresentado como média \pm desvio padrão de todos os ensaios.

[HP- γ -CD]	S_0 (mg/mL)	[RV] dissolvida (mg/mL)	Estequiometria
0,3 M	0,031 \pm 0,002	23,6 \pm 1,11	1:1

Tendo em conta o valor da solubilidade do resveratrol em água (S_0), que é considerado praticamente insolúvel segundo a definição da “European Pharmacopeia” (Amri *et al.*, 2012), com a encapsulação com esta ciclodextrina modificada, a sua solubilidade tende a aumentar cerca de 760 vezes. Das *et al.*, (2008) obteve um aumento da solubilidade semelhante (cerca de 729 vezes) quando o resveratrol foi complexado com HP- β -CD, e um aumento da solubilidade de cerca de 907 vezes ao encapsular o resveratrol com β -CD aleatoriamente metilada (RM- β -CD). Assim sendo, pode concluir-se que o aumento de solubilidade da molécula poderá ser mais dependente dos grupos funcionais na superfície da CD que do diâmetro interno da sua cavidade, uma vez que os valores obtidos para as duas CDs

hidroxipropiladas (HP- β -CD e HP- γ -CD) são semelhantes apesar de a γ -CD apresentar um diâmetro de cavidade interna superior (Das *et al.*, 2008; Loftsson e Brewster, 2010).

A concentração máxima obtida na formação dos complexos de inclusão foi de 23,6 mg/mL, concentração esta que corresponde à média de todas as concentrações máximas de resveratrol, após a complexação com HP- γ -CD, nos complexos que foram utilizados na realização de todos os ensaios descritos neste trabalho. Comparando este valor com a concentração de RV da suspensão inicial com CD, ou seja, antes da formação do complexo (22 mg/mL), observa-se alguma discrepância entre o valor esperado e o valor obtido. A explicação para que este resultado se verifique poderá ser devida à elevada diluição da solução de CI efetuada (1:500), de modo a que a solução de CI possa ser quantificada através do método de HPLC-DAD, uma vez que esta diluição pode ter originado erros que se refletem na determinação do valor da concentração final de RV no CI.

3.2. Caracterização dos isolados

Como referido anteriormente, os isolados clínicos cedidos pelo Instituto Nacional de Saúde não se encontravam caracterizados, assim sendo procedeu-se à confirmação da identificação das estirpes ao nível da espécie, seguindo-se a avaliação quanto à presença de nove genes putativos de virulência cuja presença foi anteriormente descrita para *Arcobacter* spp. (Doudah *et al.*, 2012), avaliando-se ainda o perfil de resistência das estirpes a nove antibióticos convencionais.

Neste estudo, a identificação dos dois isolados realizou-se por PCR convencional. A estirpe de referência LMG 10828 foi utilizada como controlo positivo e foi usado um par de primers descrito anteriormente para a identificação de *A. butzleri* (Houf *et al.*, 2000). No final das reações de amplificação, os produtos resultantes da mesma foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e os resultados encontram-se na Figura 9. Pela observação da figura, tendo em conta o marcador de peso molecular (posição 1) e a banda resultante da amplificação da estirpe de referência (posição 2), podemos confirmar que, tanto a estirpe INSA 593 (posição 3) como a estirpe INSA 776 (posição 4) pertencem à espécie *A. butzleri*, pois os fragmentos resultantes da amplificação têm o tamanho esperado e anteriormente descrito por Houf e colaboradores (2000).

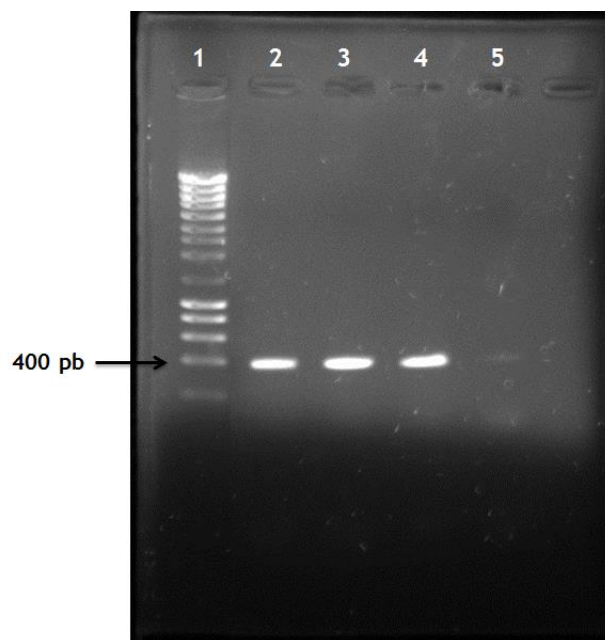


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. Posição 1: Marcador de peso molecular (MPM); Posição 2: controlo positivo (*A. butzleri* LMG 10828); Posição 3: INSA 593; Posição 4 - INSA 776; Posição 5 - Controlo negativo.

Vários estudos demonstraram que a espécie de *A. butzleri* apresenta patogenicidade para animais e humanos (Bücker *et al.*, 2009; Collado e Figueras, 2011; Ho *et al.*, 2007), contudo, o mecanismo e/ou os fatores associados a esta patogenicidade ainda não se encontram totalmente clarificados (Collado e Figueras, 2011). A sequenciação do genoma da estirpe *A. butzleri* RM4018 demonstrou a existência de genes homólogos que codificam fatores de virulência em organismos pertencentes a outras espécies e que estão normalmente associados com o grau de patogenicidade provocada pelos mesmos (Miller *et al.*, 2007; Karadas *et al.*, 2013), pelo que é importante avaliar se as estirpes INSA 593 e INSA 776 apresentam, ou não, alguns destes genes. Assim sendo, posteriormente à confirmação da espécie destes dois isolados, a sua caracterização prosseguiu com o estudo da ocorrência de genes que codificam para diversos fatores de virulência. Para tal, utilizou-se a técnica de PCR, utilizando como controlo positivo a estirpe de referência *A. butzleri* LMG 10828, para a qual a ocorrência dos nove putativos genes de virulência foi anteriormente demonstrada por Doudah *et al.*, (2012). Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e visualizados pela utilização de um transiluminador (Figura 10).

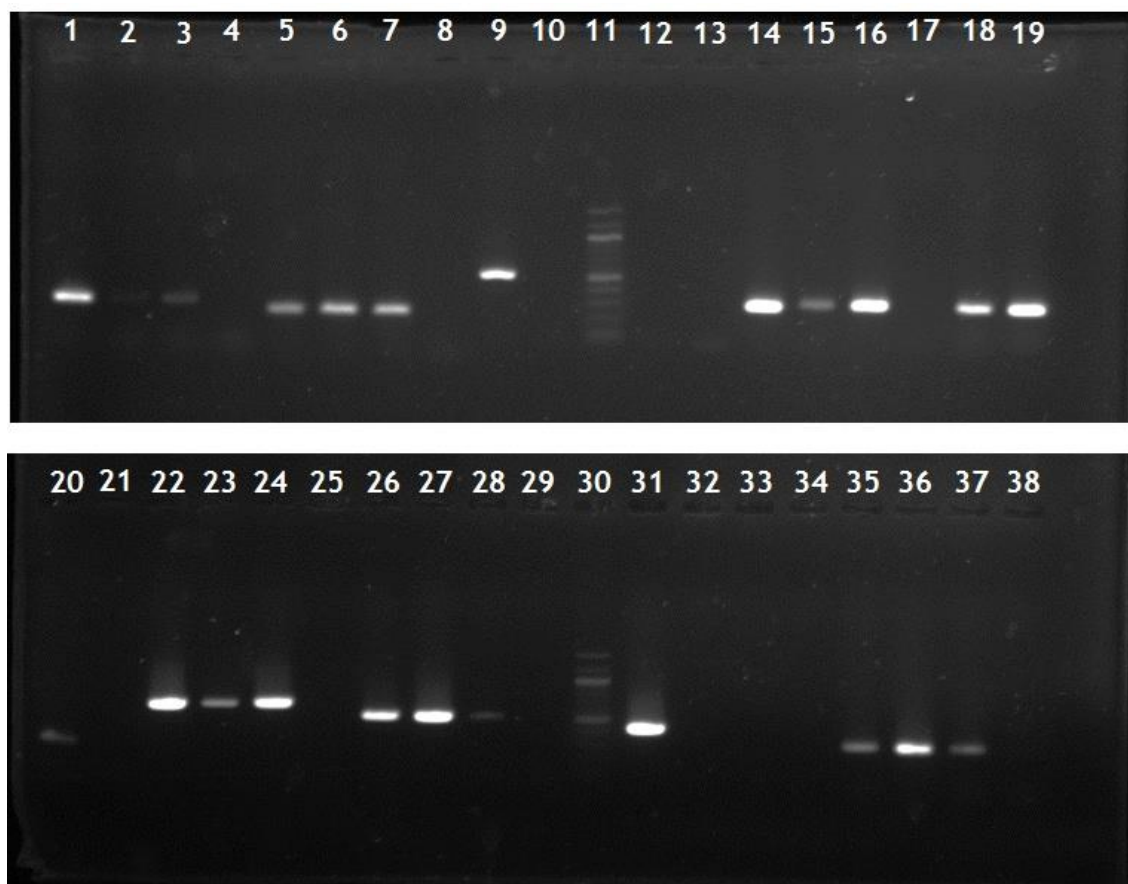


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados relativos aos genes que codificam fatores de virulência. Posições 1 a 4: *cadF* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e controlo negativo (CN); Posições 5 a 8: *tlyA* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 9, 10, 12 e 13: *hecB* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 14 a 17: *pldA* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 18 a 21: *ciaB* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 22 a 25: *cj1349* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 26 a 29: *hecA* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 31 a 34: *irgA* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 35 a 40: *mviN* para LMG 10828, INSA 593, INSA 776 e CN; Posições 11 e 30: MPM.

Tabela 7. Caracterização das estirpes em estudo no que respeita à presença/ausência dos genes codificantes para os fatores de virulência.

Estirpes	Genes de Virulência								
	<i>cadF</i>	<i>tlyA</i>	<i>hecB</i>	<i>pldA</i>	<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>hecA</i>	<i>irgA</i>	<i>mviN</i>
LMG 10828	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INSA 593	+	+	-	+	+	+	+	-	+
INSA 776	+	+	-	+	+	+	+	-	+
AB 17/11	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB 36/11	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Observando a figura 10 e a tabela 7, podemos concluir que os dois isolados clínicos possuem no seu genoma a sequência da maioria dos genes em estudo, como é o caso dos genes que

codificam para as proteínas de ligação à fibronectina *cadF* (posições 2 e 3) e *cj1349* (posições 23 e 24), para a fosfolipase A, *pldA* (Posições 15 e 16), genes essenciais à biossíntese do peptidoglicano, *mviN* (Posições 36 e 37), genes da hemolisina, *tlyA* (Posições 6 e 7), genes que codificam antigénios associados à capacidade de invasão celular, *ciaB* (Posições 19 e 20) e o gene que codifica para uma proteína membro da família da hemaglutinina filamentosa, *hecA* (Posições 27 e 28). Pode observar-se também que os genes que codificam para proteínas ativadoras de hemolisina *hecB* (corridas 10 e 12) e para a proteína da membrana externa regulada por ferro *irgA* (posições 32 e 33) estão ausentes em ambos os genomas das estirpes clínicas. Relativamente aos isolados de origem animal, a caracterização tinha sido realizada anteriormente, sendo que para a estirpe AB 17/11, todos os genes em estudo se encontram presentes no seu genoma, enquanto que para a estirpe AB 36/11 se encontra apenas ausente o gene *irgA*. A presença destes genes no genoma dos isolados clínicos e animais pode estar relacionada com a sua capacidade de provocar doenças em humanos e animais. Por exemplo, em *Campylobacter jejuni*, as proteínas codificadas pelos genes *cadF* e *cj1349* foram relacionadas com a capacidade que a bactéria tem em se ligar a células epiteliais de frango (Flanagan *et al.*, 2009). O gene *hecA*, membro da classe das adesinas foi associado com a ligação, a agregação e a morte celular epidérmica de *Erwinia chrysanthemi* (Rojas *et al.*, 2002) e o gene *pldA* associado com a lise de eritrócitos por *Campylobacter coli* (Grant *et al.*, 1997). Karadas *et al.* (2013) e Levican *et al.* (2013) tentaram relacionar a presença destes genes com a virulência causada por estirpes de *A. butzleri*, analisando a capacidade de adesão e invasão de isolados desta espécie, em culturas de linhas celulares humanas, não sendo encontrada uma relação entre o padrão dos potenciais genes de virulência e a capacidade de adesão e invasão de *Arcobacter*.

Quando ocorre uma infeção originada por microrganismos, o tratamento desta passa geralmente pelo uso de antibióticos. Contudo, o uso abusivo dos mesmos tem tido como consequência o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, tornando difícil o tratamento de várias doenças infecciosas (Ferreira *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2007). Assim sendo, e de forma a tornar o tratamento de infeções provocadas por *A. butzleri* menos empírico, torna-se de extrema importância conhecer os padrões de suscetibilidade antimicrobiana desta espécie. A forma de conseguir estes padrões de suscetibilidade passa pela determinação da CMI por diluição em agar ou em meio líquido, sendo este último o método geralmente utilizado em laboratórios clínicos. A CMI entende-se pela menor concentração de um agente antimicrobiano que é capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo e realiza-se incubando uma quantidade conhecida de inóculo bacteriano em diluições específicas do agente antimicrobiano sendo o crescimento posteriormente avaliado a olho nu (Cavaliere, 2005; NCCLS, 2003).

Assim sendo, para a caracterização das estirpes INSA 593 e INSA 776, procedeu-se à determinação da suscetibilidade antimicrobiana na presença de 9 antibióticos geralmente usados no tratamento de infeções causadas por microrganismos, sendo eles: ampicilina,

vancomicina, ciprofloxacina, trimetoprim, piperacilina, cefoperazona, cloranfenicol, gentamicina e amoxicilina (CDC, 2010). Os resultados das CMI's relativos a cada antibiótico e estirpe em estudo, encontram-se sumariados na tabela 8; além de se apresentarem os resultados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados clínicos, encontram-se também as CMI's da estirpe de referência e dos dois isolados animais, que haviam sido determinados anteriormente por Ferreira e colaboradores (2013).

Tabela 8. Perfis de resistência a antibióticos dos isolados clínicos, animais e estirpe de referência e respectivo fenótipo de resistência.

Estirpe	CMI (µg/mL)									Fenótipo de Resistência
	AMP	VAN	CIP	TMP	PIP	CFP	CHL	GEN	AMX	
INSA 593	>256	>512	0,06	>512	>512	>512	8	0,5	64	AMP, VAN, TMP, PIP, CFP, AMX
INSA 776	>256	256	0,06	>512	512	512	2	0,5	32	AMP, VAN, TMP, PIP, CFP, AMX
AB 17/11	1	> 512	8	>512	16	8	4	0,5	1	VAN, CIP, TMP
AB 36/11	128	>512	4	>512	>512	512	4	0,25	64	AMP, VAN, CIP, TMP, PIP, CFP, AMX
LMG 10828	64	256	0,06	>512	512	512	16	1	32	AMP, VAN, TMP, PIP, CFP, AMX
Ponto de corte*	≥ 32	≥ 32	≥ 4	≥ 16	≥ 128	≥ 64	≥32	≥ 8	≥ 32	-

*Os valores da CMI para os pontos de corte foram baseados nos pontos de corte para a resistência de *Campylobacter* spp. pelos critérios do "National Antimicrobial Resistance Monitoring System" (CDC, 2010) e dos protocolos M100 do "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI, 2005).

Pela observação dos resultados obtidos, verificou-se que os dois isolados clínicos exibem resistência à ampicilina, vancomicina, trimetoprim, piperacilina, cefoperazona e amoxicilina; não obstante, apresentam elevada suscetibilidade quando expostos à gentamicina, ciprofloxacina e cloranfenicol (Tabela 8). A resistência de *A. butzleri* à ampicilina, foi já descrita tanto para isolados clínicos (Vandenberg *et al.*, 2006) como para isolados animais (Atabay e Aydin, 2001; Ferreira *et al.*, 2013). Em 2001, Atabay e Aydin realizaram um estudo usando estirpes de *A. butzleri* isoladas a partir de carcaças de aves, obtendo uma taxa de

resistência a este antibiótico de 64,1 % (Atabay e Aydin, 2001), enquanto que Ferreira e colaboradores em 2013 obtiveram uma taxa superior, de cerca de 98 % de resistência ao mesmo (Ferreira *et al.*, 2013). Por outro lado, num estudo realizado em 2006, apenas 21,3 % dois isolados clínicos de *A. butzleri* apresentaram resistência quando expostos à ampicilina (Vandenberg *et al.*, 2006). Neste caso, apenas a estirpe AB 17/11 se apresentou suscetível quando exposta a este antibiótico. Em relação à suscetibilidade ao cloranfenicol, existem também algumas divergências nos resultados publicados, ou seja, enquanto alguns autores encontraram 98 % de resistência em isolados humanos (Otth *et al.*, 2004) e cerca de 30 % em isolados de carnes a retalho (Kabeya, *et al.* 2004), outros trabalhos relataram níveis de resistência muito mais reduzidos (2,3 %) (Ferreira *et al.*, 2013) e até nulos (Atabay e Aydin, 2001). Este facto pode ser explicado tendo em conta a incidência do uso do antibiótico nos vários locais onde os estudos são realizados, uma vez que em sítios onde a aplicação no tratamento é mais acentuada, as bactérias têm um nível de resistência superior (Otth *et al.*, 2004). No presente estudo, observa-se que, tanto para os isolados como para a estirpe de referência, existe susceptibilidade ao cloranfenicol.

Houf e colaboradores (2004) encontraram valores de suscetibilidade à ciprofloxacina inferiores para isolados animais comparativamente com isolados clínicos (Houf *et al.*, 2004), comportamento que também foi observado nos resultados do presente estudo, onde os isolados clínicos apresentaram valores de CMI mais baixos que os isolados animais, ambos resistentes. Esta resistência à ciprofloxacina tem sido relacionada com o uso de fluoroquinolonas no tratamento de aves de capoeira, levando ao aumento da resistência das bactérias a estes antibióticos (Houf *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2013). O uso de antibióticos no tratamento de aves de capoeira foi igualmente associado ao aumento de resistência bacteriana à amoxicilina (Ferreira *et al.*, 2013; Fera *et al.*, 2003; Atabay e Aydin, 2001), sendo que todas as estirpes testadas se mostraram resistentes a este antibiótico, com exceção do isolado AB 17/11 que foi inibido por este antibiótico a 1 µg/mL. A resistência à vancomicina, à piperacilina, à cefoperazona e ao trimetoprim foi também já descrita para isolados clínicos (Houf, 2001) e isolados animais (Fera *et al.*, 2003; Atabay, 2001; Ferreira, 2013). Esta resistência confirmou-se igualmente para as estirpes em estudo, exceto para a estirpe AB 17/11 que apenas apresenta resistência para a vancomicina e o trimetoprim. Não obstante, quando são realizados estudos de suscetibilidade antimicrobiana à gentamicina, a percentagem de isolados resistentes a este composto tende a ser inferior (Atabay e Aydin, 2001; Fera *et al.*, 2003; Otth *et al.*, 2004; Vandenberg *et al.*, 2006; Ferreira, 2013), facto que se verificou igualmente no presente estudo para os quatro isolados bem como para a estirpe de referência. Kiehlbauch *et al.* (1992) demonstrou que os antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos são aqueles que apresentam um efeito mais ativo sobre *A. butzleri*, pela forte capacidade de inibir a síntese proteica das bactérias (Kiehlbauch *et al.*, 1992). Em suma, todos os isolados, tanto clínicos como animais, apresentam resistência a pelo menos três dos antibióticos testados e que são geralmente usados no tratamento de infeções

microbianas na medicina humana e em práticas veterinárias (Atabay e Aydin, 2001), sendo que, a estirpe que se demonstrou mais suscetível a estes mesmos antibióticos foi a estirpe AB 17/11. Quando as estirpes foram expostas ao cloranfenicol e à gentamicina, todas apresentaram resistência microbiana, facto que é sustentado por publicações anteriores (Ferreira *et al.*, 2013; Otth *et al.*, 2004; Vandenberg *et al.*, 2006).

3.3. Atividade dos complexos de inclusão e do resveratrol livre sobre *A. butzleri*

Após a caracterização das estirpes, os ensaios prosseguiram com a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana das cinco estirpes de *A. butzleri* em estudo aos complexos de inclusão previamente formados e ao RV livre através da determinação dos valores de CMI. Para as estirpes AB 17/11, AB 36/11 e INSA 593 foi obtida uma CMI de 64 µg/mL e para as estirpes INSA 776 e LMG 10828 obteve-se uma CMI de 256 µg/mL quando expostas ao complexo de inclusão formado. Por outro lado, quando expostas ao RV livre, obteve-se para todas as estirpes em estudo uma CMI de 100 µg/mL (Tabela 9).

Tabela 9. Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para o complexo de inclusão e para o resveratrol livre contra as estirpes de *A. butzleri*. Os valores são apresentados em µg/mL.

	LMG 10820	AB 17/11	AB 36/11	INSA 593	INSA 776
CI	256	64	64	64	256
RV livre	100	100	100	100	100

Observando os resultados obtidos, verificou-se que, para o complexo de inclusão, a estirpe de referência e a estirpe INSA 776 possuem um valor mais elevado da CMI comparativamente com os outros três isolados. Da mesma forma, para estas estirpes, o valor da CMI com RV livre é inferior à CMI obtida com o CI, o que poderia sugerir que, com a encapsulação, o composto ficaria com uma exposição limitada de alguns grupos funcionais importantes para a atividade antimicrobiana. No entanto, uma vez que para as estirpes AB 17/11, AB 36/11 e INSA 593 isto não se verifica, é difícil explicar o motivo por que isto acontece. Os resultados descritos até ao momento sobre a atividade antimicrobiana de complexos de inclusão com CDs são um pouco contraditórios: alguns autores demonstraram que a encapsulação aumenta a ação antimicrobiana dos compostos (Panda e Tripathy, 2013; Sun *et al.*, 2011); enquanto outros defendem que a encapsulação de um composto com CDs causa uma redução da sua atividade antimicrobiana (Leclercq *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011). Uma vez que apenas foi estudado um complexo de inclusão neste trabalho e que a dissociação do RV do CI será a mesma para todas as estirpes em estudo pois esta se encontra relacionada com a constante de solubilidade

aparente (K_s), (Lu *et al.*, 2011), sugere-se que, possivelmente, as diferenças observadas sejam devidas às características fenotípicas de cada estirpe.

Recentemente, foi publicado um trabalho onde foi estudado o efeito do RV livre sobre duas espécies de *Arcobacter* (Ferreira *et al.*, 2014). Neste estudo foi utilizada a mesma estirpe de referência de *A. butzleri*, LMG 10828, tendo sido obtida uma CMI de 100 µg/mL, coincidindo desta forma com o resultado obtido para essa mesma estirpe no presente estudo. De forma a garantir que a CD usada na encapsulação do composto ativo não apresentava por si só, capacidade antimicrobiana, foram realizados controlos que confirmaram que o efeito inibitório do crescimento microbiano apresentado pelo complexo de inclusão, se deveu apenas à atividade antimicrobiana do RV que se encontrava no interior de HP- γ -CD, já que os ensaios realizados apenas com CD não apresentaram inibição aparente de crescimento.

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados em bactericidas, isto é, o agente causa a morte das bactérias, ou bacteriostáticos, onde o agente apenas previne o crescimento bacteriano. Em termos de redução de crescimento, para um agente antimicrobiano ser considerado bactericida, a sua ação no crescimento bacteriano resulta numa diminuição maior ou igual a 99,9 % num período de 18-24 horas em relação ao inóculo inicial. A atividade bacteriostática tem sido definida como a razão da entre a concentração mínima bactericida e da concentração mínima inibitória superior a 4 (Pankey e Sabath, 2004). A determinação das características bactericidas ou bacteriostáticas de um agente antimicrobiano podem ser influenciadas pelas condições de crescimento, densidade bacteriana, duração do teste e extensão da redução do número de bactérias. Desta forma, a maioria dos agentes antimicrobianos são melhor descritos como potenciais bactericidas e bacteriostáticos (Pankey e Sabath, 2004). No caso de resveratrol, a sua atividade antimicrobiana foi já descrita, sendo que este composto exibiu tanto capacidade bactericida como capacidade bacteriostática nos vários estudos realizados (Brown e Jiang, 2013; Docherty *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2014; Paulo *et al.*, 2010).

O efeito que um agente antimicrobiano exerce sobre determinado organismo, ou seja, a sua atividade bactericida ou bacteriostática, pode ser avaliado pela determinação da taxa de morte celular na presença de uma concentração fixa do agente antimicrobiano sob condições controladas. Esta taxa é determinada medindo o número de células viáveis em vários intervalos de tempo, resultando num gráfico que é conhecido como curva de morte (Schwalbe *et al.*, 2007). Desta forma, após determinação da CMI e com o intuito de ser avaliado o efeito de várias concentrações de complexo de inclusão sobre as estirpes de *A. butzleri* em fase exponencial de crescimento, procedeu-se primeiramente à determinação da cinética de crescimento de cada estirpe na ausência de qualquer agente antimicrobiano (Figura11) para avaliar a duração e ocorrência da fase exponencial das estirpes.

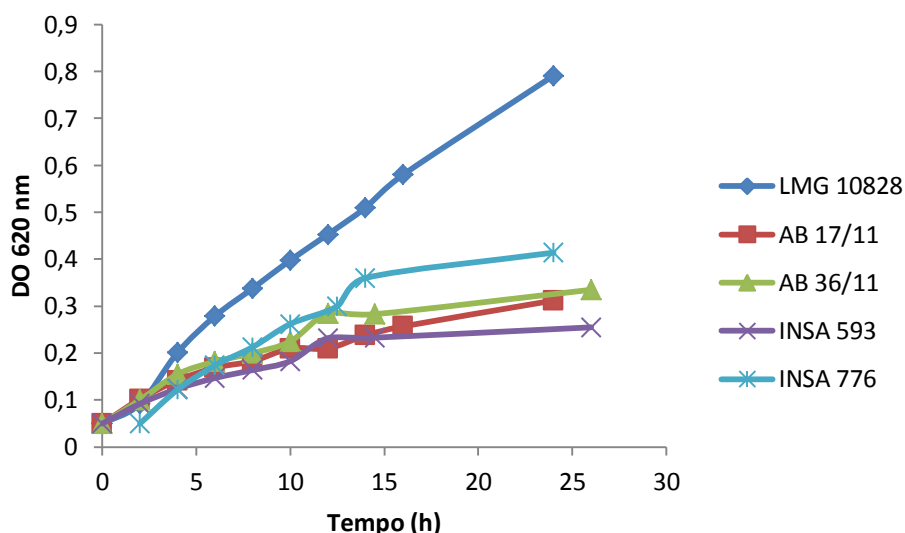


Figura 11. Representação gráfica das curvas de crescimento das estirpes de *A. butzleri* LMG 10828, AB 17/11, AB 36/11, INSA 593 e INSA 776.

Observando a figura anterior, verifica-se que, por volta das 6 horas de incubação, para todas estirpes, as células se encontram na fase exponencial de crescimento bacteriano, fixando-se assim o tempo de incubação necessário para a realização das curvas de morte em 6 h. Os ensaios de taxa de morte foram realizados somente para duas das estirpes em estudo, um isolado animal, AB 36/11 e um isolado clínico, INSA 776. Estas duas estirpes foram selecionadas tendo em conta o seu crescimento e resistência microbiana apresentada. Uma vez que o objetivo deste estudo é avaliar a efetividade dos complexos de inclusão contendo RV em células de *A. butzleri*, tornou-se relevante a eleição das estirpes que, à priori, apresentariam um fenótipo mais virulento.

Tendo sido determinado o tempo ao qual era atingido o meio da fase exponencial de crescimento, foram então realizados os ensaios de curvas de morte para as estirpes AB 36/11 e INSA 776 ao longo de 24 horas de crescimento celular, usando para inóculo células em fase exponencial, na presença de complexo de inclusão (Figura 12) e de RV livre (Figura 13).

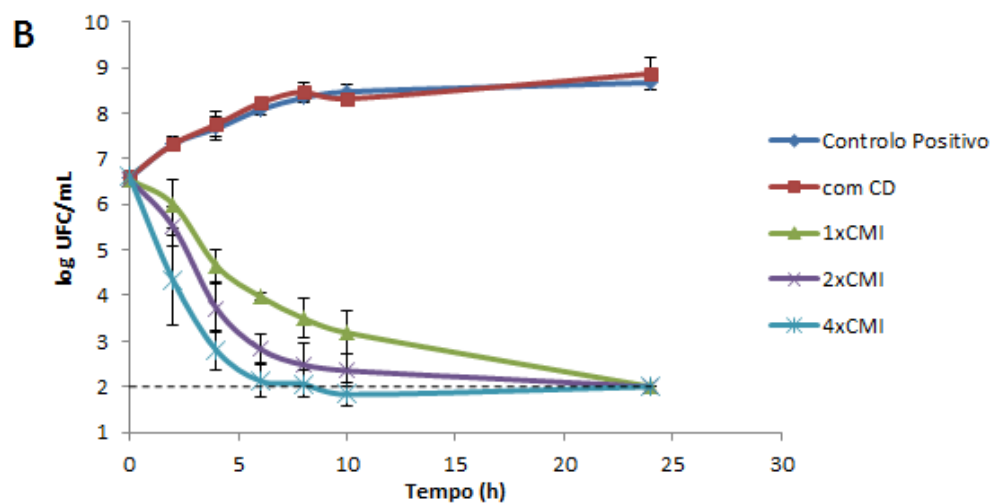
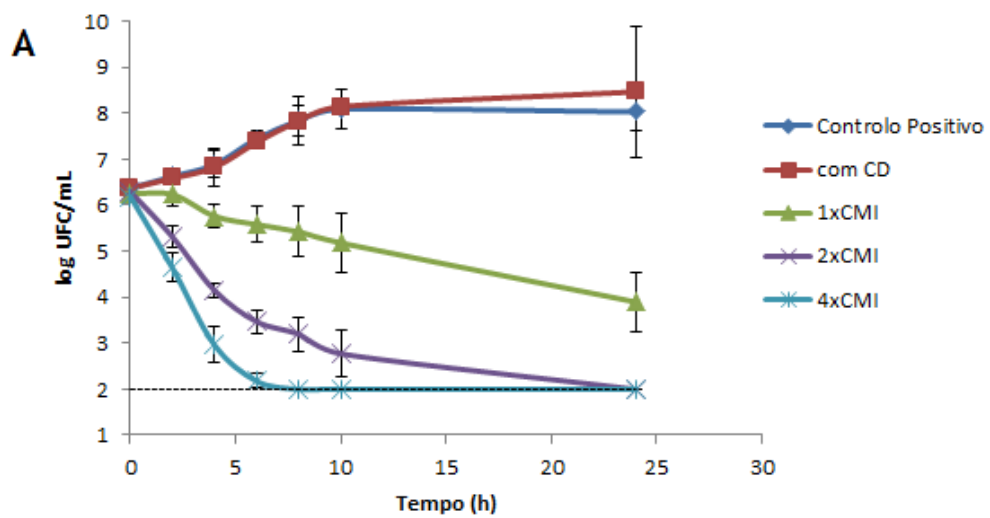


Figura 12. Representação gráfica das curvas de morte das estirpes de *A. butzleri* AB 36/11 (gráfico A) e INSA 776 (gráfico B) quando incubadas com complexo de inclusão.

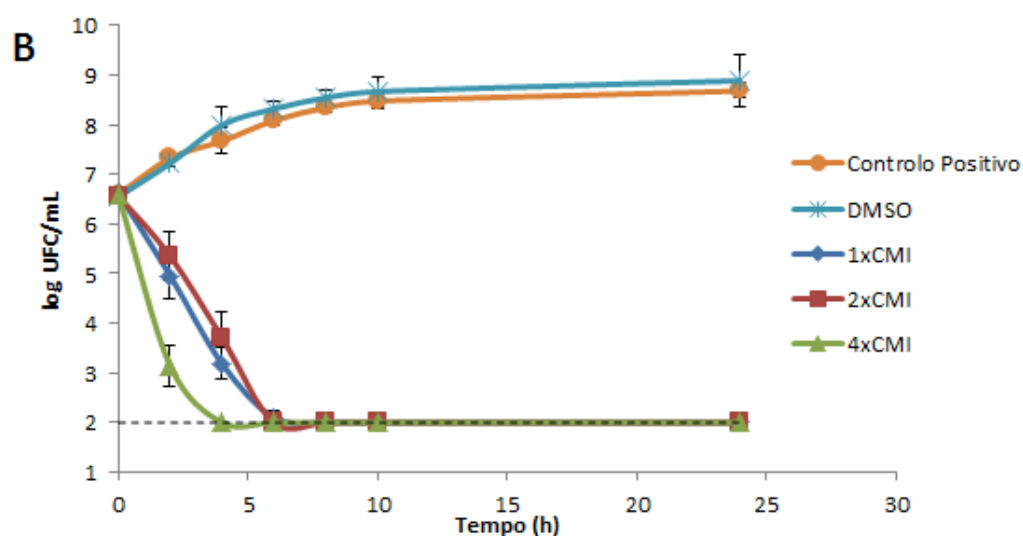
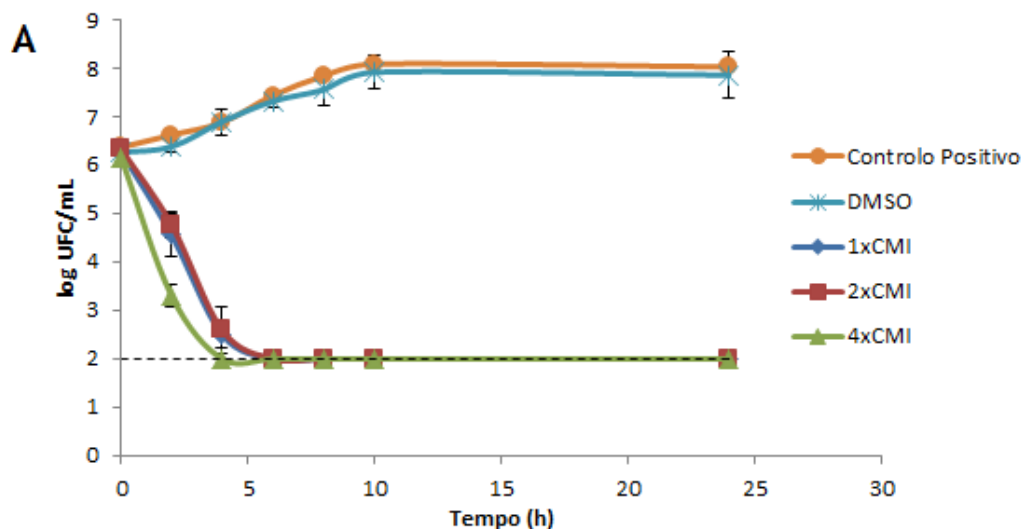


Figura 13. Representação gráfica das curvas de morte das estirpes de *A. butzleri* AB 36/11 (gráfico A) e INSA 776 (gráfico B) quando incubadas com resveratrol livre.

Como se pode comprovar pela figura 12, o efeito exercido pelo complexo de inclusão é semelhante para ambos os isolados na presença de uma concentração correspondente a 2x e 4x a CMI. Isto é, para uma concentração igual a 4x a CMI, o complexo de inclusão demonstrou um efeito bactericida nos dois isolados após 6 horas de incubação, sendo que, quando as estirpes foram expostas a 2x a CMI, este efeito apenas foi observado no final das 24 horas de incubação, sendo que nas primeiras horas, a redução do valor de UFC/mL foi mais notório para o isolado clínico. Por outro lado, quando as estirpes foram expostas a uma concentração de CI correspondente ao valor de CMI, a estirpe INSA 776 mostrou-se mais suscetível à ação do complexo de inclusão, que chega a ter efeito bactericida no final do tempo de ensaio, o que não se observa para a estirpe animal em estudo, já que nesta apenas se observa um efeito bacteriostático.

Tendo em conta o perfil de resistência a antibióticos, a estirpe AB 36/11 é considerada mais resistente que a estirpe INSA 776, além de que apresenta no seu genoma mais um gene codificante para um fator de virulência, o gene *hecB*, em relação à estirpe clínica. Comparando estas características com os resultados das curvas de morte, continua a observar-se uma maior resistência para a estirpe AB 36/11 na presença do complexo de inclusão. Contudo, tendo em conta os valores da CMI, o isolado clínico demonstrou ser mais resistente ao complexo de inclusão, o que indica resultados um pouco contraditórios. Por um lado, a estirpe AB 36/11 pode ser naturalmente mais resistente aos agentes antimicrobianos ou, por outro lado, o complexo de inclusão pode ser mais ativo na estirpe com CMI superior. A discrepância nos resultados obtidos pode ser devida à mudança das condições de crescimento e realização do ensaio, uma vez que, durante a incubação para a determinação da CMI foi usado um ambiente de microaerofilia, enquanto os ensaios de curvas de morte foram realizados em aerofilia. Esta mudança de condições pode afetar mais o crescimento da estirpe INSA 776 do que o crescimento da estirpe AB 36/11, resultando numa maior suscetibilidade ao complexo de inclusão. As condições deste ensaio foram alteradas em relação aos restantes ensaios porque se observou que a quebra do microambiente aquando da amostragem, que levava a um decréscimo das UFC/mL muito inconstante e com demasiadas oscilações. Assim, de forma a obter-se uma curva com um decréscimo mais linear das UFC/mL e tendo por base o estudo de Ferreira *et al.* (2014), estes ensaios foram realizados em condições de aerofilia, mantendo-se estas condições também nos ensaios de citometria de fluxo.

Analisando a figura 13, pode concluir-se que o efeito do RV livre é bastante semelhante sobre os dois isolados, uma vez que, após 6 horas de incubação com o composto, observou-se que este tem atividade bactericida sobre ambos e em todas as concentrações de estudo (1x, 2x e 4x a CMI). Ferreira e colaboradores (2004) estudaram o efeito do RV livre em células de *A. butzleri* LMG 10828 e os resultados foram semelhantes aos obtidos no presente estudo para células em fase exponencial de crescimento.

O ensaio com HP- γ -CD foi realizado para garantir que a mesma não apresenta qualquer influência na atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão e, observando os resultados obtidos (figura 11), a curva resultante deste ensaio é praticamente sobreponível com a curva do ensaio do controlo positivo onde apenas existe meio com inóculo bacteriano, o que seria de esperar, uma vez que a γ -CD é de todas, aquela que menos efeitos apresenta nos testes de toxicidade (Szejtli, 1998). O ensaio com DMSO no estudo da suscetibilidade do RV livre foi usado com o mesmo intuito e as curvas com este composto são igualmente sobreponíveis com as do controlo positivo (figura 12), o que significa que, apesar de o DMSO ter um efeito tóxico sobre as células (Penninckx *et al.*, 1983), na concentração usada não apresenta qualquer efeito inibidor de crescimento.

3.4. Mecanismo de ação dos complexos de inclusão sobre isolados de *A. butzleri*

Com o intuito de avaliar qual o mecanismo de ação que o complexo de inclusão tem sobre as estirpes de *A. butzleri*, foi realizada a técnica de citometria de fluxo. Esta técnica permite a medição simultânea de vários parâmetros em cada célula individualmente, sem afetar a sua integridade física. A identificação de fenótipos estruturais e/ou funcionais consegue-se pela marcação de componentes celulares através da ligação direta de um marcador específico a moléculas estruturais ou funcionais das células (Côrte-Real *et al.*, 2002). Para a marcação das células de *A. butzleri* em estudo, ou seja, AB 36/11 e INSA 776, usaram-se os fluorocromos: SYTO[®] 40, BOX e CTC. A molécula de SYTO[®] 40 tem capacidade de entrar facilmente na célula, independentemente do estado da sua membrana plasmática, ligando-se aos ácidos nucleicos, o que permite a distinção das células de *Arcobacter* de possíveis resíduos ou restos celulares presentes na suspensão celular. O fluorocromo BOX foi usado para avaliar o potencial de membrana, pois a sua entrada nas células só é possível quando a membrana celular das mesmas se encontra despolarizada (Silva *et al.*, 2011). No caso do CTC, as células bacterianas com atividade de transporte de eletrões ou atividade respiratória são capazes de reduzir este fluorocromo a um produto fluorescente designado de formazano de CTC que, por ser insolúvel, se acumula no interior da célula (Silva *et al.*, 2011; Tholozan *et al.*, 1999), resultando num aumento de fluorescência da mesma. Em seguida é apresentada uma tabela (tabela 11) com os resultados dos ensaios de citometria, após marcação das células com estes fluorocromos, para várias concentrações de complexo de inclusão e na presença de HP- γ -CD.

Tabela 10. Percentagem de células de *A. butzleri* positivas para BOX (BOX+) e CTC (CTC+) na presença de várias concentrações de complexo de inclusão. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes.

		BOX ⁺ (%)	CTC ⁺ (%)
AB 36/11	Controlo (0x CMI)	15,01 \pm 1,88	95,35 \pm 4,65
	com HP- γ -CD	14,33 \pm 3,10	86,02 \pm 0,08
	1x CMI	74,05 \pm 1,48	85,60 \pm 3,73
	2x CMI	93,48 \pm 1,02	73,56 \pm 0,28
	4x CMI	96,57 \pm 0,92	36,69 \pm 4,46
INSA 776	Controlo (0x CMI)	14,49 \pm 1,15	92,35 \pm 2,70
	com HP- γ -CD	11,59 \pm 0,18	91,12 \pm 4,16
	1x CMI	54,98 \pm 0,14	86,92 \pm 1,44
	2x CMI	96,50 \pm 2,63	79,77 \pm 3,24
	4x CMI	98,57 \pm 1,80	46,62 \pm 2,88

A figura 14 apresenta os “dot plots” das intensidades de fluorescência obtidos para um dos dois ensaios realizados com a marcação dos fluorocromos SYTO® 40 e BOX para as estirpes AB 36/11 e INSA 776.

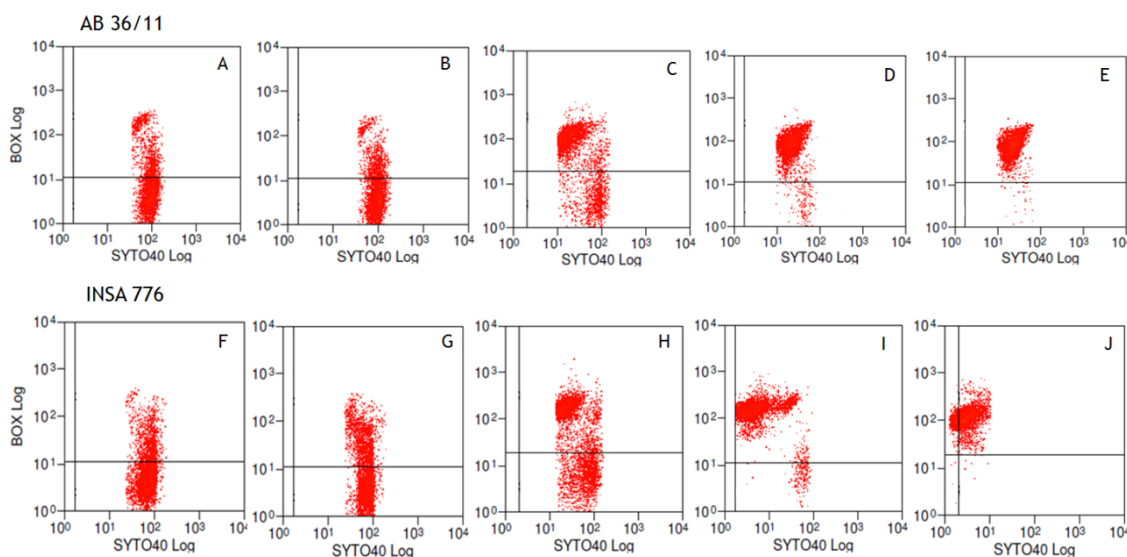


Figura 14. “Dot plots” de fluorescência das células de *A. butzleri* AB 36/11 e INSA 776 marcadas com BOX e após 15 minutos de incubação com meio (A e F), com HP- γ -CD (B e G) e com complexo de inclusão com concentrações de 1xCMI (C e H), 2xCMI (D e I) e 4xCMI (E e J).

Os valores de intensidade de fluorescência das células marcadas com BOX foram recolhidos pelo filtro de banda FL1 e para a sua análise foram estabelecidas duas regiões correspondentes a células não marcadas e células marcadas. Estas regiões foram estabelecidas com base na avaliação da fluorescência obtida para os controlos negativos e positivos das estirpes AB 36/11 e INSA 776 (Figura 14). Como referido anteriormente, o BOX só tem capacidade de entrar nas células se tiver ocorrido a despolarização da membrana das mesmas. Nos resultados apresentados na tabela 8, verifica-se um aumento da percentagem de células marcadas com BOX com o aumento da concentração de complexo de inclusão usado para as duas estirpes. Isto é, com a adição de complexo de inclusão, na estirpe AB 36/11 ocorre o aumento da despolarização da membrana em cerca de 60 %, 76 % e 80 % para 1x, 2x e 4x a CMI, respetivamente. Na estirpe INSA 776, a adição do complexo de inclusão levou ao aumento da despolarização da membrana em cerca de 40 %, 82 % e 84 % para 1x, 2x e 4x a CMI, respetivamente. Comparando com os resultados das curvas de morte, os resultados são relativamente concordantes para 2x a CMI. Quando aplicada a CMI, a despolarização da membrana celular é superior para a estirpe AB 36/11, porém, o efeito da CMI nas células cultiváveis, é mais notório sobre as células de INSA 776. Com a exposição a 4x a CMI existe uma elevada percentagem de despolarização de membrana em ambas as estirpes, sendo que no isolado clínico a percentagem de células positivas é relativamente superior, significando que as células desta estirpe se encontram mais despolarizadas. A despolarização da membrana das células é um estado de transição que ocorre antes da permeabilização da

membrana, estado este irreversível. Esta despolarização pode ser provocada por vários fatores ou agentes antimicrobianos, e neste estado as células têm a capacidade de readquirir culturabilidade (Díaz *et al.*, 2010) podendo ser este o motivo pelo qual a percentagem de despolarização não se encontra, neste caso, diretamente relacionada com os resultados obtidos para os ensaios de curvas de morte.

A figura 15 apresenta os “dot plots” das intensidades de fluorescência obtidos para um dos dois ensaios realizados com a marcação dos fluorocromos SYTO® 40 e CTC para as estirpes AB 36/11 e INSA 776.

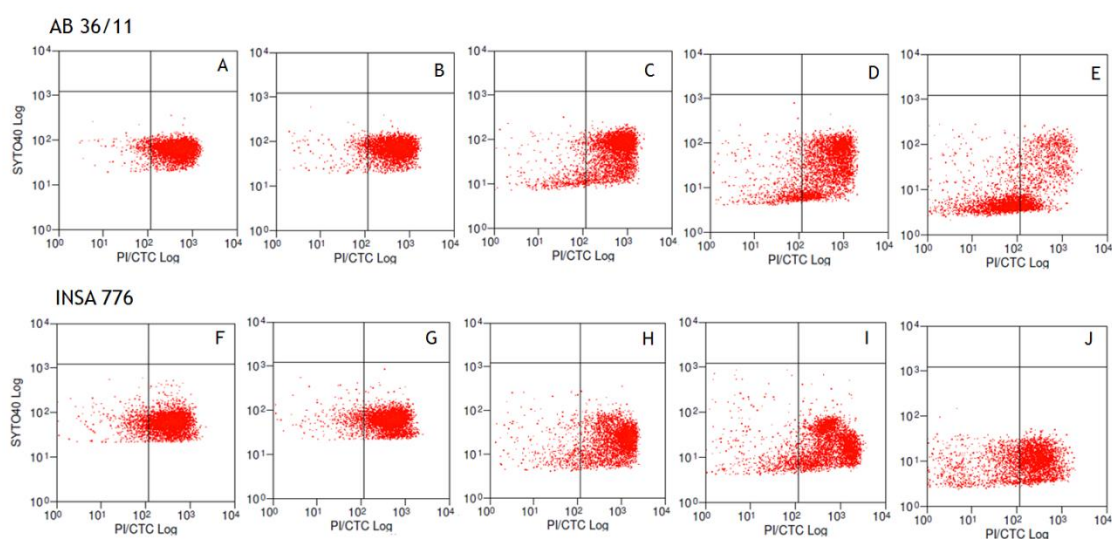


Figura 15. “Dot plots” de fluorescência das células de *A. butzleri* AB 36/11 e INSA 776 marcadas com CTC e após 2 horas de incubação com meio (A e F), com HP- γ -CD (B e G) e com complexo de inclusão com concentrações de 1xCMI (C e H), 2xCMI (D e I) e 4xCMI (E e J).

Os valores de intensidade de fluorescência das células marcadas com CTC foram recolhidos pelo filtro de banda FL4 e para a sua análise foram estabelecidas duas regiões dependentes da intensidade da fluorescência do formazano de CTC nas estirpes AB 36/11 e INSA 776, tendo por base os resultados obtidos com os controlos positivos e negativos de marcação (Figura 15). Como já foi referido, o CTC é reduzido a produtos de formazano de CTC insolúveis quando as células mantêm a sua atividade metabólica. Desta forma, se não houver nenhuma inibição da atividade metabólica, a percentagem de células com fluorescência é elevada, uma vez que estas mantêm a capacidade de reduzir o CTC no seu formazano fluorescente. Observando os resultados da tabela 8, verifica-se que a diminuição da atividade metabólica de ambas as estirpes é dependente do aumento da concentração de complexo de inclusão usado. Para a estirpe AB 36/11, a adição de complexo de inclusão levou a uma redução de cerca de 10 %, 20 % e 60 % para 1x, 2x e 4x a CMI, respetivamente, e, para a estirpe INSA 776, a adição do complexo de inclusão levou a uma redução de cerca de 5 %, 13 % e 45 % para 1x, 2x e 4x a CMI, respetivamente.

Quando as duas estirpes foram expostas a 1x e 2x a CMI do complexo de inclusão, os resultados foram concordantes com os obtidos pelas curvas de morte, onde se observou uma ligeira diminuição das UFC/mL após 6 horas de incubação com o complexo de inclusão. Quando expostas a 4x a CMI, as células apresentam uma baixa atividade respiratória sendo mais evidente para o isolado animal onde a percentagem de células positivas para CTC (36,69 %) foi mais reduzida em comparação com a percentagem obtida para o isolado clínico (46,62 %). Assim sendo, apesar de nos ensaios de curvas de morte o complexo de inclusão ter apresentado uma diminuição relativamente mais rápida das UFCs da estirpe INSA 776, nos ensaios de citometria de fluxo o efeito do complexo mostrou-se mais pronunciado sobre a atividade metabólica da estirpe AB 36/11. No entanto, a redução da atividade metabólica não está diretamente relacionada com a diminuição do número de células cultiváveis (Ferreira *et al.*, 2014).

3.5. Efeito dos complexos de inclusão e do resveratrol livre em biofilmes de *Arcobacter butzleri*

A capacidade de formação de biofilmes por parte dos microrganismos está associada com a virulência bacteriana, a aptidão para a colonização, a sobrevivência no meio ambiente e a resistência a antibióticos (Gaynor *et al.*, 2007). Uma vez que em estudos anteriores foi descrita a capacidade de *A. butzleri* em formar biofilmes (Assanta *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2013; Kjeldgaard *et al.*, 2009), o estudo prosseguiu com a avaliação do efeito dos complexos de inclusão na formação e na dispersão de biofilmes. Neste ponto, o efeito do RV livre sobre a formação de biofilmes das estirpes foi também avaliado.

Para avaliar o efeito do complexo de inclusão e do RV livre na formação de biofilmes, diferentes concentrações destes compostos foram incubados com as cinco estirpes bacterianas, durante 48 horas em microaerofilia. Findo o tempo de incubação, procedeu-se à quantificação da biomassa de biofilme formado pelo método do violeta de cristal, onde, após a dissolução do corante com etanol a 95 %, foi registada a absorvância a 570 nm. Os valores de absorvância obtidos correspondiam à biomassa total do biofilme formado para as várias concentrações de composto. Desta forma, e tendo em conta a absorvância dos controlos positivos (tabela 12), foi calculada a percentagem de inibição de formação de biofilmes das diferentes concentrações quer de CI quer de RV, ou seja, a capacidade de redução da formação de biofilme por ação dos compostos. A tabela 12 apresenta a média da absorvância a 570 nm dos vários ensaios e a classificação das estirpes quanto à sua capacidade de formar biofilmes. Esta classificação é baseada na DO obtida após a formação de biofilme e na DO do controlo negativo (DO_C). As estirpes são classificadas de não-formadoras de biofilme se a DO for inferior à DO_C, fracas formadoras se a DO se encontrar entre a DO_C e 2x DO_C, moderadas

formadoras se a DO estiver entre 2x DO_c e 4x DO_c e se a DO for superior a 4x DO_c são classificadas de fortes formadoras de biofilme (Stepanovic *et al.*, 2000).

Figura 16. Absorvância a 570 nm dos biofilmes formados pelas estirpes em estudo e classificação da capacidade de formação de biofilme, segundo Stepanovic *et al.* (2000).

Estirpe	Abs 570 nm	Formação de biofilme
LMG 10828	0,563	Forte
AB 17/11	0,152	Fraco
AB 36/11	0,581	Forte
INSA 593	0,122	Fraco
INSA 776	0,419	Forte

Observando os valores da tabela, pode concluir-se que as estirpes com maior capacidade para formar biofilmes são as estirpes AB 36/11, INSA 776 e a estirpe de referência, enquanto que a capacidade das estirpes AB 17/11 e INSA 593 é muito mais reduzida. A seguir são apresentadas as figuras com os resultados da percentagem de inibição da formação de biofilmes pela ação do complexo de inclusão e do RV livre (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20).

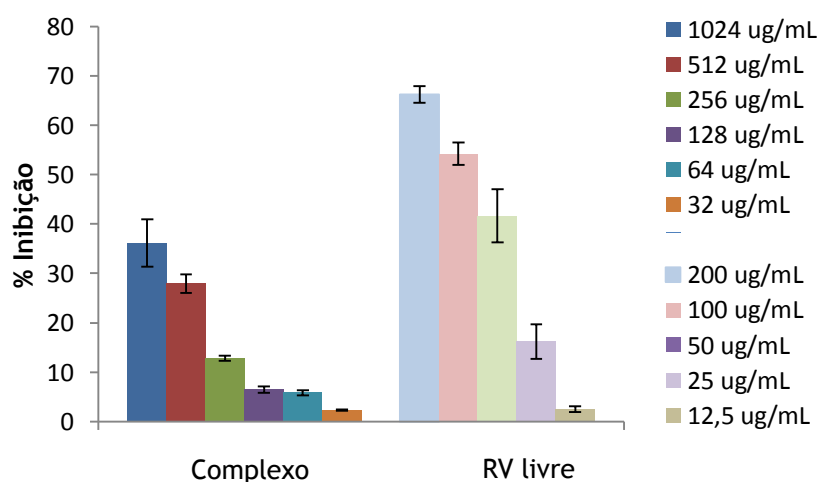


Figura 17. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de *A. butzleri* LMG 10828.

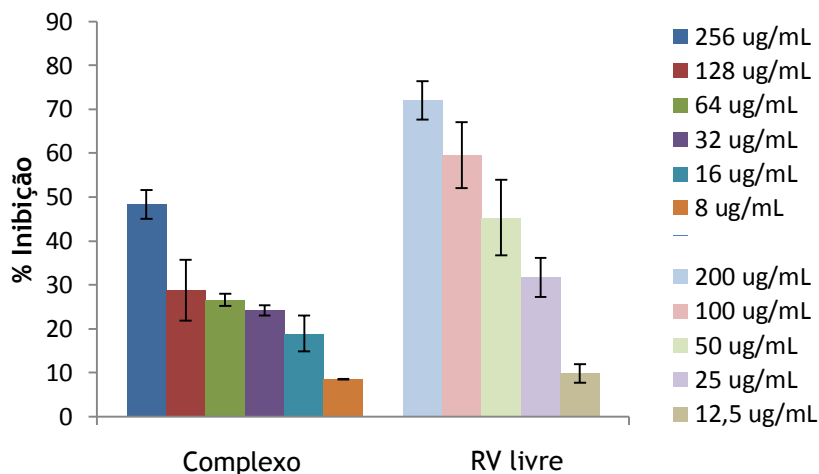


Figura 18. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de *A. butzleri* AB 17/11.

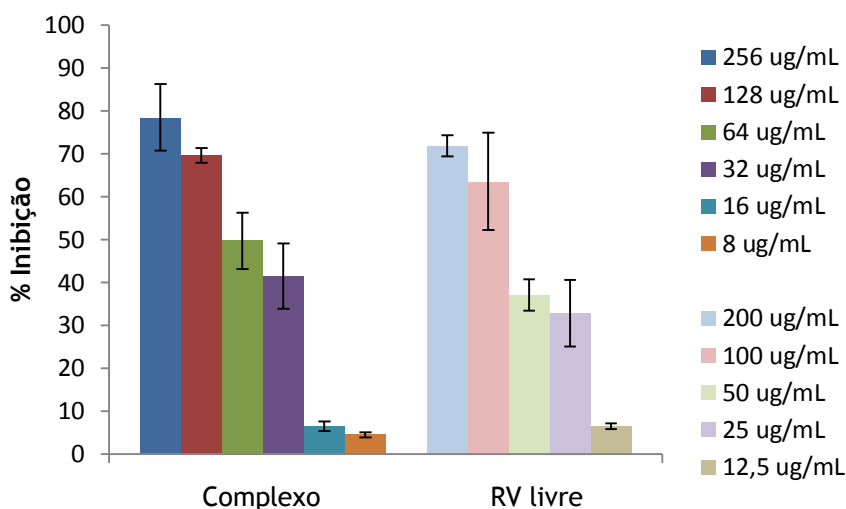


Figura 19. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de *A. butzleri* AB 36/11.

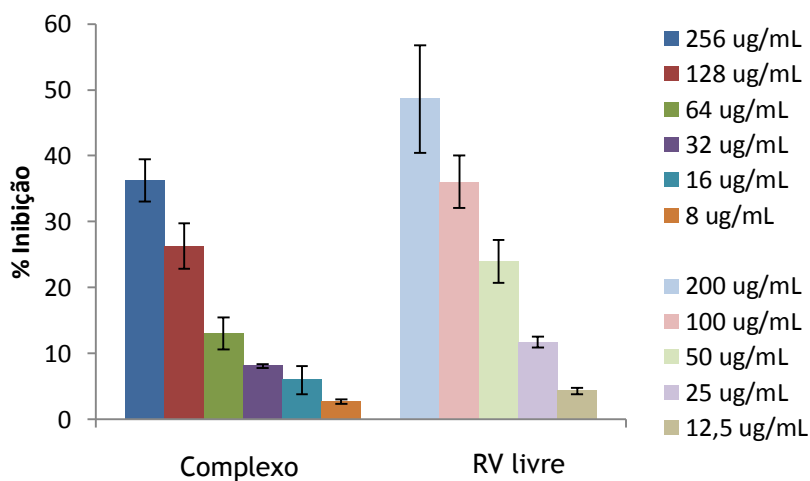


Figura 20. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de *A. butzleri* INSA 593

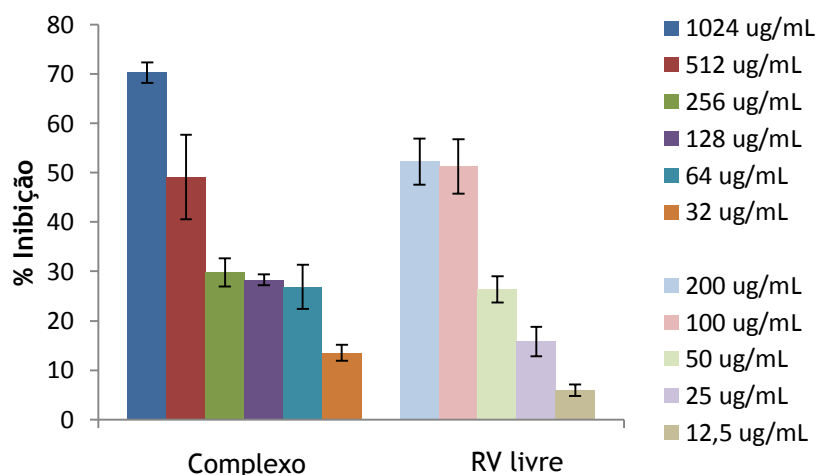


Figura 21. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na inibição da formação de biofilme de *A. butzleri* INSA 776.

Pelos resultados obtidos verifica-se que, na presença do complexo de inclusão ocorre a inibição da formação do biofilme para as todas as estirpes em estudo. Essa inibição é influenciada pela concentração de complexo de inclusão utilizado. De facto, para as estirpes AB 36/11 e INSA 776 (Figura 18 e Figura 20) com concentrações superiores à CMI, observou-se uma inibição elevada da capacidade de formação de biofilme, principalmente para valores de 4x a CMI, com 78 e 70 % de inibição para AB 36/11 e INSA 776, respetivamente. Para 2x a CMI, a inibição da formação de biofilme foi menos notória para a estirpe INSA 776 (cerca de 50 %), sendo que para a estirpe AB 36/11 ainda se observou uma redução de 70 % na formação do biofilme. Para 1x a CMI, a inibição já é bastante inferior para a estirpe INSA 776, uma vez que há a redução de cerca de 30 %, face aos 50 % da estirpe AB 36/11. Para as outras três estirpes, a inibição da formação de biofilme com 1x, 2x e 4x a CMI não se mostraram tão acentuadas (Figura 16, Figura 17 e Figura 19). Não obstante, a capacidade que o complexo de inclusão tem em inibir a formação de biofilme das estirpes de *A. butzleri* é notória mesmo para concentrações inferiores à CMI.

Tendo em conta a capacidade que as cinco estirpes têm para formar biofilme, o efeito do complexo de inclusão é bastante notório sobre AB 36/11 e INSA 776, que se apresentam como fortes formadoras de biofilme; isto já não acontece com a estirpe de referência, para a qual ocorreu uma baixa percentagem de inibição, sugerindo que esta estirpe é intrinsecamente mais resistente que as estirpes AB 36/11 e INSA 776, facto que é apoiado pelo seu perfil de resistência aos antibióticos e pela presença de todos os genes que codificam fatores de virulência. Para as duas estirpes classificadas como fracas formadoras de biofilme, a percentagem de inibição é mais reduzida.

No caso do resveratrol livre, para 1x e 2x a CMI, observa-se uma inibição da formação de biofilme acima de 50% para todas as estirpes, exceto para a estirpe INSA 593 quando incubada com uma concentração de RV igual ao valor da CMI. Nestes ensaios, a redução do biofilme

formado para concentrações mais baixas que a CMI também foi evidenciada, mostrando que a atividade anti-*A. butzleri* do composto é obtida até em concentrações mais reduzidas. Para as estirpes AB 36/11 e INSA 776, a presença de complexo de inclusão leva a uma inibição semelhante do que a presença do RV livre.

Não é só importante saber qual o efeito dos agentes antimicrobianos durante a formação do biofilme, mas também saber qual o seu potencial em promover a dispersão de biofilmes já formados. Desta forma, após o crescimento do biofilme em placas de 96 poços e da posterior incubação com as várias concentrações dos compostos antimicrobianos por mais 48 horas, procedeu-se à quantificação da biomassa de biofilme da mesma forma ao realizado anteriormente para os ensaios de formação de biofilmes. Em seguida, são apresentadas as figuras com os resultados dos efeitos do complexo de inclusão e do resveratrol livre sobre os biofilmes pré-estabelecidos (Figura 21, 22, 23, 24 e 25).

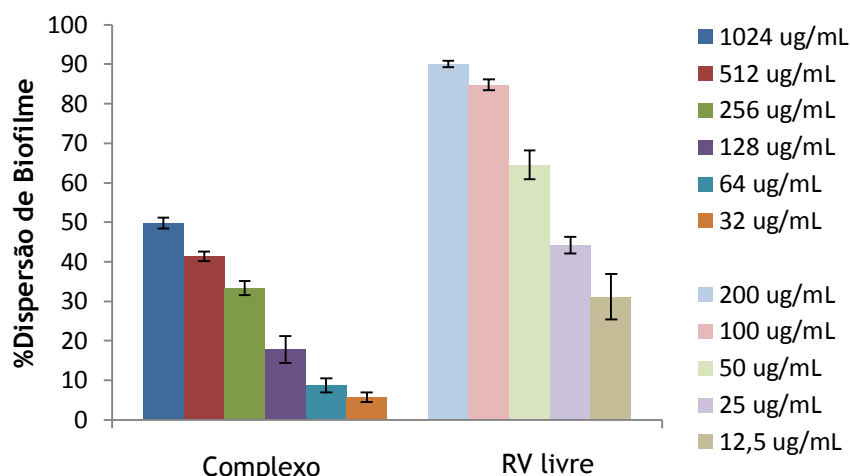


Figura 22. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de *A. butzleri* LMG 10828.

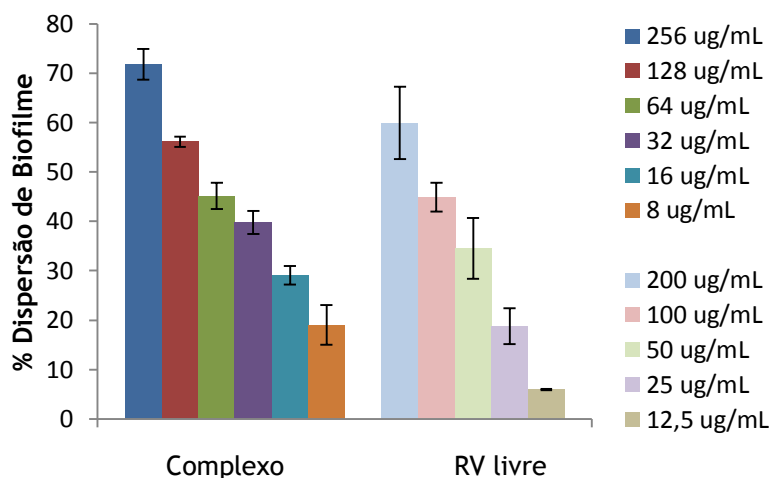


Figura 23. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de *A. butzleri* AB 17/11.

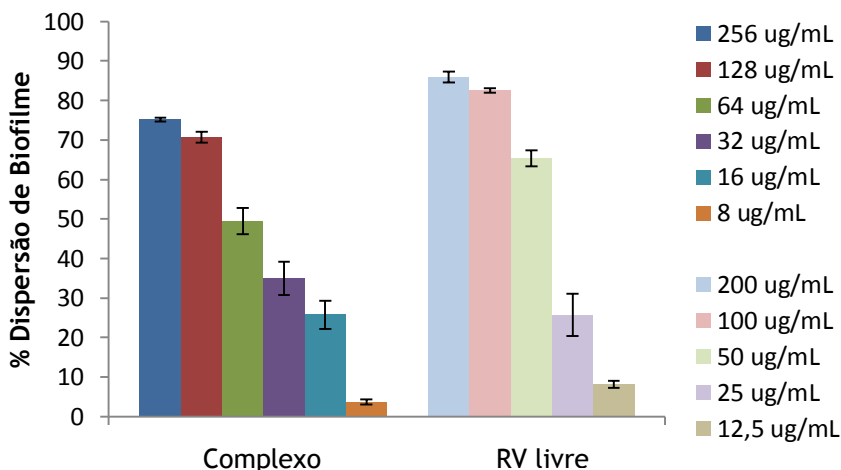


Figura 24. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de *A. butzleri* AB 36/11.

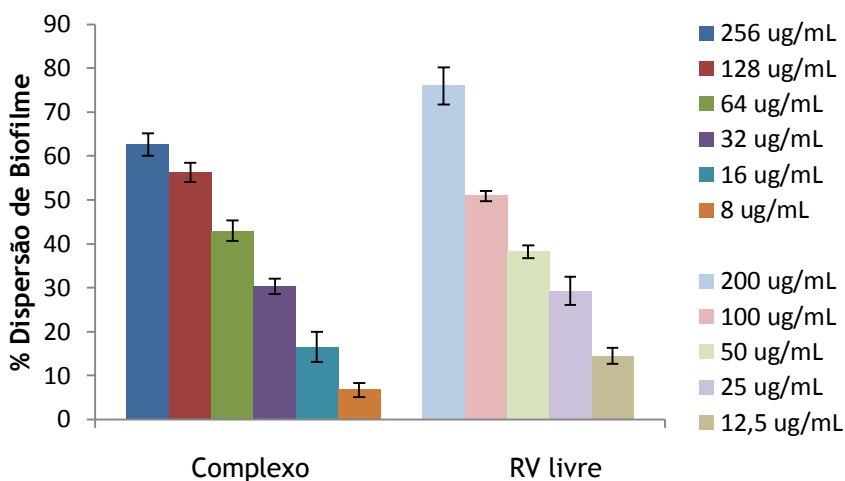


Figura 25. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de *A. butzleri* INSA 593.

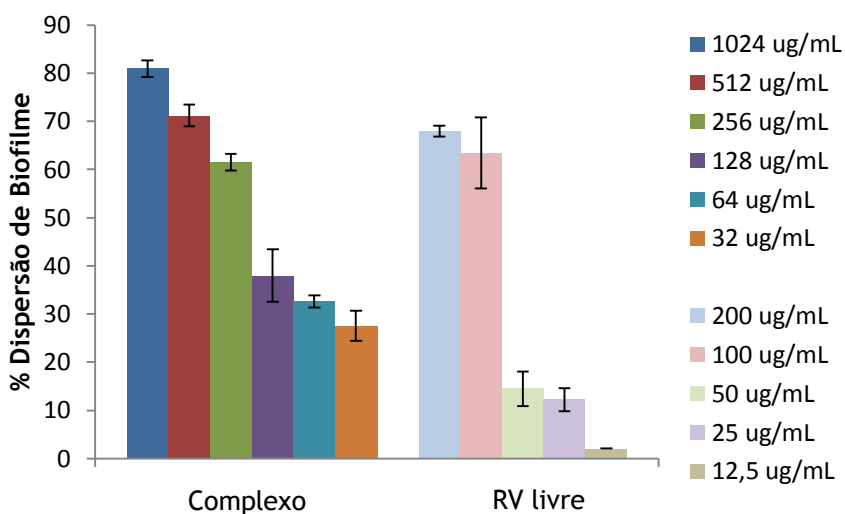


Figura 26. Efeito da adição de complexo de inclusão e RV livre na dispersão de biofilmes de *A. butzleri* INSA 776.

Como se pode verificar pelas imagens apresentadas anteriormente, quando é adicionado complexo de inclusão ou RV livre, ocorre a destruição e/ou desagregação do biofilme pré-formado pelas estirpes bacterianas. Nos ensaios com complexo de inclusão, a dispersão dos biofilmes dos dois isolados animais (Figura 22 e Figura 23) e dos dois isolados clínicos (Figura 24 e Figura 25), com 1x, 2x e 4x a CMI, é geralmente superior a 50 %, chegando a atingir-se na concentração de 4x a CMI, uma percentagem de destruição de 71 %, 75 %, 62 % e 80 % para as estirpes AB 17/11, AB 36/11, INSA 593 e INSA 776, respetivamente. À semelhança do que acontece na formação de biofilme, a estirpe de referência é aquela que menos é inibida pelo complexo de inclusão, havendo uma inibição da dispersão do biofilme formado apenas de 33 %, 41 % e 49 % para 1x, 2x e 4x a CMI, respetivamente (Figura 21) provavelmente devido à sua possível elevada virulência uma vez que esta estirpe é aquela que apresenta maior resistência na maioria dos testes realizados.

Nos ensaios com RV livre, o composto apresenta elevada capacidade de dispersão do biofilme para todas as estirpes, para 1x e 2x a CMI, sendo que na estirpe AB 36/11, esta dispersão é superior a 60 % para 0,5x a CMI. Aqui, e da mesma forma que acontece nos ensaios sobre o efeito dos dois compostos na formação dos biofilmes, verifica-se uma diminuição da biomassa de biofilme com o aumento da concentração dos compostos adicionados. De uma forma geral, a inibição da formação de biofilmes e a dispersão de biofilmes pré-formados, é maior nos ensaios com o RV livre do que quando este se encontra complexado com HP- γ -CD. No entanto, da mesma forma que acontece para algumas estirpes na formação dos biofilmes, para a estirpe INSA 776, o efeito do complexo de inclusão é ligeiramente superior ao do RV livre durante a dispersão. As características hidrofílicas que a superfície da ciclodextrina apresenta pode ser uma vantagem tendo em conta as propriedades do biofilme, ou seja, como o biofilme é altamente hidratado, as características hidrofílicas conferidas pela ciclodextrina ao complexo de inclusão formado, pode facilitar a entrada do mesmo no interior do biofilme e assim promover a ação do resveratrol sobre as bactérias do biofilme (Donlan, 2002; López-Nicolás *et al.*, 2009).

Em suma, pode afirmar-se que o complexo de inclusão, assim como o resveratrol na sua forma livre, são capazes de inibir a formação de biofilmes, sendo igualmente capazes de destruir os biofilmes formados após 48 horas de crescimento. Observa-se uma forte tendência da ação do complexo sobre a estirpe INSA 776, que é aquela para a qual os resultados se apresentam como mais promissores no controlo dos biofilmes pelo CI, tanto na inibição da formação como na promoção da dispersão do mesmo. Quanto às estirpes com fraca capacidade de formar biofilmes, o efeito do complexo não é tão visível, uma vez que a percentagem de inibição é relativamente baixa. Por outro lado, a estirpe de referência demonstra ser a mais resistente, não só nos ensaios da formação e dispersão de biofilmes, mas também nos restantes ensaios realizados ao longo do trabalho.

4. Conclusão

O objetivo do desenvolvimento deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de complexos de inclusão formados entre HP- γ -CD e o resveratrol sobre *Arcobacter butzleri*. Em algumas fases do trabalho, ensaios com resveratrol na sua forma livre também foram realizados, com o intuito de completar a informação do estudo. Os ensaios efetuados permitiram evidenciar a capacidade antimicrobiana que o resveratrol encapsulado apresenta, neste caso sobre isolados animais e isolados clínicos de *A. butzleri*.

Inicialmente, foi realizada uma caracterização dos dois isolados clínicos com a identificação a nível da espécie pelo uso de “primers” específicos e, posteriormente, com a detecção de possíveis genes que codificam para fatores de virulência nos dois isolados. Verificou-se que ambos os isolados apresentam os genes *cadF*, *cj1349*, *pldA*, *mviN*, *tlyA*, *ciaB* e *hecA*. O perfil de resistência a antibióticos comuns foi também avaliado, observando-se para ambos os isolados a resistência à ampicilina, à amoxicilina, à vancomicina, à cefoperazona, à piperacilina e ao trimetoprim. Para a estirpe de referência e para a estirpe AB 17/11 foram detetados todos os fatores de virulência, enquanto que no genoma da estirpe AB 36/11 apenas se encontrava ausente o gene *irgA*. Quanto à resistência antimicrobiana, a estirpe AB 17/11 apresenta resistência a três dos antibióticos de teste, vancomicina, ciprofloxacina e trimetoprim; as outras duas estirpes, apresentam ainda resistência à ampicilina, piperacilina e amoxicilina, sendo que a estirpe LMG 10828 apresenta suscetibilidade à ciprofloxacina. Em suma, todas as estirpes em estudo apresentaram no seu genoma a maioria dos genes que codificam fatores de virulência, da mesma forma que todas elas apresentaram resistência a pelo menos três dos antibióticos usados e suscetibilidade à gentamicina e ao cloranfenicol. Estas características, podem estar ligadas com a patogenicidade que as espécies apresentam e conseqüentemente com a capacidade de originar infeções em animais e humanos.

Após a caracterização dos isolados clínicos, avaliou-se a suscetibilidade das cinco estirpes aos complexos de inclusão formados, obtendo-se uma CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$ para as estirpes LMG 10828 e INSA 776 e uma CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$ para as estirpes AB 17/11, AB 36/11 e INSA 593. A suscetibilidade ao RV livre também foi avaliada, obtendo-se para todos os isolados, uma CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$.

O efeito dos complexos de inclusão e do RV livre durante a fase exponencial de crescimento bacteriano revelou que a atividade bactericida do complexo de inclusão depende do tempo de incubação e da concentração de agente antimicrobiano. A redução do número de células viáveis foi similar para os dois isolados com 2x e 4x a CMI, contudo, quando expostos à CMI, a

estirpe INSA 776 mostrou-se mais suscetível. Para os ensaios com RV livre, o efeito bactericida ocorre após 6 horas de incubação com 1x, 2x e 4x a CMI nos dois isolados.

De forma a avaliar qual o mecanismo de ação que o complexo de inclusão tem sobre as células de *A. butzleri*, foi realizada a técnica de citometria de fluxo com as estirpes AB 36/11 e INSA 776. Para o efeito foram usados os fluorocromos SYTO® 40, BOX e CTC, e os resultados demonstraram que em ambas as estirpes, com o aumento da concentração de complexo de inclusão ocorre a redução da atividade metabólica e o aumento da despolarização da membrana celular.

Foi estudado ainda o efeito do complexo de inclusão e do RV livre na formação e em biofilmes já formados por *A. butzleri*, verificando-se a capacidade de ambos em inibir a formação de biofilmes e a capacidade de destruir biofilmes previamente formados.

Tendo em conta os resultados obtidos durante o estudo, o trabalho contribui para uma melhoria do conhecimento dos perfis de suscetibilidade de *Arcobacter butzleri*, da mesma forma que evidencia a capacidade antimicrobiana que o resveratrol apresenta, estando na sua forma livre ou encapsulado com ciclodextrina. O efeito dos complexos de inclusão foi evidente em células planctónicas e em biofilmes de *A. butzleri*, o que comprova que esta encapsulação do RV poderá ser uma potencial forma de manter a estabilidade do composto sem que seja perdida a sua atividade antimicrobiana, podendo assim ser posteriormente aplicado, por exemplo, para a conservação de produtos de origem alimentar.

5. Perspetivas Futuras

Este trabalho focou-se no estudo do potencial anti-*Arcobacter* com complexos de inclusão entre resveratrol e ciclodextrina, demonstrando resultados promissores no controlo deste microrganismo, tanto em células planctónicas como em biofilmes formados pelas mesmas. Desta forma, pode incluir-se como perspetivas futuras deste trabalho:

- Avaliar a ação antimicrobiana do complexo de inclusão sobre outras espécies de *Arcobacter* cuja presença já foi descrita em produtos alimentares, tal como sobre outros microrganismos também de origem alimentar;
- Avaliar a eficácia do RV e do CI quando adicionados diretamente em alimentos de modo a verificar qual o efeito que estes têm na atividade anti-*Arcobacter* verificada *in vitro*;
- Incorporar os CIs em embalagens para géneros alimentícios, avaliando a libertação do composto ativo e a sua efetividade em impedir a deterioração dos produtos embalados e a proliferação de microrganismos patogénicos.

6. Referências Bibliográficas

- Adesiji, Y. O., e Adefioye, O. A. (2012). In vitro antimicrobial activity of some plant extracts against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*, 19(1), 23-29.
- Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., e Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol : What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182-193.
- Arias, M. L., Cid, A., e Fernández, H. (2011). *Arcobacter butzleri*: FIRST ISOLATION REPORT FROM CHICKEN CARCASSES IN COSTA RICA. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 703-706.
- Assanta, M.A., Roy, D., Lemay, M.J., Montpetit, D. (2002). Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *Journal of Food Protection*, 65, 1240-1247.
- Atabay, H. I., e Aydin, F. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, 33(6), 430-3.
- Atabay H.I., Aydin F., Houf K., Sahin M., Vandamme, P. (2003). The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE, 81, 21-28.
- Atanacković M, Posa M, Heinle H, Gojković-Bukarica L, C. J. (2009). Solubilization of resveratrol in micellar solutions of different bile acids,. *Colloids Surf. B*, 72, 148-154.
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., e Abay, S. (2007). Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 27-35.
- Baxter, R. A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol : review and report of a potent new antioxidant skin care formulation, 2-7.
- Boban, N., Tonkic, M., Budimir, D., Modun, D., Sutlovic, D., Punda-polic, V., e Boban, M. (2010). Antimicrobial Effects of Wine : Separating the Role of Polyphenols , pH , Ethanol , and Other Wine Components, 75(5).

- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum essential oil*. J. Appl. Microbiol., 109, 1139-1149.
- Brewster ME, e L. T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews. Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 645-666.
- Brown J.C., J. X. (2013). Activities of muscadine grape skin and polyphenolic constituents against *Helicobacter pylori*. J. Appl. Microbiol., 114, 982-991.
- Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., e Schulzke, J.-D. (2009). *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. The Journal of Infectious Diseases, 200(5), 756-64.
- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E.J., C. A. (2002). Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol, 3337-3340.
- Calvo, G., Arias, M. L., e Fernández, H. (2013). *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario, 63(2).
- Candon, H. L., Allan, B. J., Fraley, C. D., e Gaynor, E. C. (2007). Polyphosphate kinase 1 is a pathogenesis determinant in *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology, 189(22), 8099-108.
- Carbone, M., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Midiri, A., e Fera, M. T. (2003). ARTICLE IN PRESS Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp . isolates to epithelial cells in vitro, 20, 611-616.
- Cavalieri, S. J. (2005). Manual of antimicrobial susceptibility testing.
- CDC. (2010). National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2009. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Georgia.
- Cervenka, L. (2007). Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. Critical Reviews in Microbiology, 33(2), 101-8.
- Cervenka, L., Malíková, Z., Zachová, I., e Vytrasová, J. (2004). The effect of acetic acid, citric acid, and trisodium citrate in combination with different levels of water activity on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. Folia Microbiologica, 49(1), 8-12.

- Cervenka, L., Peskova, I., Foltynova, E., Pejchalova, M., Brozkova, I., e Vytrasova, J. (2006). Inhibitory effects of some spice and herb extracts against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*. *Current Microbiology*, 53(5), 435-9.
- Chan, M. M. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin *S*, 63, 99-104.
- Collado, L., e Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174-92.
- Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., F., e M., Sousa M.J., Teixeira da Silva, M., Leão, C. (2002). Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, 19-33., 19-33.
- Cucciolla, V., e Ragione, F. Della. (2007). *ND SC RIB ND ES SC RIB*, (October), 2495-2510.
- Das, S., Lin, H., Ho, P. C., e Ng, K. (2008). The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol, 25(11).
- De Boer, R. F., Ott, A., Güren, P., van Zanten, E., van Belkum, A., e Kooistra-Smid, A. M. D. (2013). Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 253-9.
- De La Lastra CA, Villegas, I. (2005). Review Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent : Mechanisms and clinical implications, 405-430.
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046.
- Díaz M, Herrero M, García LA, Q. C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 385-407.
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, a, Theron, J., e Brözel, V. S. (2004). The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Research*, 38(10), 2589-95.
- Docherty, J. J., McEwen, H. a, Sweet, T. J., Bailey, E., e Booth, T. D. (2007). Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1182-4.

- Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1387-92.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-90.
- Donlan, R. M., e Costerton, J. W. (2002). Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms *Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*, 15(2).
- Doudah, L., de Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., ... Houf, K. (2012). Occurrence of putative virulence genes in arcobacter species isolated from humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 735-41.
- Evers, D. L., Wang, X., Huong, S., Huang, D. Y., e Huang, E. (2004). cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling, 63, 85-95.
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Camera, E. La, Carbone, M., e Giannone, M. (2004). Detection of *Arcobacter* spp . in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea *Detection of Arcobacter spp . in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea*, 70(3).
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Lentini, V., Favalaro, a, ... Carbone, M. (2008). Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3266-8.
- Fera, M.T., Maugeri, T.L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Camera, E.L., Blandino, G., e Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, 488-491.
- Fernández H, Villanueva MP, M. G. (2012). Redalyc.Endosimbiosis de *Arcobacter butzleri* en *Acanthamoeba castellanii*, 44, 2-3.
- Fernández, H., Vera, F., e Villanueva, M. P. (2007). Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos *Arcobacter and Campylobacter species in birds and mammals from Southern Chile*, 163-165.
- Fernández, N., Díaz, E. E., Amils, R., e Sanz, J. L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology*, 56(1), 121-32.

- Fernández, H., G. Eller, J. Paillacar, T. Gajardo, and A. R. (1995). Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 90:, 633-634.
- Fernández-mar, M. I., Mateos, R., García-parrilla, M. C., Puertas, B., e Cantos-villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol , hydroxytyrosol and melatonin: A review, 130, 797-813.
- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. a, Domingues, F. C., e Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. International Journal of Food Microbiology, 162(1), 82-8.
- Ferreira, S., Silva, F., Queiroz, J. A., Oleastro, M., e Domingues, F. C. (2014). Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: Activity and effect on cellular functions. International Journal of Food Microbiology, 180, 62-68.
- Ferreira, W.F.C., J.C.F.d. Sousa and N. Lima. (2010). Microbiologia. (Lisboa: Lidel, Ed.).
- Fields, J. a, e Thompson, S. a. (2008). *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. Journal of Bacteriology, 190(9), 3411-6.
- Filip, V. (2003). Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. Food Chemistry, 83(4), 585-593.
- Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, a S., Miller, W. G., e Konkel, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. Infection and Immunity, 77(6), 2399-407.
- Frkmont, L. (2000). BIOLOGICAL EFFECTS OF RESVERATROL. Life Sciences, 66(8), 663-673.
- Gaynor, E.C., Candon, H.L., Allan, B.J., Fraley, C. D. (2007). Polyphosphate kinase 1 is a pathogenesis determinant in *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology, 189, 8099-8108.
- Grant, K. A., Belandia, I. U., Dekker, N., Richardson, P. T., e Park, S. F. (1997). Molecular characterization of *pldA* , the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to Molecular Characterization of *pldA* , the Structural Gene for a Phospholipase A from *Campylobacter coli* , and Its Contribution .

- Gugliandolo, C., Irrera, G. P., Lentini, V., e Maugeri, T. L. (2008). *Pathogenic Vibrio* , *Aeromonas* and *Arcobacter* spp . associated with copepods in the Straits of Messina (Italy), 56.
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol : A structure - activity insight, 11, 210-218.
- Higuchi, T., e Connors, K. A. (n.d.). Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*. 1965, 4, 117-212.
- Hilton, C. L., Mackey, B. M., Hargreaves, a J., e Forsythe, S. J. (2001). The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 929-32.
- Hirose, K. (2001). A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 39, 193-209.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. a, Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T., e Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 51-8.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. a, Wösten, M. M. S. M., van Asten, A. J. a M., e Gaastra, W. (2008). *Arcobacter* spp. possess two very short flagellins of which FlaA is essential for motility. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(1), 85-95.
- Houf, K., Devriese, L. a, Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.-P., van Hoof, J., e Vandamme, P. (2004). Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 10(3), 243-7.
- Houf, K., Devriese, L. A., De, L., Hoof, J. Van, Vandamme, P., Devriese, L. U. C. A., ... Hoof, J. A. N. V. A. N. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* , *Arcobacter cryaerophilus* , and *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media, 1-4.
- Houf, K., e Stephan, R. (2007). Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool, 68, 408-413.
- Houf, Kurt; Tutenel, Ann; De Zutter, Lieven; Van Hoof, J. V. (2000). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identi ¢ cation of *Arcobacter butzleri* , *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*, 193.

- Huigens, R. W., Ma, L., Gambino, C., Moeller, P. D. R., Basso, A., Cavanagh, J., ... Melander, C. (2008). Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. *Molecular bioSystems*, 4(6), 614-21.
- Huigens, R.W., L. Ma, C. Gambino, P.D.R. Moeller, A. Basso, *et al.* (2008). Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. *Molecular bioSystems*, 4, 614-621.
- Irkin, R., Abay, S., e Aydin, F. (2011). Inhibitory effects of some plant essential oils against *Arcobacter butzleri* and potential for rosemary oil as a natural food preservative. *Journal of Medicinal Food*, 14(3), 291-6.
- Jeandet, P., Delaunois, B., Aziz, A., Donnez, D., Vasserot, Y., Cordelier, S., e Courot, E. (2012). *Metabolic Engineering of Yeast and Plants for the Production of the Biologically Active Hydroxystilbene , Resveratrol*, 2012.
- Jette Kjeldgaard, Kirsten Jørgensen, H. I. (2009). Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 256-259.
- Jiang, Z.-D., Dupont, H. L., Brown, E. L., Nandy, R. K., Ramamurthy, T., Sinha, A., ... Steffen, R. (2010). Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter species*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1417-9.
- Johnson, L. G., and E. A. M. (2002). Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources. *J. Food Prot.*, 65:, 1789-1795.
- Jun, H., Seu, Y. B. A. E., e Lee, D. G. U. N. (2007). Candididal Action of Resveratrol Isolated from Grapes on Human Pathogenic Yeast, 17, 1324-1329.
- Kabeya, H., Maryuama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., K., e Y., Abe, M., Katsube, Y., and Mikami, T. (2004). Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, 90,, 303-308.
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäuser, U., Glocker, E., Alter, T., e Gözl, G. (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 583-90.
- Kato E., Tokunaga Y., S. F. (2009). Stilbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L .) and Their Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2544-2549.

- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. O. N. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., e Wachsmuth, I. K. (1991). *Campylobacter butzleri* sp. nov. Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness, 29(2), 376-385.
- Kim TJ, Weng WL, Silva JL, J. Y. and M. D. (2010). Identification of Natural Antimicrobial Substances in Red Muscadine Juice against *Cronobacter sakazakii*, 75(3), 150-154.
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K., Ingmer, H. (2009). Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. International Journal of Food Microbiology, 131, 256-259.
- Lehner, a, Tasara, T., e Stephan, R. (2005). Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. International Journal of Food Microbiology, 102(2), 127-35.
- Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J., e Figueras, M. J. (2013). Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. Applied and Environmental Microbiology, 79(16), 4951-7.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., e Figueras, M. J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. Systematic and Applied Microbiology, 35(3), 133-8.
- Levican, A., Collado, L., e Figueras, M. J. (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. Systematic and Applied Microbiology, 36(1), 22-7.
- Loftsson T, B. M. (1996). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins . 1 . Drug Solubilization and Stabilization, 85(10), 1017-1025.
- Loftsson, T., e Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62(11), 1607-21.
- López-Nicolás, J. M., Rodríguez-Bonilla, P., e García-Carmona, F. (2009). Complexation of pinosylvin, an analogue of resveratrol with high antifungal and antimicrobial activity, by different types of cyclodextrins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(21), 10175-80.
- López-Nicolás JM, Nuñez-Delicado E, Pérez-López AJ, Barrachina AC, C.-C. P. (2006). Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for α -cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography, 1135, 158-165.

- Lu, Z., Cheng, B., Hu, Y., Zhang, Y., e Zou, G. (2009). Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 113(1), 17-20.
- Lucas-Abellán C, Fortea I, López-Nicolás JM, N.-D. E. (2007). *Food Chemistry* Cyclodextrins as resveratrol carrier system, 104, 39-44.
- Marambaud, P., Zhao, H., e Davies, P. (2005). Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer ' s Disease, 1-7.
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., ... Mandrell, R. E. (2007). The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS One*, 2(12), e1358.
- Moe, K. K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Nakai, M., e Misawa, N. (2010). The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 72(4), 411-6.
- Mukherjee, S., Dudley, J. I., e Cardiovascular, D. K. Das. (2010). A growing body of evidence supports that nutrition plays a major role in maintaining a healthy heart. A proper diet containing a variety of grains, fruits, vegetables and foods that are low in saturated fat,. *Dose-Response*, 8, 478-500.
- Nam JB, Ryu JH, KimJW, Chang IS, S. K. (2005). Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres,. *Polymer*, 46, 8956-8963.
- NCCLS. (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. M7-A6. 2003.*
- Nunes M., Casati M., Villalpando K, Teixeira, F. (2007). Contribution of dental biofilm study to the treatment of periodontal diseases, 25(1), 55-61.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., e Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- Ohlendorf D.S. e Murano E.A. (2002). Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods. *J Food Prot*, 65, 1700-1705.
- Oth, L., Wilson, M., Cancino, R., e Fernández, H. (2004). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* to six antimicrobial drugs. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36, 207-210.

- Pahari B, Sengupta B, Chakraborty S, Thomas B, McGowan D, S. P. (2014). NIH Public Access. J Photochem Photobiol B., 118, 33-41. doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.10.010. Contrasting
- Pankey, G. a, e Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 38(6), 864-70.
- Parsek, M. R., e Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annual Review of Microbiology, 57, 677-701.
- Patyal, a, Rathore, R. S., Mohan, H. V, Dhama, K., e Kumar, a. (2011). Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. Transboundary and Emerging Diseases, 58(5), 402-10.
- Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, Queiroz JA, D. F. (2010). Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria, 1533-1538.
- Paulo, L., Domingues, F., e Gallardo, E. (2011). Development and Validation of an Analytical Method for the Determination of trans - and cis -Resveratrol in Wine: Analysis of Its Contents in 186 Portuguese Red Wines, 2157-2168.
- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., António, J., e Domingues, F. (2011). Anti- *Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. FRIN, 44(4), 964-969.
- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Queiroz, J. A., e Domingues, F. (2011). Antimicrobial properties of resveratrol: a review, 1225-1235.
- Penninckx F, Cheng N, Kerremans R, Van Damme B, D. L. W. (1983). The effects of different concentrations of glycerol and dimethylsulfoxide on the metabolic activities of kidney slices. Cryobiology, 20, 51-60.
- Pervaiz S. (2003). Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. FASEB J, 17, 1975-1985.
- Pettit, R. K., Pettit, G. R., Hamel, E., Hogan, F., Moser, B. R., Wolf, S., ... Schmidt, J. M. (2009). E -Combretastatin and E -resveratrol structural modifications: Antimicrobial and cancer cell growth inhibitory b - E -nitrostyrenes. Bioorganic e Medicinal Chemistry, 17(18), 6606-6612.
- Phillips, C. A. (2002). *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control, 12(2001), 263-275.

- Phillips, C. A. and Duggan, J. (2001). The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. *Food Microbiology*, 18, 547-554.
- Pianta, C., Passos, D. T., e Hepp, D. (2007). Isolation of *Arcobacter* spp from the milk of dairy cows in Brazil, 171-174.
- Prescot, L.M., J. P. H. and D. A. K. (2002). *Microbiology*. 5th ed. (M. 59., Ed.).
- Rasheed A, Kumar A, S. V. (2008). Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Scientia Pharmaceutica*, 76(4), 567-598.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V, Johnson, C. H., e Tanner, S. a. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 31-5.
- Rivas, L., Fegan, N., e Vanderlinde, P. (2004). Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 31-41.
- Rojas, C. M., Ham, J. H., Deng, W.-L., Doyle, J. J., e Collmer, A. (2002). HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13142-7.
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V, Sasikala, C., e Ramana, C. V. (2013). *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 12), 4619-25.
- Schwalbe R, Steere-Moore L, G. AL. (2007). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*.
- Shah, a. H., Saleha, a. a., Zunita, Z., e Murugaiyah, M. (2011). *Arcobacter* - An emerging threat to animals and animal origin food products? *Trends in Food Science e Technology*, 22(5), 225-236.
- Shan B., Cai Y, Brooks JD, C. H. (2008). Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry*, 109, 530-537.
- Shi G, Rao L, Yu H, Xiang H, Yang H, J. R. (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell,. *Int. J. Pharm.*, 349, 83-93.

- Shin, S., Soo, N., Park, Y., Kim, M., e Seo, J. (2011). Production of resveratrol from p - coumaric acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing 4-coumarate : coenzyme A ligase and stilbene synthase genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), 48-53.
- Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J. a, e Domingues, F. C. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 10), 1479-86.
- Silva, F., Figueiras, A., Gallardo, E., Nerín, C., e Domingues, F. C. (2014). Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: a comparative study between cyclodextrins and bile acids. *Food Chemistry*, 145, 115-25.
- Singh M, Sharma R, B. U. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 20, 341-359.
- Sinha K, Chaudhary, G., Gupta, Y. K. (2002). Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* 71, 655-665.
- Skřivanová, E., Molatová, Z., Matěnová, M., Houf, K., e Marounek, M. (2011). Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 367-71.
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., e Dooley, J. S. G. (2006). Under the microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 7-14.
- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., e Harrison, M. a. (2007). Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(4), 451-5.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., e Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-9.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5), 1743-1754.
- Teague, N. S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., ... Mason, C. J. (2010). Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand. *Journal of Travel Medicine*, 17(2), 118-23.

- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., e Lewis, K. (2002). Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials, 46(10).
- Tholozan, J. L., Cappelletti, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., e Federighi, M. (1999). Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Applied and Environmental Microbiology, 65(3), 1110-6.
- Trela, B. C., e Waterhouse, A. L. (1996). Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability.
- Van Driessche, E., Houf, K. (2007). Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination. Poultry Science, 86, 744-751.
- Vandamme, P., Eyt, M. V., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., e Vlaes, L. (1992). Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus *Arcobacter* sp. nov., an Aerotolerant Bacterium Isolated from Veterinary Specimens, (July), 344-356.
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., ... Butzler, J. (2004). Species in Humans 1, 10(10).
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J.-P., e Dediste, A. (2006). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni*/*coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(5), 908-13.
- Vian MA, Tomao V, Gallet S, . Coulomb PO, L. J. . (2005). Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns,. J. Chromatogr., A 1085, 224-229.
- Welsh, J. E., King, P. A., e MacCarthy, E. (2011). Characterization of a biofilm bacterium from a recirculation system for European lobster (*Homarus gammarus*). Aquaculture, 318(3-4), 458-463.
- Wood, W. E. (2001). Improved aroma barrier properties in food packaging with cyclodextrins. TAPPI-Polymers, Laminations and Coatings Conference, 367- 377.
- Wu, J. M., e Hsieh, T. (2011). Resveratrol : a cardioprotective substance, 1215, 16-21.
- Zanetti, F., Varoli, O., Stampi, S., e De Luca, G. (1996). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. International Journal of Food Microbiology, 33(2-3), 315-21.

