



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Estudos de susceptibilidade e formação de
biofilmes de várias estirpes de *Acinetobacter
baumannii***

Andreia Filipa Silvestre Duarte

Tese para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Fernanda Domingues
Co-orientador: Dra. Susana Ferreira

Covilhã, 9 de Junho de 2011

Folha em branco

Agradecimentos

A execução deste trabalho só foi possível devido à colaboração, disponibilidade e empenho de algumas pessoas, desde já, a todos o meu muito obrigado.

À Professora Fernanda Domingues, pela orientação, disponibilidade e atenção, assim como conhecimentos que transmitiu.

À Susana, por todo o tempo disponibilizado, pela orientação e toda a constante motivação e amizade que transmitiu.

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, os meus exemplos de vida, por estarem sempre presentes, pela compreensão e apoio. Não é possível agradecer tudo o que fazem por mim.

A toda a minha família, em particular à minha madrinha Luísa, ao Zé Carlos e às minhas avós por sempre me apoiarem em todas as etapas da minha vida.

A todos os meus amigos, em especial à Diana G., Daniela, Diana R., João e André, por me fazerem sorrir, pela amizade, carinho, paciência e apoio constante nunca me deixando desistir.

Aos meus colegas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), em especial à Marta, Sara e Catarina pelo apoio, disponibilidade e amizade.

À Dr. Sofia e ao Hospital Cova da Beira pelas amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii* para este trabalho.

Folha em branco

Resumo

O aumento da severidade das patologias tem levado ao uso excessivo e por vezes inadequado de antibióticos. Esta situação tem contribuído para o aparecimento de estirpes bacterianas multirresistentes que são motivo de preocupação a nível hospitalar. O *Acinetobacter baumannii* é um microrganismo associado a infecções nosocomiais e responsável por uma grande percentagem de infecções adquiridas nas unidades de cuidados intensivos em todo o mundo. Esta bactéria é ubiqüitária e frequentemente saprófita, tendo a capacidade de sobreviver por períodos muito longos em ambientes hospitalares, devido à capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes. O crescente aumento de estirpes de *A. baumannii* resistentes a antibióticos e a sua elevada capacidade de formação de biofilmes torna urgente a modificação dos actuais métodos de tratamento e a investigação de alternativas terapêuticas. Os agentes naturais, nomeadamente os óleos essenciais, podem ser uma alternativa promissora, relativamente aos antibióticos convencionais, uma vez que há vários relatos das suas propriedades antimicrobianas. O óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum*, para além da sua frequente utilização na indústria alimentar, também é conhecido como um potente agente antibacteriano. Neste trabalho avaliou-se o potencial antimicrobiano do óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum* sobre *A. baumannii* quer em células planctónicas quer em biofilmes, assim como o eventual efeito sinérgico entre antibióticos e o óleo essencial e o seu efeito em eritrócitos humanos. Foi ainda estudada a motilidade e capacidade de formação de biofilmes de isolados clínicos de *A. baumannii* com resistência a múltiplos antibióticos convencionais. Os resultados sugerem que o óleo essencial de sementes de coentros tem um rápido efeito bactericida em *A. baumannii*, tanto em células em fase exponencial como em fase estacionária de crescimento, e que este óleo em combinação com cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina ou tetraciclina tem um efeito sinérgico. Também foi evidenciado que este óleo inibe a formação de biofilmes e promove a dispersão de biofilmes previamente formados. Por fim, ainda se observou que todas as estirpes clínicas apresentaram capacidade de formar biofilmes, não se verificando relação entre a capacidade de formação de biofilme e a amostra onde foi isolada a estirpe, o sexo do paciente, a resistência a antibióticos ou a motilidade. Assim, o óleo essencial de sementes de coentros mostrou grandes potencialidades no controlo de infecções e na dispersão de biofilmes formados por *A. baumannii*, mostrando ser um potencial agente terapêutico contra infecções por este microrganismo, com a particularidade de não apresentar citotoxicidade em eritrócitos humanos.

Palavras-chave

Acinetobacter baumannii; biofilmes; óleo essencial de sementes de coentros; sinergismo.

Folha em branco

Abstract

The increased severity of diseases has led to the inappropriate and overuse of antibiotics. This has contributed to the emergence of multidrug-resistant strains that are of concern in hospital care units. *Acinetobacter baumannii* is associated with nosocomial infections and is responsible for a large proportion of infections acquired in intensive care units worldwide. This bacterium is a ubiquitous and often saprophytic, and could survive for long periods in hospital environments due to its ability to adhere to surfaces and form biofilms. The increase of *A. baumannii* resistant strains to antibiotics and its high ability of biofilm formation make it urgent to make a change in conventional methods of treatment and to investigate alternative therapies. Natural agents, namely essential oils, may be a promising alternative, in relation to conventional antibiotics, since there are several reports of its antimicrobial properties. The essential oil of *Coriandrum sativum* seeds, in addition to their frequent use in the food industry is also known as a potent antibacterial agent. In this study it was evaluated the antimicrobial potential of essential oil of *Coriandrum sativum* seeds against *Acinetobacter baumannii* in either planktonic cells or in biofilms, as well as the possible synergistic effect between antibiotics and the essential oil and its effect on human erythrocytes. It was also studied the motility and ability to form biofilms of clinical isolates of *A. baumannii* resistant to several conventional antibiotics. The results suggest that the essential oil of coriander seeds has a fast bactericidal effect against *A. baumannii*, both in cells in exponential as well as in stationary phase of growth, and that this oil in combination with chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin or tetracycline has a synergistic effect. It was also evidenced that this oil inhibits biofilm formation and promotes the dispersion of preformed biofilms. Finally, it was also noted that all clinical strains showed ability to form biofilms, while there was no relationship between the ability of biofilm formation and sample from where the strain was isolated, patient's gender, resistance to antibiotics or motility. Therefore, the essential oil of coriander seeds showed great potential in infection control and dispersion of biofilms preformed by *Acinetobacter baumannii*, showing to be a potential therapeutic agent against infection by this microorganism, with the particularity of not presenting cytotoxicity in human erythrocytes.

Keywords

Acinetobacter baumannii; biofilms; essential oil of coriander seeds; synergism.

Folha em branco

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Palavras-chave	vi
Abstract	viii
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> - Um patógeno emergente	2
2.2. Aspectos gerais de <i>A. baumannii</i>	3
2.2.1. Taxonomia	3
2.2.2. Caracterização	4
2.2.3. Identificação genómica	5
2.2.4. Manifestações clínicas	6
2.2.5. Factores de virulência	6
2.3. Resistência a antimicrobianos	7
2.3.1. Estratégias terapêuticas	10
Capítulo 3 - Biofilmes microbianos	12
3.1. Formação de biofilmes	12
3.2. Resistência a antimicrobianos	14
3.3. Controlo de biofilmes	14
Capítulo 4 - Agentes antimicrobianos	16
4.1. Óleos essenciais	16
4.1.1. Óleo essencial de coentros	17
4.2. Sinergismo entre compostos	18
Capítulo 5 - Objectivos	21
Capítulo 6 - Materiais e Métodos	22
6.1. Microrganismos	22
6.2. Conservação das estirpes	22
6.3. Agentes antimicrobianos	22
6.4. Actividade antimicrobiana	24
6.4.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	24
6.4.2. Curvas de morte em células planctónicas	24
6.5. Ensaios de sinergismo	25

6.6.	Biofilmes microbianos	26
6.6.1.	Quantificação da formação de biofilmes	26
6.6.1.1.	Avaliação da formação de biofilmes usando diferentes meios e temperaturas	26
6.6.1.2.	Avaliação da formação de biofilme por estirpes clínicas de <i>A. baumannii</i>	27
6.6.2.	Efeito do óleo essencial de sementes de coentros nos biofilmes	28
6.6.2.1.	Análise do efeito do óleo essencial na formação do biofilme	28
6.6.2.2.	Efeito do óleo essencial no biofilme estabelecido	28
6.6.2.3.	Métodos analíticos para testar o efeito do óleo essencial nos biofilmes	29
6.6.3.	Análise do efeito do óleo no biofilme estabelecido por microscopia electrónica de varrimento	29
6.7.	Testes de motilidade	30
6.8.	Ensaio de hemólise e hemaglutinação	30
6.9.	Análise estatística	31
6.10.	Equipamento	31
6.11.	Reagentes	32
Capítulo 7 - Resultados e Discussão		33
7.1.	Actividade antimicrobiana	33
7.2.	Ensaio de sinergismo	38
7.3.	Biofilmes microbianos	41
7.3.1.	Avaliação da formação de biofilmes em diferentes meios e temperaturas	41
7.3.2.	Comparação de dois métodos de quantificação de biofilmes	43
7.4.	Efeito do óleo essencial de sementes de coentros em biofilmes de <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
7.4.1.	Efeito do óleo essencial na formação do biofilme	44
7.4.2.	Efeito do óleo essencial no biofilme estabelecido	48
7.5.	Formação de biofilme por estirpes clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	54
7.6.	Testes de motilidade	58
7.7.	Ensaio de hemólise e hemaglutinação	59
Capítulo 8 - Conclusões e Perspectivas futuras		61
Referências bibliográficas		63

Folha em branco

Lista de Figuras

- Figura 2.1** - Representação esquemática da classificação taxonómica do género *Acinetobacter*. 4
- Figura 2.2** - Aparência de colónias de *A. baumannii* (Imagem obtida em <http://www.acinetobacter.org/>) 5
- Figura 2.3** - Alvos biológicos de alguns antibióticos (Adaptado de “Manual dos antibióticos” [62]). 7
- Figura 2.4** - Potenciais mecanismos de resistência antimicrobiana por *A. baumannii*. 10
- Figura 3.1** - Imagem representativa dos passos de adesão, desenvolvimento e dispersão de um biofilme. (Adaptado de http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version-2010-03-16/) 13
- Figura 4.1** - Curvas representativas de sinergismo, indiferença e antagonismo. (Adaptado de Wagner e tal [95]) 19
- Figura 7.1** - Representação gráfica das curvas de morte do óleo essencial de sementes de coentros contra células planctónicas em fase exponencial de crescimento de duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG1025 e LMG 1041, A e B respectivamente. 35
- Figura 7.2** - Representação gráfica das curvas de morte/inibição do óleo essencial de sementes de coentros contra células planctónicas em fase estacionária de crescimento de duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG1025 e LMG 1041, A e B respectivamente. 36
- Figura 7.3** - Curvas representativas do efeito do óleo de sementes de coentros com antibióticos convencionais contra *Acinetobacter baumannii* LMG 1025. 39
- Figura 7.4** - Curvas representativas do efeito do óleo de sementes de coentros com antibióticos convencionais contra *Acinetobacter baumannii* LMG 1041. 40
- Figura 7.5** - Média e desvio padrão da absorvância a 570nm de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, a 37°C (A) e 30°C (B). 42
- Figura 7.6** - Absorvância a 570nm de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, a 37°C e 30°C, pelos métodos A e B, descritos no ponto 6.6.1.1. 43
- Figura 7.7** - Percentagem de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, através do método de cristal de violeta. Controlo positivo (CP). 45

Figura 7.8 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de sementes de coentros na viabilidade das células do biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, após 24h de exposição. A viabilidade celular foi determinada pela avaliação da actividade metabólica das células pelo método XTT (A) e pela contagem das UFC/mL (B). 46

Figura 7.9 - Percentagem de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 (A) e LMG 1041 (B), ao longo do tempo, através do método de cristal de violeta. Controlo positivo (CP). 49

Figura 7.10 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de sementes de coentros na viabilidade das células do biofilme previamente formado por *A. baumannii* LMG 1025, após exposição ao óleo durante 4, 8 e 24h. A viabilidade celular foi determinada pela avaliação da actividade metabólica das células pelo método XTT (A) e pela contagem das UFC/mL (B). 50

Figura 7.11 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de sementes de coentros na viabilidade das células do biofilme previamente formado por *A. baumannii* LMG 1041, após exposição ao óleo durante 4, 8 e 24h. A viabilidade celular foi determinada pela avaliação da actividade metabólica das células pelo método XTT (A) e pela contagem das UFC/mL (B). 51

Figura 7.12 - Efeito do óleo essencial de sementes de coentros com concentração de 0.25 (B), 0.5 (C) e 1 vez (D) a CMI no biofilme previamente formado (A) por *A. baumannii* LMG 1041, após 24h de exposição. Observados por microscopia electrónica de varrimento com uma ampliação de 2000X. 52

Figura 7.13 - Média e desvio padrão da absorvância a 570nm de 36 estirpes clínicas de *A. baumannii* aderidas e poços controlo (CN). 55

Figura 7.14 - Representação gráfica da média dos diâmetros do crescimento das estirpes de *A. baumannii* em placas de “Swimming”. 58

Figura 7.15 - Motilidade em placas semi-sólidas de “Swimming”. Placas fotografadas após incubação durante 24h a 37°C. Estirpe *A. baumannii* LMG 1025 (A) e estirpes clínicas AcB 13/10 e 14/10 (B). 59

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 6.1 - Composição química (% de componente) do óleo essencial de sementes de coentros comercial isolado por destilação a vapor a partir de sementes de <i>Coriandrum sativum</i> . Abreviações: V, Vestígios (<0.05%).	23
Tabela 6.2 - Composição dos meios testados	26
Tabela 6.3 - Características dos equipamentos utilizados	31
Tabela 6.4 - Lista de reagentes usados ao longo do trabalho experimental	32
Tabela 7.1 - Concentração mínima inibitória ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial e dos agentes antimicrobianos convencionais ($\mu\text{g}/\text{mL}$) contra duas estirpes de referência de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	34
Tabela 7.2 - Concentração inibitória fracionada (CIF) e índices FIC (ICIF) do óleo de sementes de coentros em combinação com antibióticos convencionais contra duas estirpes de referência de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	39
Tabela 7.3 - Formação de biofilme por estirpes clínicas de <i>A. baumannii</i> em função da amostra de onde foi feito o isolamento	56
Tabela 7.4 - Formação de biofilme por estirpes clínicas de <i>A. baumannii</i> em função do sexo do paciente	56
Tabela 7.5 - Formação de biofilme por estirpes clínicas de <i>A. baumannii</i> em função da resistência a antibióticos.	57

Folha em branco

Lista de Acrónimos

CIF	Concentração inibitória fraccionada
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Exopolissacarideo
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fraccionada
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarideo
MHB	Müller-Hinton broth
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chains reaction</i>
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PMS	<i>Phenazine methosulphate</i> (fenazina metosulfato)
rpm	Rotações por minuto
UCI	Unidade de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colónias
XTT	<i>2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-fenilamnocarbonil-tetrazolium</i>

Folha em branco

Capítulo 1 - Introdução

A resistência antimicrobiana é um problema crescente nos hospitais modernos. O aumento da severidade das doenças e da imunidade comprometida de pacientes levam ao uso frequente de um amplo espectro de agentes antimicrobianos [1]. Assim, o sucesso inicial dos antibióticos e desconhecimento dos efeitos secundários conduziu ao seu uso excessivo e descontrolado. Estas circunstâncias levaram ao desenvolvimento de vários mecanismos de resistência pelas bactérias. O género *Acinetobacter* exemplifica esta tendência, uma vez que várias espécies, como por exemplo a *A. baumannii*, exibem mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos, bem como capacidade de adquirir novas características de resistência [1, 2].

Neste contexto, diversos patogénios multirresistentes tornaram-se particularmente importantes como causa das infecções nosocomiais. Entre as espécies Gram positivas, os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são os grandes responsáveis por uma grande percentagem de infecções adquiridas nas unidades de cuidados intensivos (UCIs), por sua vez, entre as espécies Gram negativas, os grandes responsáveis são a *A. baumannii* e a *Pseudomonas aeruginosa* [2].

O crescente número de patogénios multirresistentes leva à necessidade de investigar novos agentes antimicrobianos, que sozinhos ou em conjunto com outros, consigam diminuir a disseminação das infecções nosocomiais.

Capítulo 2 - *Acinetobacter baumannii*

2.1. *Acinetobacter baumannii* - Um patógeno emergente

As espécies de *Acinetobacter* são conhecidas como importantes patógenos oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos [3]. Consequentemente as infecções hospitalares envolvendo *Acinetobacter* têm aumentado ao longo dos últimos anos em todo o mundo, especialmente nas unidades de cuidados intensivos (UCIs) [3, 4]. Como tal, a *A. baumannii* tem vindo a emergir como causa de inúmeras epidemias globais e apresenta taxas crescentes de resistência, havendo relatos de casos de *A. baumannii* multirresistentes em hospitais de todo o mundo [1].

Estudos em todo o mundo descrevem a espécie *A. baumannii* como um dos patógenos mais frequentemente isolados em hospitais, estando associado a graves infecções [5-12]. Várias instituições de saúde também reportaram a bacterémia nosocomial por *A. baumannii* como sendo tão frequente quanto a causada por *Pseudomonas aeruginosa* [13]. Assim, o *A. baumannii* está a emergir como um importante patógeno multirresistente, estando a espalhar-se por várias áreas geográficas [1, 14]. Este patógeno é encontrado em muitos ambientes de cuidados de saúde e é um colonizador humano muito eficaz em hospitais. A sua ampla gama de resistência a antibióticos torna-o um patógeno nosocomial de sucesso, ameaçando a actual era do antibiótico [15].

Em muitos casos, a disseminação de *A. baumannii* deve-se à sua propagação entre pacientes, ou através dos profissionais de saúde [14, 16]. Procedimentos clínicos, nomeadamente a aspiração, lavagem pulsátil [17] e sucção [18] que provocam o arrastamento de microrganismos, podem levar à contaminação e devem ser consideradas como actividades de alto risco para as quais se devem tomar precauções adequadas de controlo de infecção. Para além do seu perfil multirresistente, a *A. baumannii* também tem a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes hospitalares, potencializando a sua capacidade de disseminação nosocomial [3, 19, 20]. Por isso a limpeza dos ambientes tem sido relatada como sendo de grande importância no controlo de tais surtos [19, 21, 22].

Na Europa, as infecções por *A. baumannii* têm sido uma questão clínica muito importante desde o aparecimento dos primeiros surtos de infecções hospitalares no início dos anos 80. Estes surtos, principalmente em Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda, têm sido investigados usando métodos moleculares de tipagem epidemiológica [4, 14, 23, 24]. A transmissão dessas estirpes foi observada entre hospitais, provavelmente através de transferência de pacientes colonizados [11, 13, 25, 26]. A disseminação de *A. baumannii* não se limita aos hospitais dentro de uma cidade, mas também ocorre a escala nacional e

internacional. Na Europa foram identificados três clones diferentes de *A. baumannii*, clones Europeus I, II e III, isolados em hospitais do Norte, Sul e Este da Europa [10]. Também a propagação intercontinental de *A. baumannii* multirresistente foi descrita entre a Europa e outros continentes, possivelmente como consequência das viagens de avião [14, 27]. Estes acontecimentos sublinham a importância de exames adequados de identificação dos microrganismos, assim como a necessidade de isolamento de pacientes transferidos de países com altas taxas de organismos multirresistentes.

Em Portugal há estudos que sugerem a transmissão de *A. baumannii* entre hospitais. Não se sabe o modo preciso de transmissão, mas pacientes transferidos entre hospitais distritais e hospitais centrais ou universitários, podem explicar a aparente disseminação. Considerando o período longo de circulação e a variabilidade dos perfis genómicos de alguns isolados, deve ser considerada a possibilidade de estes estarem associados a um ancestral diferente [11].

É de notar que apesar de ter um elevado impacto clínico em humanos, a *A. baumannii* também causa problemas em outros ambientes. Por exemplo, em animais, esta estirpe já foi isolada e identificada como causa de infecções [28, 29]. Também já foi identificada em vegetais e demonstrou-se que estes podem ser um meio através do qual a *A. baumannii* é introduzida em hospitais e consequentemente a sua associação a infecções hospitalares [30]. Mais recentemente, foi isolada na água uma estirpe de *A. baumannii* possuidora de um gene associado à resistência a carbapenemos, demonstrando que também este meio pode estar associado à disseminação de estirpes multirresistentes desta bactéria [31].

2.2. Aspectos gerais de *A. baumannii*

2.2.1. Taxonomia

O género *Acinetobacter* tem passado por uma ampla revisão taxonómica [32-35]. Tomando por base os mais recentes dados taxonómicos, foi proposto que os membros do género *Acinetobacter* fossem classificados na família *Moraxellaceae*, nova dentro da ordem *Gammaproteobacteria*, que inclui os géneros *Moraxella*, *Psychrobacter* e *Acinetobacter* (Figura 2.1) [34].

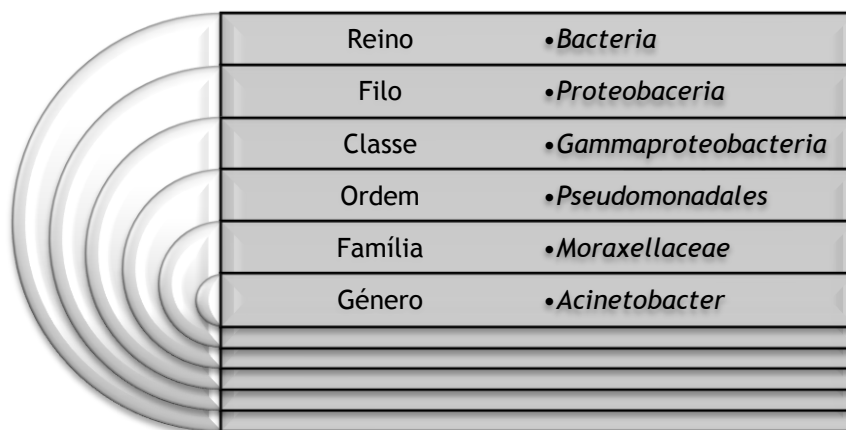


Figura 2.1 - Representação esquemática da classificação taxonômica do gênero *Acinetobacter*.

Pelo menos 32 espécies genômicas já foram descritas, sendo que 14 foram nomeadas e as restantes são classificadas em ordem numérica, associada às iniciais dos autores que as identificaram [15, 25]. Entre as espécies de *Acinetobacter*, existe uma estreita relação entre as espécies genômicas *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, 3 e 13 TU, relatado por Tjernberg e Ursing, sendo por vezes nomeadas como o complexo *A.calcoaceticus-A.baumannii* [32]. A *A. baumannii* é a principal espécie associada a surtos nosocomiais [15, 36].

2.2.2. Caracterização

As bactérias exibem uma estrutura celular bastante simples em comparação com as células eucariotas. Não possuem membrana nuclear, pelo que o seu ADN encontra-se superenrolado formando o nucleóide. Também possuem ADN plasmídico onde se encontram muitos dos genes que conferem resistência aos antibióticos. A maioria das bactérias possui parede celular rígida, responsável pela morfologia das bactérias e pela protecção contra lise osmótica, uma vez que, de modo geral, as bactérias se desenvolvem em meios hipotónicos. O componente da parede celular responsável pela sua rigidez é o peptidoglicano e as diferenças na parede celular, permitem dividir as bactérias em dois grupos, Gram positivo e negativo, consoante o seu comportamento à coloração de Gram. A parede celular das bactérias Gram positivo apresenta-se como uma monocamada espessa justaposta à membrana citoplasmática, na maioria dos casos permeável a macromoléculas não oferecendo resistência à difusão dos antibióticos. Por sua vez, a parede celular das bactérias Gram negativo é muito mais complexa quanto à sua estrutura química e física. Esta é constituída por uma membrana rígida constituída por peptidoglicano e por uma membrana externa, sendo o espaço entre a membrana citoplasmática e a membrana externa denominado periplasma. A membrana externa vai ser um factor limitante à entrada dos antibióticos na célula, podendo ser responsável pela resistência de bactérias Gram negativo a esses agentes [37, 38].

A *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria Gram negativa, aeróbia, com forma de cocobacilos. Apesar de estar descrito que este organismo não apresenta motilidade [36], têm sido apresentados estudos que demonstram que possuem motilidade “*Twitching*”, provavelmente devido à presença de pili [25, 36], num outro estudo também se demonstrou motilidade para uma estirpe de referência *A. baumannii* [39]. Como características bioquímicas é catalase positiva e oxidase negativa e a maioria das estirpes não reduz o nitrato. A sua temperatura óptima de crescimento é entre 33 e 35°C, mas também crescem a 20 e 37°C. Em relação ao pH, consegue desenvolver-se entre pH 5 e 8, mais frequentemente 6.5. Para o seu crescimento podem ser utilizados meios simples contendo apenas uma fonte de carbono e energia, tal como acetato, lactato, piruvato, malato ou α -cetogluturato [36]. A *A. baumannii* cresce bem em meios sólidos que são rotineiramente usados em laboratórios de microbiologia clínica, formando colónias brancas acinzentadas, às vezes mucóides (Figura 2.2) [25, 36].



Figura 2.2 - Aparência de colónias de *A. baumannii* (Imagem obtida em <http://www.acinetobacter.org/>)

Frequentemente saprófita, esta bactéria encontra-se naturalmente no solo, água, esgotos e em alimentos como os vegetais, mas pode, também, colonizar a pele humana, o tracto gastrointestinal e o tracto respiratório superior [36, 40]. Devido aos mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos, também pode sobreviver por períodos muito longos em ambientes hospitalares [19].

2.2.3. Identificação genómica

Alguns dos testes que são normalmente utilizados na rotina dos laboratórios de diagnóstico para identificação de outros géneros bacterianos ao nível de espécie são inadequados para a identificação inequívoca mesmo das espécies mais comuns de *Acinetobacter*. Em particular, a discriminação entre *Acinetobacter baumannii* e as espécies geneticamente semelhantes 3 e 13TU é difícil [14, 25, 36].

Métodos genotípicos, tais como a análise de restrição de ADN ribossomal amplificado e análise do *fingerprint* de todo o genoma obtido pela amplificação selectiva de fragmentos de restrição têm sido úteis para a identificação precisa das espécies, mas estes métodos não são

adequados para uso na rotina de laboratórios de microbiologia clínica de diagnóstico [14, 41]. Recentemente desenvolveram-se métodos para a identificação da *A. baumannii*, através detecção dos genes *bla*_{OXA-51-like} que são intrínsecos a esta espécie. Estes genes têm sido usados em métodos de tipagem baseados em PCR (*polymerase chain reaction*) capazes de identificar diferentes linhagens de *A. baumannii* dentro da espécie [6, 42]. No entanto, devido à sua eficácia, a electroforese de campo pulsado (PFGE do inglês *Pulsed field gel electrophoresis*) continua a ser o método mais eficaz para a subtipagem desta espécie [43].

2.2.4. Manifestações clínicas

A *A. baumannii* embora prevalente na natureza e geralmente considerada como comensal da pele humana e do tracto respiratório humano, também tem sido implicada em doenças infecciosas graves, tais como pneumonia, infecção do tracto urinário, endocardite, infecção em feridas, meningite e septicémia [14, 36, 44-47]. Um pequeno número de casos identificou *A. baumannii* como causa de endoftalmite ou queratite, relacionadas com o uso de lentes de contacto ou após cirurgia ocular [24, 48, 49].

As infecções por *A. baumannii* tendem a ocorrer em pacientes imunodeprimidos, com doenças subjacentes graves, que foram submetidos a procedimentos invasivos e tratados com antibióticos de amplo espectro, pelo que as infecções por este microrganismo são frequentemente encontradas nas UCIs [1, 50, 51]. Assim, para além do referido, os factores de risco para aquisição desta bactéria incluem hospitalização prolongada, pacientes associados a ventilação mecânica, insuficiência respiratória ou cardiovascular, anterior infecção ou terapêutica antimicrobiana e a presença de cateter venoso central ou urinário [3, 20, 50].

2.2.5. Factores de virulência

A *A. baumannii* é identificada como um patogénio oportunista responsável por várias infecções graves, para o qual já foram identificados diversos factores de virulência com um papel importante tanto nos mecanismos de infecção, como nos de colonização. Entre eles, pode-se mencionar:

(i) a aquisição de nutrientes essenciais como o ferro através da segregação de sideróforos [40, 52, 53].

(ii) a capacidade de adesão a células epiteliais através de estruturas semelhantes ao *pilus*. Após a adesão às células, a *A. baumannii* pode induzir a apoptose através da proteína da membrana externa (Omp38) que tem como alvo as mitocôndrias [54-56].

(iii) o efeito imunestimulador do lipopolissacarídeo (LPS). Esta endotoxina pode estimular a citocina pró-inflamatória interleucina-8 e o factor de necrose tumoral alfa, desencadeando uma forte resposta inflamatória [25, 57-59].

(iv) mecanismos de *quorum sensing*, uma vez que se verificou que o *quorum sensing* regula uma vasta gama de mecanismos de virulência em diversos organismos Gram negativos, principalmente na *P. aeruginosa*. Também no *Acinetobacter* foram identificadas quatro moléculas diferentes de sinal *quorum sensing*, indicando que este pode ser um mecanismo central para a auto-indução de múltiplos factores de virulência. [13, 25].

(v) a formação de biofilmes e adesão a superfícies por longos períodos de tempo, uma vez que a estrutura do biofilme formado por esta bactéria aumenta a sua capacidade de resistir a tratamentos antimicrobianos e stresses ambientais [19, 55, 58, 60].

2.3. Resistência a antimicrobianos

A descoberta dos antibióticos foi determinante no controlo de infecções bacterianas diminuindo a sua morbidade e mortalidade. Por esta razão os antibióticos têm sido descritos como os principais fármacos do século XX. Actualmente dá-se a designação de antibióticos às moléculas naturais ou sintéticas que matam ou inibem o crescimento de bactérias, sendo agrupados de acordo com o seu modo de acção na célula bacteriana, a fim de exercerem as suas propriedades antibacterianas. Assim, eles são classificados como antibióticos antiparietais, antimembranares, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese de ácidos nucleicos e antimetabolitos [37, 61, 62]. Na figura 2.3 estão representados os alvos de alguns dos antibióticos mais usados.

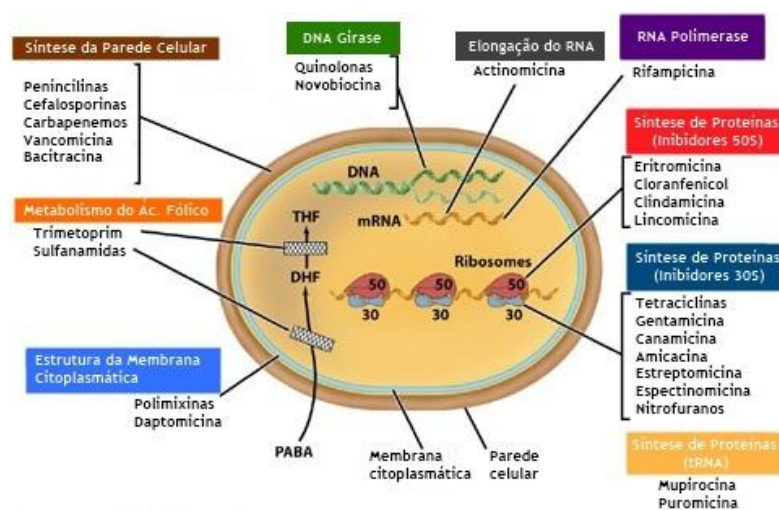


Figura 2.3 - Alvos biológicos de alguns antibióticos (Adaptado de “Manual dos antibióticos” [62]).

Os antibióticos antiparietais, actuam nas diferentes fases da síntese do peptidoglicano, afectando a integridade da parede celular e consequentemente levando à lise celular. Dentro deste grupo encontram-se os antibióticos β -lactâmicos. A permeabilidade da membrana celular é alterada devido aos antibióticos antimembranares. Por sua vez, antibióticos como o cloranfenicol e as tetraciclina exercem o seu efeito através da inibição da síntese proteica, actuando sobre as diferentes subunidades dos ribossomas. As sulfonamidas e o trimetoprim são considerados antibióticos com actividade antimetabolitos dado que inibem cadeias metabólicas fundamentais para a viabilidade da célula bacteriana. Por fim, as quinolonas inibem a acção das topoisomerasas bacterianas que participam no superenrolamento do ADN, inibido a síntese deste [62].

O uso excessivo e inadequado, tanto na medicina humana e animal, assim como na agropecuária, provocou o aparecimento de clones bacterianos multirresistentes aos antibióticos. A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser natural ou adquirida. A resistência natural observa-se em todos os elementos da mesma espécie, independentemente do seu local de isolamento. A resistência adquirida ocorre numa proporção variável de elementos de uma espécie e resulta na aquisição de um ou mais mecanismos de resistência. Mutações em genes específicos ou a aquisição de genes de resistência localizados em ADN móvel, como os plasmídeos de resistência e os transposões, constituem a base dos mecanismos de resistência adquirida [37].

Os mecanismos de resistência adquirida mais frequentes incluem a redução da quantidade de antibiótico que atinge o alvo, modificação parcial do alvo dos antibióticos e inactivação dos antibióticos. Os mecanismos pelo qual é reduzida a quantidade de antibiótico que atinge o alvo devem-se à alteração da permeabilidade celular ou a mecanismos de efluxo. Na sequência de mutações cromossómicas nos genes que codificam os alvos dos antibióticos, é alterada a afinidade para estes alvos. Por fim, a produção de enzimas que degradam os antibióticos, promove a inactivação destes [37, 62].

Assim, tal como descrito anteriormente, devido ao uso indiscriminado dos antibióticos, têm sido relatados diversos mecanismos de resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos convencionais. A rápida emergência global de estirpes de *A. baumannii* resistente a todos os β -lactâmicos ilustra o potencial deste organismo para reagir rapidamente a mudanças no ambiente [1]. Os mecanismos de resistência a β -lactâmicos por *A. baumannii* dividem-se em quatro grupos: hidrólise por β -lactamases (TEM-1, TEM-2, OXA-21, OXA-37 e AmpC); alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBP do inglês *Penicillin-binding proteins*), impedindo a sua acção; alterações na estrutura e no número de porinas, resultando na redução da permeabilidade aos antibióticos através da membrana externa da célula bacteriana e por fim o aumento da actividade das bombas de efluxo que vão diminuir ainda mais a concentração do antibiótico na célula bacteriana [1].

Além das bombas de efluxo, a resistência aos aminoglicosídeos por *A. baumannii* é mediada principalmente por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, nomeadamente, fosfotransferases, acetiltransferases e nucleotidiltransferases. Outros mecanismos de resistência incluem alterações da proteína-alvo ribossomal e o ineficaz transporte do antibiótico para o interior da bactéria [1, 14, 25].

A resistência às quinolonas é frequentemente causada por modificações na estrutura da ADN girase. Estas mudanças resultam numa menor afinidade para a ligação da quinolona ao complexo ADN-enzima. Um segundo mecanismo de resistência envolve mutações cromossómicas dos sistemas de influxo e efluxo. Estas mutações resultam tanto na redução da produção de proteínas específicas da membrana externa que medeiam o influxo das quinolonas, ou na sobre-expressão de sistemas de efluxo, levando à expulsão do antibiótico, ou seja, diminuem a sua acumulação intracelular [1, 25].

Dois mecanismos diferentes de resistência às tetraciclinas por *A. baumannii* têm sido descritos. O primeiro deve-se a bombas de efluxo específicas, TetA e TetB. A TetB determina o efluxo de tetraciclina e minociclina, enquanto a TetA apenas medeia o efluxo de tetraciclina. O segundo mecanismo é a proteína de protecção ribossomal, que protege o ribossoma da acção da tetraciclina [1].

Por fim, a Polimixina B e E (colistina, colistimetato de sódio intravenosa) são os antibióticos peptídicos que têm sido usados no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*. Mas, recentemente tem-se verificado alguns episódios de resistência à colistina, para além de terem sido descritos vários efeitos secundários. O mecanismo de resistência à colistina reside em modificações no LPS de *A. baumannii*, como a acilação, acidificação ou a presença de antígenos que interferem com a ligação do antibiótico à membrana celular [1, 14]. A figura 2.4 resume alguns dos mecanismos de resistência da *A. baumannii*.

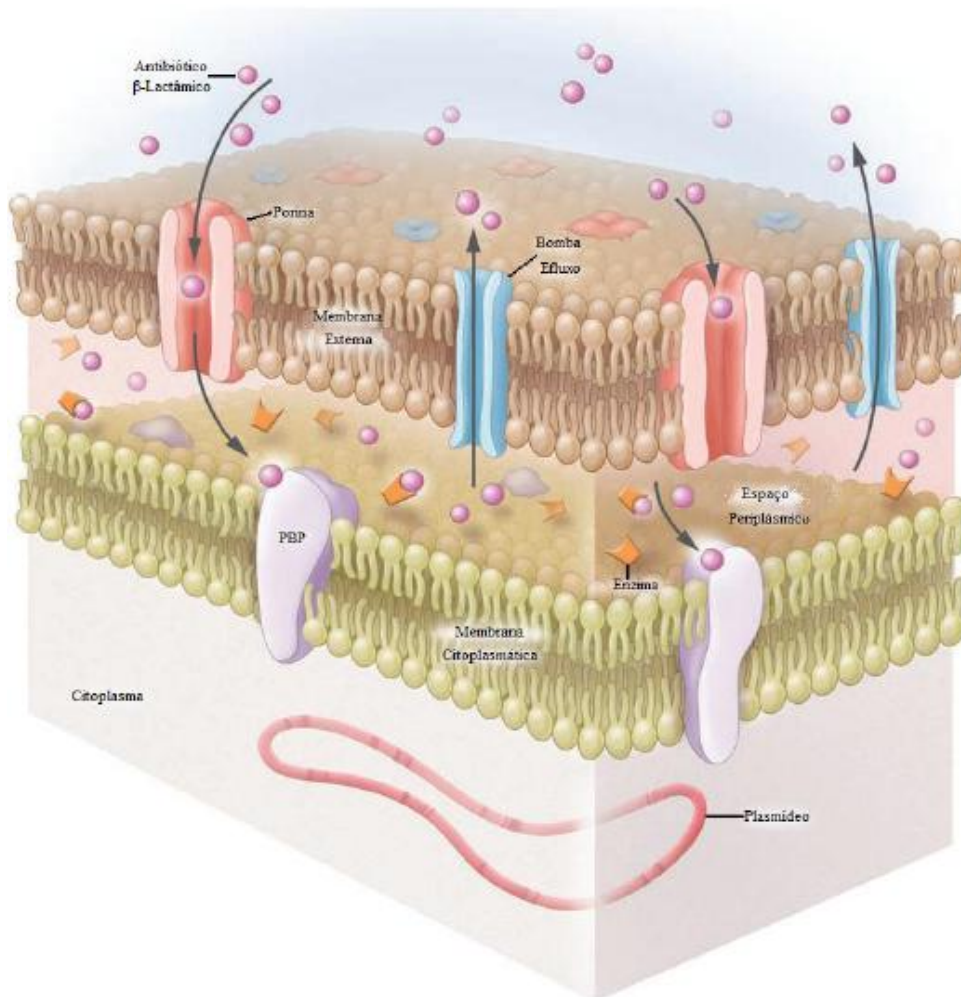


Figura 2.4 - Potenciais mecanismos de resistência antimicrobiana por *A. baumannii*.

2.3.1. Estratégias terapêuticas

Muito poucos dos principais antibióticos são eficazes para o tratamento de graves infecções nosocomiais causadas por *Acinetobacter*, especialmente em pacientes internados nas UCIs [14].

O Sulbactam é usado frequentemente para o tratamento da *A. baumannii*, geralmente como ampicilina/sulbactam, uma vez que o sulbactam por si só não está comercialmente disponível em muitos países [13]. Uma característica que distingue o sulbactam de outros inibidores de β -lactamases disponíveis é a sua actividade antimicrobiana directa contra *Acinetobacter*. No entanto, o surgimento de resistência ao sulbactam tem sido observado em estirpes resistentes ao imipenemo, deixando as polimixinas (colistimetato e polimixina B) como a única alternativa de tratamento. A colistina é rapidamente bactericida e exerce os seus efeitos, agindo como um detergente catiónico. No entanto, em alguns países, este agente antimicrobiano foi abandonado devido aos seus efeitos secundários adversos [14, 25]. Finalmente, a tigeciclina, um derivado da minociclina, é o novo agente com actividade

promissora contra *A. baumannii*. Este antibiótico apresenta um espectro antibacteriano mais amplo que o das outras tetraciclina, no entanto revela efeitos neurotóxicos mais acentuados [13, 62].

Assim, o aumento crescente de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos constitui um problema para a Saúde Pública, obrigando a modificar os métodos tradicionais para o tratamento das doenças infecciosas e tornando urgente a investigação de outras alternativas terapêuticas.

Capítulo 3 - Biofilmes microbianos

3.1. Formação de biofilmes

Na natureza existem microrganismos que aderem e crescem em superfícies inanimadas. Estas superfícies podem assumir muitas formas, incluindo aquelas encontradas no solo e sistemas aquáticos, assim como num elevado número de materiais médicos, como as válvulas cardíacas [63, 64] e os cateteres [28, 63, 65].

A formação de um biofilme envolve um processo pelo qual alguns microrganismos aderem irreversivelmente e crescem numa superfície, produzindo exopolissacarídeos (EPS) que facilitam a fixação e formação da matriz, resultando numa alteração no fenótipo dos organismos em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes [63, 66]. Assim, pode-se definir um biofilme como uma comunidade microbiana composta por células que estão ligadas a uma interface e incorporadas numa matriz de EPS [67, 68].

A capacidade do *A. baumannii* aderir e formar biofilmes em objectos inanimados e superfícies pode explicar o seu sucesso no ambiente hospitalar [19]. A estrutura do biofilme formado por esta bactéria patogénica também aumenta a sua capacidade de resistir a tratamentos antimicrobianos, bem como outros stresses ambientais tais como a desidratação e a disponibilidade limitada de nutrientes [60]. A formação de biofilme por *A. baumannii* está associada à sua capacidade de produção de EPS e formação de *pilus* [59, 69].

A formação de biofilme depende essencialmente das características da superfície de adesão, das células bacterianas envolvidas, dos meios de crescimento e das condições ambientais [67, 70]. O processo de formação de biofilmes ocorre em duas etapas principais: a adesão ao substrato e o seu desenvolvimento. Após o seu desenvolvimento estes podem-se propagar através de pequenas células ou grandes aglomerados que se desprendem do biofilme. Isto permite que as bactérias possam aderir a uma superfície ou a um biofilme próximo da comunidade original (figura 3.1) [66].



Figura 3.1 - Imagem representativa dos passos de adesão, desenvolvimento e dispersão de um biofilme. (Adaptado de http://biofilmbok.hypertextbookshop.com/public_version-2010-03-16/)

- **Adesão ao substrato**

A primeira fase na formação de biofilme depende das propriedades tanto do substrato, como da superfície das células. Os substratos variam entre materiais muito hidrofóbicos, tais como látex e silicone, até materiais hidrofílicos, como vidro e metais. Certos materiais são bastante rugosos (por exemplo, tubos de água e superfícies ambientais), enquanto outros são muito mais lisos (por exemplo, cateteres de silicone). Estas características do substrato têm um efeito significativo sobre a taxa de adesão dos microrganismos, sendo que, os materiais mais rugosos e hidrofóbicos desenvolvem biofilmes mais rapidamente. Além das características do substrato, as características da superfície celular dos microrganismos também são importantes. Por exemplo, a presença de flagelos, pili ou fímbrias pode afectar a taxa de adesão microbiana. Isto ocorre porque as células microbianas, uma vez atraídas para a superfície, têm que ultrapassar as forças repulsivas comum a todos os materiais, e estes apêndices ajudam a célula a permanecer ligada [63, 68].

- **Desenvolvimento do biofilme**

Após aderirem a uma superfície, os microrganismos sofrem processos de adaptação à vida numa superfície. As células que se ligam de forma irreversível à superfície começam a divisão celular, formando microcolónias e produzindo polímeros extracelulares, os EPS, que definem um biofilme. Os EPS fornecem a estrutura ou matriz para o biofilme, que é altamente hidratado (98% de água) e fortemente ligado à superfície subjacente [66]. Esta etapa final é regulada essencialmente por sinais amplamente conservados, como o *quorum sensing* [66]. O *quorum sensing* é uma estratégia de comunicação entre as células que beneficia a comunidade celular no biofilme, através do controlo do crescimento da população e da competição por nutrientes [60, 70, 71].

Os biofilmes desenvolvidos têm características arquitectónicas complexas [72]. Um biofilme tem a forma de “cogumelo” sendo formado por microcolónias que são cercadas por uma matriz de EPS e separadas por “canais de água” que permitem o transporte de nutrientes e oxigénio para as células que crescem no biofilme. Os biofilmes funcionam como uma espécie de agentes filtrantes que prendem partículas de vários tipos, incluindo minerais e componentes do hospedeiro tais como fibrina, eritrócitos e plaquetas [63, 66, 73].

3.2. Resistência a antimicrobianos

A estrutura do biofilme e as características dos microrganismos que o formam, confere uma resistência inerente aos agentes antimicrobianos, como antibióticos e desinfectantes [63].

O efeito na susceptibilidade pode ser intrínseco (inerente ao modo de crescimento do biofilme) ou adquirido (causado pela aquisição de plasmídeos de resistência). Existem pelo menos três razões para a resistência antimicrobiana intrínseca nos biofilmes. Primeiro, os agentes antimicrobianos devem difundir através da matriz de EPS para ter contacto ou inactivar os organismos dentro do biofilme. Esta matriz retarda a difusão do agente antimicrobiano, tanto por reacção química com as moléculas do agente, como por limitação da sua taxa de transporte. Segundo, os organismos associados ao biofilme têm taxas de crescimento reduzidas, minimizando a velocidade a que o agente entra nas células e portanto afectando a cinética de inactivação. Por fim, o ambiente que rodeia as células dentro do biofilme pode fornecer condições para a protecção dos organismos [63, 67]. Em relação à resistência adquirida, estudos mostram que os plasmídeos podem ser trocados nos biofilmes em diversas condições. Estes plasmídeos podem codificar resistência para vários agentes antimicrobianos, como β -lactâmicos e aminoglicosídeos e demonstrou-se que várias espécies de bactérias conseguem transferir plasmídeos para outras espécies. A razão da transferência de plasmídeos nos biofilmes pode dever-se à elevada probabilidade de contacto entre as células bacterianas que o constituem [63, 66].

3.3. Controlo de biofilmes

A capacidade dos microrganismos para desenvolver biofilmes em dispositivos está bem documentada. Este processo é particularmente relevante, pois os microrganismos associados a biofilmes são muito mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que os organismos planctónicos, levando geralmente a infecções difíceis de controlar. Embora os mecanismos de formação e resistência dos biofilmes tenham vindo a ser alvo de investigação pela comunidade científica, torna-se necessário desenvolver formas de controlar e tratar infecções provocadas por organismos associados a biofilmes [63, 67].

Muitas infecções da corrente sanguínea e do tracto urinário estão associados a implantes médicos invasivos e, portanto na maioria dos casos, associados a biofilmes. A estratégia mais eficaz para o tratamento destas infecções pode ser a remoção do dispositivo contaminado com o biofilme [64, 74].

Dado isto, é urgente a investigação de potenciais estratégias de controlo dos biofilmes. Ainda são poucas as moléculas identificadas com actividade antibiofilme, mas recentemente descreveu-se a capacidade de inibição da formação de biofilmes por *A. baumannii*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, por compostos derivados de aminoimidazóis e alcalóides. Nestes estudos, avaliou-se o efeito destes compostos tanto na formação de biofilmes como na sua dispersão e a sua baixa citotoxicidade [75, 76]. Os agentes naturais também têm sido estudados no controlo de biofilmes. O óleo essencial de orégãos foi estudado em duas espécies de *Staphylococcus*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, mostrando-se eficaz tanto na inibição da formação de biofilmes por estes organismos, como na sua erradicação, tendo-se ainda observado que as concentrações necessárias para esta inibição foram duas a quatro vezes superiores às necessárias para inibir o crescimento em células planctónicas [77]. Também para a *Candida albicans* se estudou a actividade do eugenol, um componente fenólico de vários óleos essenciais, mostrando-se a sua potente actividade anti-fúngica contra a formação e dispersão de biofilme formado por este microrganismo. Esta actividade antibiofilme do eugenol deveu-se à inibição do crescimento de filamentos pelas células de *C. albicans*, interferindo com o processo de adesão das células à superfície [78]. Kwiecinski estudou o efeito do óleo de *Melaleuca* em biofilmes e células planctónicas de isolados clínicos de *S. aureus*. No seu estudo o autor, observou que as células em fase estacionária foram menos sensíveis ao efeito do óleo que as células em fase exponencial e que para erradicar o biofilme formado por *S. aureus*, foi necessária uma concentração superior à concentração mínima com efeito bactericida em células planctónicas. Os seus resultados mostraram que este óleo essencial pode ser um promissor agente contra *S. aureus*, tanto em biofilmes como em células planctónicas [79].

No entanto, apesar de estar descrito a capacidade de formação de biofilmes por *A. baumannii*, estudos sobre o efeito de compostos naturais contra biofilmes formados por este patogénio são escassos.

Capítulo 4 - Agentes antimicrobianos

4.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos, caracterizados por um odor forte. São conhecidos pelas suas propriedades medicinais e acção bactericida e fungicida, podendo ser utilizados na conservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios [80, 81]. São misturas naturais muito complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes, sendo caracterizados por possuírem dois ou três componentes principais em concentrações bastante altas (20-70%) em comparação com os outros componentes. Geralmente, são estes componentes principais que determinam as propriedades biológicas do óleo essencial [80].

Existem vários métodos para extrair óleos essenciais. Estes podem incluir o uso de dióxido de carbono líquido e destilação a vapor, sendo este último o mais utilizado [80, 82, 83]. Actualmente, são conhecidos cerca de 3000 óleos essenciais, dos quais 300 são comercialmente importantes, principalmente para a indústria farmacêutica, agroalimentar, de cosméticos e perfumes [80, 81]. Para a identificação dos componentes dos óleos essenciais usa-se normalmente a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa [80, 82, 84].

Devido ao crescente interesse por produtos naturais como os óleos essenciais, apesar da sua ampla utilização, é importante desenvolver uma melhor compreensão do seu modo de acção biológico para novas aplicações na saúde humana, agricultura e ambiente [80].

Vários estudos descrevem a actividade antimicrobiana de óleos essenciais contra diversos patogénios. Um estudo avaliou o efeito de dois óleos essenciais (*Thymus vulgaris* e *Eucalyptus globulus*) em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e estirpes de referência de *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Neste estudo confirmou-se a actividade antibacteriana de ambos os óleos contra todas as estirpes estudadas, mostrando que estes óleos essenciais podem ser uma opção de tratamento de infecções por MRSA [85]. Num outro estudo, investigou-se a actividade antimicrobiana de 52 óleos de plantas e extractos contra *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*. Neste estudo observaram que três óleos essenciais (*Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Pimenta racemosa*) inibiram o crescimento de todos os organismos a concentrações inferiores a 2% (V/V), 6 óleos não inibiram o crescimento de nenhum organismo e todos os outros mostraram actividade contra pelo menos um organismo, sugerindo que os óleos essenciais e extractos de plantas podem ser uma alternativa às terapêuticas actuais [86]. Faleiro e seus

colaboradores estudaram a composição química dos óleos essenciais de *Thymus mastichina*, *T. camphoratus* e *T. lotocephalus* de diferentes regiões de Portugal e a sua actividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus*, verificando que os óleos essenciais isolados a partir das espécies de tomilho estudadas demonstraram actividade antimicrobiana contra todos os organismos [87].

4.1.1. Óleo essencial de coentros

O óleo essencial de coentro é obtido por destilação a vapor das sementes de *Coriandrum sativum* L. da família *Apiaceae*. Este óleo essencial é utilizado na indústria agroalimentar, como conservante, na perfumaria e cosméticos como agente aromatizante e na indústria farmacêutica como estomáquico, antiespasmódico e carminativo [80, 88-90]. O óleo essencial de sementes de coentros, tal como os outros, é constituído por um elevado número de componentes, sendo o linalool (68%) o seu principal componente.

Existem vários estudos que relatam a potencial actividade antimicrobiana do óleo de coentros. Num estudo, onde se avaliou o potencial efeito antimicrobiano de 52 óleos essenciais em 10 microrganismos, observou-se que o óleo essencial de sementes de coentros apresentou actividade antimicrobiana contra todos os microrganismos, excepto contra a *P. aeruginosa* [86]. Outro estudo onde se avaliou a actividade antimicrobiana de 12 óleos essenciais em várias estirpes de *Campylobacter jejuni*, um patógeno que causa infecções transmitidas por alimentos, verificou-se que o óleo essencial de sementes de coentros exibiu a mais elevada actividade bactericida contra todas as estirpes testadas [91]. Singh, avaliou a actividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos de 7 espécies de plantas, *Anethum graveolens*, *Carum capticum*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* e *Seseli indicum*, em oito bactérias patogénicas que causam infecções nos humanos, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus vulgaris*. Neste estudo o autor verificou que o óleo essencial de sementes de coentros apresentou actividade contra as 8 bactérias e mostrou-se igual ou mais efectivo quando comparado com alguns antibióticos [81].

Os dados disponíveis sobre a toxicidade do óleo essencial de sementes de coentros são limitados, não havendo estudos sobre o comportamento biológico do óleo, por si só, no corpo humano. Por sua vez, estudos de um dos principais constituintes do óleo, o linalool, em animais demonstraram que este é rapidamente absorvido, metabolizado e excretado do corpo, tendo-se também verificado a sua baixa toxicidade aguda oral e dérmica em animais de laboratório. Em testes em pele humana, verificou-se que tanto o óleo de coentros, como o linalool, não produziu nenhuma irritação [89].

Em resumo, com base no histórico de consumo de óleo de sementes de coentros, sem relatos de efeitos adversos, e a ausência de toxicidade apresentada nos poucos estudos que existem, o uso de óleo de sementes de coentros na indústria alimentar é considerado seguro. Considerando a sua actividade antibacteriana descrito por vários estudos, assim como a sua efectividade igual ou superior aos antibióticos, o óleo essencial de sementes de coentros poderá ser um potencial agente antibacteriano contra *A. baumannii*, tanto no controlo de infecções como na inibição e erradicação de biofilmes formados por este patogénio, no entanto, são necessários mais estudos.

4.2. Sinergismo entre compostos

O rápido aparecimento de estirpes multirresistentes que provocam inúmeras infecções hospitalares em todo o mundo representam uma ameaça para a Saúde Pública. Os antibióticos tornam-se impotentes contra estas estirpes, tornando urgente a pesquisa de novas alternativas terapêuticas [92]. Neste contexto, os agentes bacterianos não tradicionais, como os óleos essenciais, podem ser usados em combinação com os antibióticos de modo a promover uma melhor eficácia no combate às infecções e à resistência aos agentes convencionais [92]. Assim o potencial sinérgico entre os antibióticos e agentes naturais deve ser estudado.

Têm sido descritos vários métodos para detectar sinergismo entre dois compostos, no entanto, as curvas de morte e o *checkerboard* são os métodos mais usados. O método *checkerboard* é um método fácil de realizar, porém é apenas um indicador de actividade inibitória. Por sua vez, as curvas de morte permitem observar a actividade bactericida, mas são mais trabalhosas e demoram mais tempo [93]. Assim, a técnica de *checkerboard* é a mais usada para avaliar interacções antimicrobianas *in vitro*. O *checkerboard* permite a variação das concentrações de cada antimicrobiano ao longo dos diferentes eixos, garantindo assim que cada poço contenha uma combinação diferente. Para cada agente calcula-se a concentração inibitória fraccionada (CIF), que é definida como a concentração mínima inibitória (CMI) dos agentes em combinação a dividir pela CMI do agente sozinho (equação 4.1). Os resultados são expressos em termos do índice da concentração inibitória fraccionada (ICIF) que é igual à soma das CIFs para cada agente (equação 4.2) [94].

$$\text{CIF do agente A} = \frac{\text{CMI do agente A em combinação}}{\text{CMI do agente A sozinho}} \quad (4.1)$$

$$\text{ICIF} = \sum \text{CIF} = \text{CIF do agente A} + \text{CIF do agente B} \quad (4.2)$$

Considera-se sinergismo quando o $ICIF \leq 0.5$, sem interação ou indiferença se $0.5 < ICIF \leq 4$ e antagonismo se $ICIF > 4$. Também se podem usar curvas para representar as interações entre os dois agentes. Na figura 4.1, apresenta-se uma representação gráfica dos efeitos de sinergismo, antagonismo e indiferença [94].

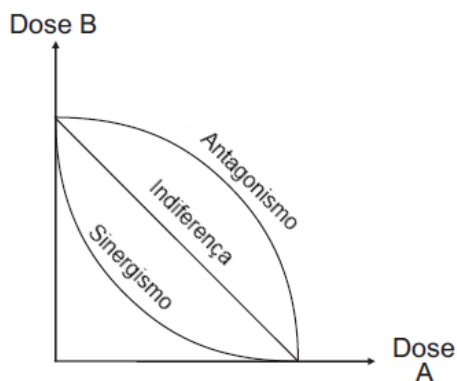


Figura 4.1 - Curvas representativas de sinergismo, indiferença e antagonismo. (Adaptado de Wagner e tal [95])

São vários os estudos que demonstram o potencial terapêutico de combinações de agentes antimicrobianos. Um estudo investigou a efectividade *in vitro* da associação entre a tobramicina e o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em *S. aureus* e *E. coli*, observando uma interacção sinérgica para ambas as estirpes, comprovando que as interacções *in vitro* aumentaram a eficácia do antibiótico podendo contribuir para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos [96]. Também Rosato e colegas, investigaram o possível efeito sinérgico entre um composto anti-fúngico, o Nistatin, e 3 óleos essenciais diferentes (*Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* e *Melaleuca alternifolia*) em várias espécies de *Candidas*. Neste estudo o autor observou sinergismo entre dois dos óleos essenciais e o anti-fúngico, verificando que a associação do agente com o óleo de *M. alternifolia* apenas teve efeito aditivo [97]. Silva e colaboradores investigaram o potencial efeito sinérgico do óleo essencial de sementes de coentros com um anti-fúngico comum, a anfotericina B, em 3 espécies de *Candidas*. Verificou-se sinergismo entre o óleo e o agente anti-fúngico para 2 estirpes de *C. albicans*, enquanto para a estirpe *C. tropicalis* apenas se observou um efeito aditivo [98]. Num outro estudo, investigaram-se as interacções farmacológicas entre quatro óleos essenciais comerciais e antimicrobianos convencionais (ciprofloxacina/anfotericina B) quando usados em combinação. Observou-se que a ciprofloxacina em combinação com os óleos essenciais apresentou principalmente perfis de antagonismo para *S. aureus* e diferentes perfis para *K. pneumoniae*, dependendo das concentrações. A combinação entre os óleos e a anfotericina B teve na sua maioria um efeito antagonista, quando testada em *C. albicans* [99]. Assim, verifica-se que apesar de muitas das combinações entre agentes antimicrobianos naturais e antibióticos terem efeito sinérgico, também existem excepções sendo por isso importantes os estudos de sinergismo.

O potencial uso da combinação de compostos vegetais e antibióticos comerciais contra *Acinetobacter baumannii* foi documentada por várias publicações, como por exemplo, num estudo de alguns dos componentes de gengibre (*Zingiber officinale*) em combinação com a tetraciclina, observou-se uma diminuição da resistência de estirpes clínicas de *A. baumannii* à tetraciclina [100]. Dado isto, torna-se importante o estudo do potencial sinérgico do óleo essencial de sementes de coentros com antibióticos convencionais para *A. baumannii*.

Capítulo 5 - Objectivos

Devido à multirresistência de *Acinetobacter baumannii* a agentes antimicrobianos e à sua capacidade de formar biofilmes em ambientes hospitalares este é um importante patógeno associado a infecções nosocomiais. Deste modo, os principais objectivos deste trabalho foram:

- Estudar a motilidade e capacidade de formação de biofilmes de isolados clínicos de *A. baumannii* com resistências múltiplas a antibióticos convencionais.
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum* sobre *A. baumannii* quer em células planctónicas quer em biofilmes, assim como o eventual efeito sinérgico entre antibióticos e o óleo essencial.
- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de sementes de *Coriandrum sativum* sobre eritrócitos humanos.

Capítulo 6 - Materiais e Métodos

6.1. Microrganismos

Neste trabalho utilizaram-se duas estirpes de referência de *Acinetobacter baumannii* (LMG 1025 isolada de líquido cefalorraquidiano de um caso de meningite e LMG 1041 isolada de urina), obtidas da colecção BCCM/LMG *Bacteria collection* (Gent, Bélgica). Além das estirpes de referência foram utilizadas 36 estirpes clínicas de *Acinetobacter baumannii* isoladas entre Julho de 2010 e Maio de 2011 no Hospital Cova da Beira (Covilhã, Portugal).

6.2. Conservação das estirpes

Após crescimento *overnight* das estirpes em placas com meio *Luria-Bertani* (LB) Agar, inóculou-se uma colónia em 20mL de meio LB *broth* e procedeu-se ao seu crescimento a 37°C e 250 rotações por minuto (rpm). Quando a densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) foi igual ou superior a 0.6, adicionou-se glicerol de modo a obter uma concentração final de 20%. Procedeu-se à distribuição da suspensão para tubos criogénicos estéreis e armazenaram-se a -80°C. Anteriormente a cada ensaio, cada estirpe foi inoculada em meio LB agar para a obtenção de uma cultura pura.

6.3. Agentes antimicrobianos

Os antibióticos utilizados foram a Cefoperazona (sal sódico), Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina (sal de sulfato), Piperacilina (sal sódico) e Tetraciclina (hidroclorato), que se apresentam na tabela 6.4.

O óleo comercial de sementes de coentros extraído por destilação a vapor foi obtido na Sigma-Aldrich. A análise cromatográfica do óleo essencial foi realizada num cromatógrafo gasoso Simadzu GC-17A equipado com detector de massas selectivo QP 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Usou-se uma coluna capilar DB-5 (30m×0.25mm i.d. e 25µm de espessura de filme) seguindo o programa de temperatura: manteve-se uma temperatura inicial de 50°C durante 5 minutos; depois elevou-se a temperatura de 50 a 180°C a uma velocidade de 2°C/min e manteve-se durante 20min. A temperatura, tanto da porta de injeção como da linha de transferência foi fixada em 230°C. Adoptou-se o modo de injeção na razão 1:40 e usou-se hélio como fase móvel a uma velocidade constante de fluxo de 1.6 mL/min.

A identificação dos compostos (tabela 6.1) foi baseada na comparação dos índices de retenção e dos espectros de massa obtidos a partir de bases de dados disponíveis.

Tabela 6.1 - Composição química (% de componente) do óleo essencial de sementes de coentros comercial isolado por destilação a vapor a partir de sementes de *Coriandrum sativum*. Abreviações: V, Vestígios (<0.05%).

Composto	Porcentagem no total (%)
Triciclono	V
α -tujeno	V
α -pineno	4.04
Canfeno	0.83
β -pineno	0.28
6-metil-5-heptan-2-ona	V
Mirceno	0.32
6-metil-5-heptan-2-ol	V
p-cimeno	4.54
Limoneno	1.78
1,8-cineol	0.08
Óxido trans-linalool (furanóide)	3.12
Óxido cis-linalool (furanóide)	2.76
Linalool	64.38
Cânfora	4.88
Borneol	0.47
Óxido trans-linalool (piranóide)	0.33
Terpinen-4-ol	0.14
p-cimenol	0.12
α -terpineol	0.33
3E-hexenilbutanoato	0.36
3-decanol	0.1
Trans-carveol	0.06
Nerol	0.06
Neral	0.06
Geraniol	1.56
Geranial	0.21
1-decanol	0.14
isobornil acetato	0.14
8-hidroxilinalool	0.12
Geranil formato	V
Cis-pinocarvil acetato	0.12
Neril acetato	0.06
Geranil acetato	5.82
Dodecenal	0.05
Ciclogeranil acetato	0.06
Total identificado	97.5

6.4. Actividade antimicrobiana

6.4.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Para avaliar a susceptibilidade de *Acinetobacter baumannii* a agentes antimicrobianos convencionais e ao óleo essencial em estudo (*Coriander sativum*) usou-se o teste de microdiluição em meio líquido para bactérias, tal como recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) na norma M7-A6 [101]. Todos os testes foram realizados em meio *Müller Hinton Broth* (MHB) suplementado com dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração final máxima de 2% (V/ V)) para aumentar a solubilidade do óleo. Realizaram-se diluições sucessivas (1:2) do óleo essencial de sementes de coentros num intervalo de 32-0.25 µL/mL, numa placa de 96 poços com volume final de 50µl por poço. As bactérias foram repicadas em meio sólido LB e incubadas durante 24 horas a 37°C. Após o crescimento as bactérias foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%), acertou-se a densidade óptica a 0.5 Unidades de McFarland e fez-se uma diluição 1:100 em meio MHB. A suspensão bacteriana diluída foi adicionada a cada poço, obtendo-se uma concentração final de 5×10^5 unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL). Os poços sem inóculo foram usados como controlo de crescimento negativo e os poços sem óleo como controlo de crescimento positivo. A placa foi incubada durante 16-20h a 37 °C e o crescimento foi avaliado visualmente. A CMI foi definida como a menor concentração de óleo sem crescimento visível. Os ensaios foram efectuados em duplicado realizando-se pelo menos três ensaios independentes.

No caso da determinação da CMI para os antibióticos em estudo, procedeu-se da mesma forma descrita para o óleo, variando as concentrações testadas entre 128-1 µg/mL para a cefoperazona, 8-0.06 µg/mL para a ciprofloxacina, 512-4 µg/mL para o cloranfenicol, 54-0.06 µg/mL para a gentamicina, 64-0.06 para a piperacilina e 8-0.06 para a tetraciclina.

6.4.2. Curvas de morte em células planctónicas

Após o crescimento das bactérias em meio sólido LB durante 24 horas a 37°C, suspendeu-se uma colónia isolada em 5mL de meio LB e incubou-se durante 16h a 37°C e 250rpm. Desta pré-fermentação, retirou-se 200µL e adicionou-se a 20mL de meio LB, colocando-se a incubar a 37°C e 250rpm durante 4 e 10h, estando as células em fase exponencial e estacionária de crescimento, respectivamente. Após as 4 e 10h de incubação leu-se a OD_{600nm} e acertou-se a 0.1 com meio LB. Em tubos de centrífuga de 2mL, prepararam-se 100µL de soluções de óleo essencial com concentração final de 0.125x, 0.25x, 0.5x, 1x e 2x a CMI e adicionou-se 1mL da suspensão celular, resultando numa concentração final de 1×10^7 UFC/mL em cada tubo. A influência do DMSO no crescimento bacteriano foi avaliada comparando o tubo só com o meio de cultura e um com 2% DMSO em meio, funcionando os dois como controlos positivos. Os tubos foram incubados a 37°C sem agitação. A análise da evolução do crescimento foi feita

por recolha de amostra de 20µL após 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 min e 24 horas de incubação, as quais foram utilizadas para a determinação das UFC/mL, conforme descrito por Chen e colaboradores [102]. Resumidamente, numa microplaca de 96 poços adicionou-se 180µL de solução salina a cada poço e adicionou-se os 20µL de amostra à primeira linha (A). Com o auxílio de uma pipeta multicanal realizaram-se diluições sucessivas (1:10) transferindo-se 20µL da linha A para a B, da B para a C e assim sucessivamente. Por fim, utilizando uma pipeta multicanal retiraram-se 10µL de cada poço, inocularam-se em placas com meio sólido LB e incubaram-se durante 24h a 37°C. Os ensaios foram feitos em triplicado.

6.5. Ensaio de sinergismo

Para testar o sinergismo entre o óleo essencial de sementes de coentros e os antibióticos convencionais, utilizou-se a técnica de *checkerboard*. Esta técnica é usada frequentemente para avaliar interações antimicrobianas *in vitro*. O *checkerboard* permite a variação das concentrações de cada antimicrobiano ao longo dos diferentes eixos, garantindo assim que cada poço contenha uma combinação diferente [94]. Prepararam-se duas microplacas: a primeira foi utilizada para realizar as diluições sucessivas do óleo essencial de sementes de coentros na orientação horizontal, na segunda fizeram-se diluições sucessivas do antibiótico a testar no sentido vertical. Ambas as diluições foram feitas em MHB. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, transferiu-se 50µL do antibiótico para a primeira placa onde se encontravam as diluições do óleo com um volume final de 50µL e adicionou-se 50µL de suspensão bacteriana a cada poço de modo a obter-se uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL. A placa foi incubada durante 16-20h a 37°C. Como controlo positivo usou-se um poço apenas com inóculo e como controlo negativo um poço contendo só meio de cultura. As concentrações usadas de óleo e antibióticos foram seleccionadas com base nos valores de CMI previamente determinados. Os resultados do efeito combinado dos antibióticos e óleo essencial foram calculados e expressos em termos do índice da concentração inibitória fraccionada (ICIF), igual à soma das concentrações inibitórias fraccionadas (CIFs) de cada agente. A CIF é definida como a CMI dos agentes em combinação a dividir pela CMI do agente sozinho. Os resultados foram considerados como sinergismo quando o ICIF foi ≤ 0.5 , sem interacção se o índice estiver entre 0.5 e 4 e antagonismo se > 4 [92]. Os testes foram realizados, pelo menos, em três ensaios independentes.

6.6. Biofilmes microbianos

6.6.1. Quantificação da formação de biofilmes

6.6.1.1. Avaliação da formação de biofilmes usando diferentes meios e temperaturas

Analisou-se a variação da formação de biofilme por *A. baumannii* utilizando quatro meios de cultura (LB, LB ¼, LB ¼+0,5% Glucose e M9 Glu/Sup), como descritos na tabela 6.2 e duas temperaturas diferentes (30 e 37°C).

Tabela 6.2 - Composição dos meios testados

Meio	Composição
LB	25g/L de LB broth
LB ¼	6,25g/L de LB broth
LB ¼+0,5% Glucose	6,25g/L de LB broth 0,5% Glucose
Meio M9	6g/L Na ₂ HPO ₄ 3g/L KH ₂ PO ₄ 0,5g/l NaCl 1g/L NH ₄ Cl 2mM MgSO ₄ 0,1mM CaCl ₂ 0,4% Glucose
Meio M9 Glu/Sup	Meio M9 0,4% Glucose 2,5% LB broth

A influência dos meios de cultura foi avaliada pelo método A, enquanto o efeito da temperatura foi avaliado através de dois métodos diferentes, A e B.

• Método A

A quantificação da formação de biofilme em microplacas foi determinada como descrito por Simões L.C., et al [103], com algumas modificações. As bactérias a serem testadas foram repicadas em meio sólido LB e incubadas durante aproximadamente 24 horas a 37°C, para garantir o seu crescimento ótimo e isolamento de colônias. Após o seu crescimento, suspendeu-se uma colônia em 5mL de meio LB e incubou-se durante 16h a 37°C e 250rpm. A partir desta cultura *overnight* de células, preparam-se suspensões bacterianas com uma densidade óptica de 0.01 a 600nm, utilizando para a diluição das células o meio a ser testado. Para promover a adesão das células à placa de poliestireno, adicionou-se 200µL por poço de suspensão bacteriana em microplacas de 96 poços e incubaram-se durante 24h a 30 e 37°C

sem agitação. Após o tempo de incubação o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados, duas vezes, com 200 μ L de solução salina 0,85% para remover as células que não aderiram ao poliestireno. Para fixar o biofilme aderido ao poço adicionou-se 200 μ L de metanol e incubou-se a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período de tempo o metanol foi removido e deixou-se secar os poços. Adicionou-se 200 μ L de cristal de violeta 0,1% durante 5 min. e procedeu-se à lavagem dos poços com NaCl 0,85%, três vezes, para retirar o excesso de corante. Por fim diluiu-se o corante em 200 μ L de ácido acético 33%. A absorvância foi lida a 570nm no leitor de microplacas. Como controlo negativo usou-se apenas meio de cultura. Cada ensaio foi feito em nonoplicado realizando-se três ensaios independentes.

• Método B

O segundo método utilizado para comparar o efeito da temperatura na formação de biofilmes foi descrito por Huigens R.W. e seus colaboradores [75, 76]. Tal como descrito anteriormente, as bactérias foram repicadas em meio sólido LB e incubadas durante aproximadamente 24 horas a 37°C. Após o seu crescimento, suspendeu-se uma colónia em 5mL de meio LB e incubou-se durante 16h a 37°C e 250rpm. A partir desta cultura, preparam-se suspensões bacterianas com OD_{600nm} igual a 0.01, utilizando meio LB para realizar as diluições necessárias. A cada poço de uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 100 μ L de suspensão e incubou-se a 30 e 37°C durante 24h, para promover a adesão de células ao material. Aos poços utilizados como controlo negativo apenas se adicionou 100 μ L de meio de cultura. Após o tempo de incubação procedeu-se à quantificação do biofilme através do método do cristal de violeta. O meio foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com solução salina. Deixaram-se secar os poços e adicionou-se 100 μ L de cristal de violeta 0.1% durante 30min. Após este tempo retirou-se o corante e lavaram-se os poços, três vezes, com solução salina. Solubilizou-se o corante com 200 μ L de etanol 95%, transferiu-se 125 μ L de cada poço para outra microplaca e leu-se a absorvância a 570nm. Os ensaios foram feitos em nonoplicado e realizaram-se três ensaios independentes.

6.6.1.2. Avaliação da formação de biofilme por estirpes clínicas de *A. baumannii*

Para avaliar a capacidade de formação de biofilme por estirpes clínicas de *A. baumannii* procedeu-se de acordo com o método B, proposto por Huigens R.W. e seus colaboradores [75, 76], descrito no ponto 6.6.1.1. Os ensaios foram feitos em octoplicado para cada estirpe e realizaram-se três ensaios independentes.

Analysaram-se os dados e a formação de biofilme foi quantificada segundo descrito por Simões L.C., et al [103] como:

- Não produtor de biofilme (0): $OD \leq OD_c$;
- Fraco produtor de biofilme (+): $OD_c \leq OD \leq 2xOD_c$
- Moderado produtor de biofilme (++) : $2xOD_c \leq OD \leq 4xOD_c$;
- Forte produtor de biofilme (+++) : $4xOD_c \leq OD$.

Sendo o OD_c definido como a média da OD do controlo negativo mais três desvios-padrão.

6.6.2. Efeito do óleo essencial de sementes de coentros nos biofilmes

6.6.2.1. Análise do efeito do óleo essencial na formação do biofilme

Para avaliar o efeito do óleo essencial na formação do biofilme pelas duas estirpes de referência, LMG 1025 e 1041, de *A. baumannii* procedeu-se de acordo com Huigens R.W., et al. [75, 76]. Testaram-se as potenciais propriedades de anti-adesão do óleo com concentrações finais de 2x, 1x, 0.5x, 0.25x e 0.125x a CMI. Para isso, adicionaram-se 50 μ L do óleo com a concentração desejada a cada poço e juntou-se 50 μ L de suspensão celular com OD_{600nm} 0.02, obtida como descrito no ponto 6.6.1.1. Os poços sem óleo foram considerados como controlo positivo e os poços com meio como controlo negativo. As placas foram incubadas durante 24h a 37°C. Após o tempo de incubação procedeu-se à quantificação do biofilme formado usando o corante cristal de violeta, como descrito pelo método B no ponto 6.6.1.1. Também se avaliou a actividade metabólica das células no biofilme através do ensaio XTT e procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), descritos no ponto 6.6.2.3. Todos os ensaios foram realizados três vezes.

6.6.2.2. Efeito do óleo essencial no biofilme estabelecido

O efeito do óleo essencial sob biofilmes previamente formados foi avaliado. Para promover a adesão das células bacterianas ao poliestireno, procedeu-se como descrito pelo método B no ponto 6.6.1.1. Resumidamente, a partir de uma cultura bacteriana *overnight*, preparou-se o inóculo com OD_{600nm} igual a 0.01 em meio LB. Adicionou-se 100 μ L de inóculo a cada poço, ao controlo negativo adicionou-se 100 μ L de meio e incubou-se a placa a 37°C durante 24h. Após este tempo de incubação, o meio foi removido e os poços lavados com solução salina duas vezes. A cada poço adicionou-se 100 μ L de óleo com as concentrações de 2x, 1x, 0.5x, 0.25x e 0.125x a CMI, aos poços controlo adicionou-se 100 μ L de meio e incubou-se durante 4, 8h e 24h a 37°C [75, 76]. Após a incubação realizou-se a quantificação com cristal de violeta, como descrito no método B em 6.6.1.1, e também o método XTT e o método de contagem de UFC, descritos no ponto 6.6.2.3. Os ensaios foram realizados em triplicado.

6.6.2.3. Métodos analíticos para testar o efeito do óleo essencial nos biofilmes

- Método XTT

Com o objectivo de avaliar a actividade metabólica das células viáveis dos biofilmes de *A. baumannii* LMG 1025 e 1041, realizou-se o método XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfófenil)-5-fenilamnocarbonil-tetrazolium)). Baseado neste método, determinou-se o efeito do óleo essencial de sementes de coentros nos biofilmes microbianos. Para isso, após exposição ao óleo, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina e adicionou-se 100µL de uma solução contendo 200mg/L de XTT e 20mg/L de PMS (*phenazine methosulphate*) a cada poço. As placas foram incubadas durante 3h a 37°C no escuro. Após isto, leu-se a absorvência a 492nm [104].

- Contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) no biofilme

Para avaliar o efeito do óleo essencial nos biofilmes, procedeu-se à contagem das UFC/mL nos mesmos. Após a exposição ao óleo, os poços foram lavados duas vezes e adicionou-se 100µL de solução salina a cada poço. Os poços foram raspados e o conteúdo de seis poços foi transferido para um tubo de centrifuga de 2mL. Centrifugaram-se as amostras a 4°C e 9500g, durante 10 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL de solução salina e submeteu-se a amostra a 5 segundos de sonicação na amplitude mínima da sonda. Após a sonicação realizaram-se diluições sucessivas das amostras [102], como descrito em 6.4.2., após isto com o auxílio de uma pipeta multicanal inocularam-se 10µL de cada poço em placas com meio sólido LB e incubaram-se durante 24h a 37°C. Após o tempo de incubação determinaram-se as UFC/mL [104]. Os ensaios foram feitos em triplicado.

6.6.3. Análise do efeito do óleo no biofilme estabelecido por microscopia electrónica de varrimento

Para visualizar o efeito do óleo no biofilme já formado, analisou-se a morfologia do biofilme através de microscopia electrónica de varrimento. O biofilme foi formado sobre quadrados de poliestireno 1x1cm. Estes quadrados foram mergulhados durante 24h em etanol puro para serem esterilizados e depois foram colocados no fundo de placas de 24 poços. A cada poço adicionou-se 1mL de suspensão celular, obtida como nos ensaios anteriores, pelo método B (ponto 6.6.1.1) e incubou-se durante 24h a 37°C, para promover a adesão das células aos quadrados de poliestireno. Após o período de incubação o meio foi descartado e o biofilme lavado duas vezes com solução salina. Adicionou-se 1mL de óleo com concentrações de 1x, 0,5x e 0,125x a CMI a cada poço e um poço apenas com 1mL de meio foi considerado como controlo positivo. A placa foi incubada a 37°C durante 24h. Após este tempo procedeu-se como descrito por Tomaras, et al, [105]. O meio foi removido e os poços foram cuidadosamente lavados com água estéril. Os quadrados de poliestireno com o biofilme foram

retirados cuidadosamente dos poços e colocados em 2,5% de glutaraldeído em tampão 0,05M de cacodilato de sódio e incubados a temperatura ambiente durante 2h. Após a fixação as amostras foram desidratadas usando gradiente de etanol (25, 50, 70, 90 e 100%) e colocadas num exsiccador durante 24h para secagem. As amostras foram então montadas em suporte de alumínio, revestidas com ouro e examinadas num microscópio de varrimento electrónico (Hitachi S-2700).

6.7. Testes de motilidade

Para testar a motilidade celular sob uma superfície semi-sólida utilizaram-se placas de *Swimming* (10g/L de Triptona, 5g/L de NaCl e 0,3% de agar) [106]. As bactérias foram repicadas em meio sólido LB e incubadas durante 24 horas a 37°C. Suspendeu-se uma colónia em 5mL de meio LB e incubou-se a 37°C e 250rpm até se obter OD_{600nm} de 0.3. As placas foram inoculadas com 3µL de inóculo, fechadas com parafilme para evitar a desidratação do meio e incubadas durante 24h a 37°C. Após o tempo de incubação o crescimento foi medido com o auxílio de uma régua e as placas foram fotografadas no transiluminador (UVITEC, Cambridge). Os ensaios foram realizados em triplicado [39].

6.8. Ensaio de hemólise e hemaglutinação

Para analisar o efeito do óleo essencial de sementes de coentros em eritrócitos humanos realizou-se um ensaio de hemólise e hemaglutinação. Após recolha de sangue para um tubo contendo EDTA como anticoagulante, os eritrócitos foram recolhidos por centrifugação durante 10min., a 2000rpm e 20°C, e lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS - *phosphate buffered saline*). Após a última lavagem adicionou-se PBS de forma a obter uma suspensão de 10% (V/V) de eritrócitos/PBS. A suspensão foi então diluída de 1:10 em PBS, originando uma solução de 1%. Numa microplaca de 96 poços de fundo em V, foram feitas diluições sucessivas do óleo essencial de sementes de coentros com volume final de 100µL, às quais se adicionou 100µL da suspensão de eritrócitos em triplicado. Como controlo positivo usou-se Triton X-100 a 1% e controlo negativo PBS e o solvente usado para o composto nas várias diluições. As placas foram incubadas 1h a 37°C. Após a incubação a concentração mais baixa para hemaglutinação foi determinada por observação macroscópica e por microscopia óptica [107]. As placas foram centrifugadas durante 10min. a 2000rpm e 20°C. Do sobrenadante recolheram-se 100µL para uma microplaca de 96 poços com fundo plano e lêu-se a absorvância a 450nm. A percentagem de hemólise foi calculada pela fórmula apresentada na equação 3 [78].

$$\frac{A_{450nm} \text{ amostra com óleo} - A_{450nm} \text{ amostra com PBS}}{A_{450nm} \text{ amostra com Triton} - A_{450nm} \text{ amostra com PBS}} \times 100\% \quad (3)$$

6.9. Análise estatística

Nos ensaios de avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelos isolados clínicos de *A. baumannii* foi realizada a análise estatística dos dados através do teste de independência do Qui-Quadrado usando o Software *SPSS Statistics 17.0* (Chicago, IL, USA), sendo consideradas as variáveis em avaliação como significativamente dependentes quando o valor de prova do teste for $p < 0.05$.

6.10. Equipamento

Para além do material corrente de laboratório, para realizar o trabalho experimental também foram utilizados os equipamentos, apresentados na tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Características dos equipamentos utilizados

Designação	Marca/modelo
Autoclave	Uniclave/88
Balança analítica	Sartorius
Balança analítica	KERN
Centrífuga refrigerada para <i>ependorfs</i>	Hettich / Mikro 200R
Centrífuga refrigerada	Beckam Coulter/ Allegra X-22R
Densiómetro	Biomérieux
Espectofotómetro	Ultrospec U/V 3000
Estufa (37°C)	Binder
Estufa (30°C)	P Selecta
Incubador orbital	Aralab
Leitor de microplacas	Alfagene / Anthos 2020
Microscópio óptico	Olympus
Microscópio de varrimento electrónico	Hitachi S-2700
Transiluminador	UVITEC

6.11. Reagentes

Ao longo do trabalho experimental foram usados diversos produtos químicos, que se apresentam na tabela 6.4, com os respectivos graus de pureza e fornecedores.

Tabela 6.4 - Lista de reagentes usados ao longo do trabalho experimental

Reagente	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Agar	-	Pronadisa
D-Glucose	99,5%	Sigma-Aldrich
Hidrogenofosfato di-sódico	99%	Sigma-Aldrich
Dihidrogénofosfato de potássio		Panreac
Cloreto de sódio	99,5%	Panreac
Cloreto de Amónio	99,5%	Sigma-Aldrich
Sulfato de Magnésio	99,5%	Sigma-Aldrich
Cloreto de Cálcio	93%	Sigma-Aldrich
LB agar	-	Pronadisa
LB broth	-	Sigma-Aldrich
Triptona	-	Himedia
MHB	-	Liofilchem
Dimetilsulfóxido (DMSO)	99,5%	Sigma-Aldrich
Glicerol	99,5%	Himedia
Cefoperazona	-	Sigma
Ciprofloxacina	-	Fluka
Cloranfenicol	-	Fluka
Gentamicina	-	Sigma
Piperacilina	-	Sigma
Tetraciclina	-	USB
Triton X-100	-	Sigma Aldrich
Gluteraldeido (25%)	-	Fisher
Cacodilato de sódio	98%	ACROS Organics
Metanol	-	VWR
Etanol puro	-	Carlo Erba
Ácido acéptico	99,7%	Panreac
Cristal de violeta	93,5%	Amresco
XTT	90%	Sigma
PMS	90%	Sigma

Capítulo 7 - Resultados e Discussão

7.1. Actividade antimicrobiana

Como a sensibilidade e resistência dos microrganismos a agentes antimicrobianos está constantemente a mudar torna-se necessário analisar os padrões de susceptibilidade dos organismos contra agentes antimicrobianos convencionais e avaliar possíveis alternativas. A menor concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento do organismo a ser testado é conhecida como a concentração mínima inibitória (CMI). Os ensaios para determinar a CMI podem ser realizados em agar ou em meio líquido. O método tradicional de determinação da CMI é através da técnica de diluição em meio líquido, onde diluições do agente a testar são incorporadas no meio de cultura em poços de microplacas ou em tubos de cultura. Cada tubo ou poço contém uma concentração diferente do antimicrobiano e é inoculado com o organismo que está a ser testado. Após incubação adequada, a menor concentração que não apresenta crescimento visível a olho nú é considerada como a CMI [101, 108]. O efeito de um agente antimicrobiano também pode ser expresso como a taxa de morte para uma determinada concentração de agente sob condições controladas. Esta taxa é determinada através da medição do número de bactérias viáveis em intervalos de tempo diferentes. A representação gráfica resultante é conhecida como “curva de morte” [94].

Neste trabalho, como alternativa aos antibióticos convencionais, devido ao aumento da resistência de *Acinetobacter baumannii* a estes, examinou-se a actividade do óleo essencial de sementes de coentros comercial como um agente alternativo contra duas estirpes de referência deste microrganismo (LMG 1025 e LMG 1041). Os resultados dos ensaios realizados para determinar a CMI para o óleo essencial, assim como, para os antibióticos testados estão apresentados na tabela 7.1. No que diz respeito aos antibióticos testados, estes foram escolhidos tendo em conta os seus diferentes mecanismos de acção, pois pretendeu-se avaliar posteriormente o potencial efeito sinérgico com o óleo essencial de sementes de coentros. Seguindo os critérios de interpretação do CLSI [101], ambas as estirpes de referência apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos avaliados (Tabela 7.1) tendo-se verificado que ambas as estirpes apresentam resistência ao cloranfenicol.

Tabela 7.1 - Concentração mínima inibitória ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial e dos agentes antimicrobianos convencionais ($\mu\text{g}/\text{mL}$) contra duas estirpes de referência de *Acinetobacter baumannii*.

	CMI	
	<i>A. baumannii</i> LMG 1025	<i>A. baumannii</i> LMG 1041
Óleo essencial de sementes de coentros	1	4
Cefoperazona	32 (I)	64 (R)
Cloranfenicol	32 (R)	64 (R)
Ciprofloxacina	0.125 (S)	0.25 (S)
Gentamicina	0.25 (S)	8 (I)
Piperacilina	16 (S)	32 (I)
Tetraciclina	0.5 (S)	1 (S)

R- resistente, I-intermediário, S-sensível - Classificação de acordo com a norma M7-A6 da CSLI [101].

Por análise dos resultados obtidos, verificou-se que o óleo apresentou actividade antibacteriana contra ambas as estirpes de *Acinetobacter baumannii*, com valores de CMI de 1 e 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, respectivamente. Hammer e seus colaboradores que avaliaram a actividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais contra *A. baumannii* [86], quando testado o óleo essencial de coentros comercial (Sunspirit Oils Pty Ltd) obtido a partir de sementes do *Coriandrum Sativium* contra a estirpe de referência de *A. baumannii* (NCTC 7844), obteve uma CMI de 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o que se encontra de acordo com os resultados obtidos. O óleo testado pelo autor, também exerceu efeito antibacteriano similar contra *Aeromonas sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*, não tendo sido possível determinar a CMI contra *Pseudomonas aeruginosa* no intervalo de concentrações testado. Nesse mesmo trabalho, foram avaliados um total de 37 óleos essenciais, como o de cedro, lima e gengibre. Apenas 5 dos óleos essenciais testados contra *A. baumannii* apresentaram valores CMIs inferiores aos obtidos com o óleo de coentros, evidenciando assim o elevado potencial antimicrobiano do óleo essencial de sementes de coentros [86]. A actividade antibacteriana do óleo em estudo também já foi demonstrada sobre outras bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurim*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, variando as CMIs entre 2 e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ [84].

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos descritos por outros autores, que ao avaliar a susceptibilidade de estirpes de referência de *A. baumannii* a diversos antibióticos, usando antibióticos comuns aos usados neste estudo, verificaram que o *A. baumannii* ATCC

17978 apresentou sensibilidade a ciprofloxacina, gentamicina, piperacilina e tetraciclina, enquanto a estirpe ATCC 19606, apenas foi sensível a ciprofloxacina [109, 110].

Os agentes antibacterianos podem ser divididos em dois grupos de acordo com o seu modo de acção entre bacteriostático que inibem o crescimento do organismo e bactericidas que matam o organismo [111, 112]. Considerando as vantagens e desvantagens dos dois modos de acção dos agentes antimicrobianos, torna-se essencial a avaliação deste parâmetro para o óleo de semente de coentros contra as estirpes de *Acinetobacter* em estudo. Assim, após a determinação da CMI, avaliou-se o efeito de várias concentrações do óleo ao longo de 24h de crescimento, em células planctónicas de *A. baumannii* em fase exponencial (Figura 7.1) e estacionária (Figura 7.2).

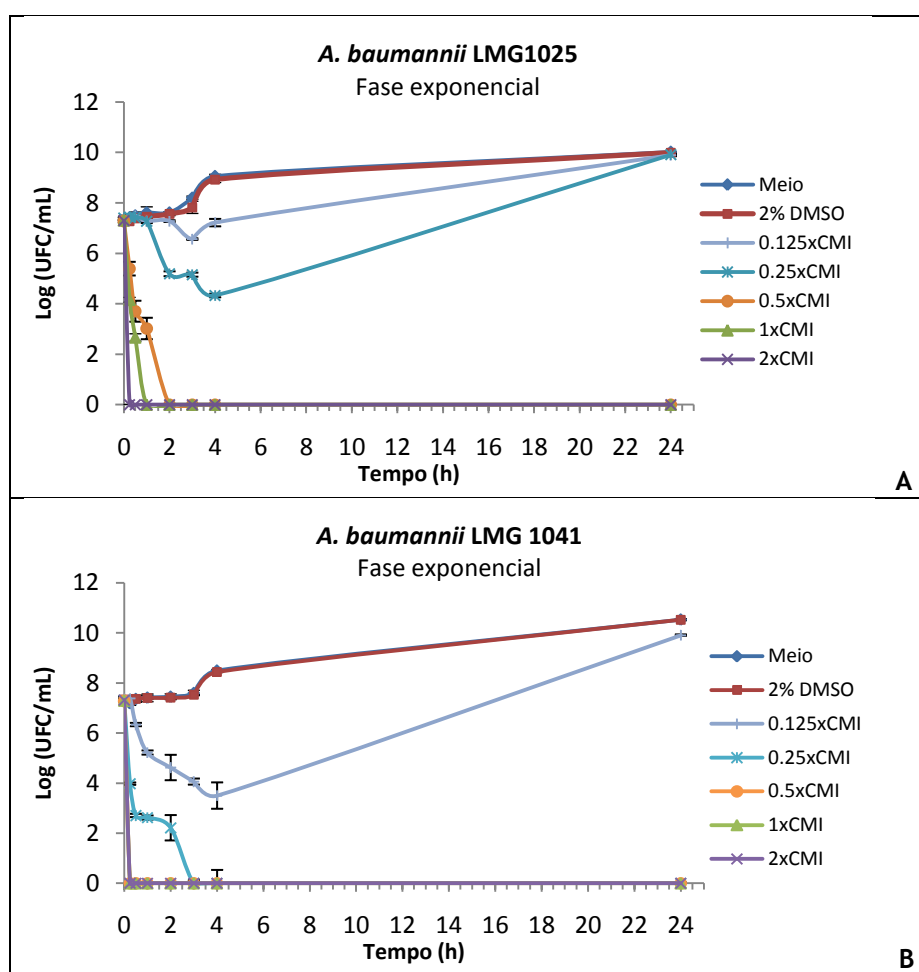


Figura 7.1 - Representação gráfica das curvas de morte do óleo essencial de sementes de coentros contra células planctónicas em fase exponencial de crescimento de duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG1025 e LMG 1041, A e B respectivamente.

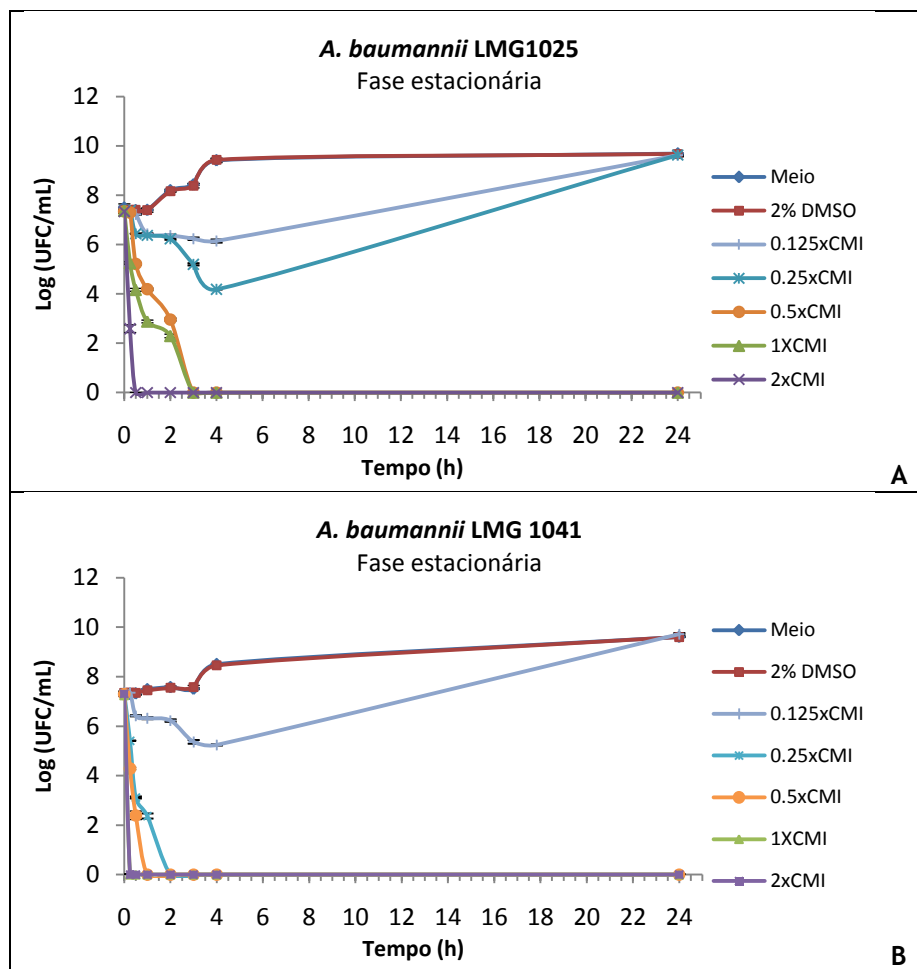


Figura 7.2 - Representação gráfica das curvas de morte/inibição do óleo essencial de sementes de coentros contra células planctónicas em fase estacionária de crescimento de duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG1025 e LMG 1041, A e B respectivamente.

Como se pode ver pelas figuras, tanto em células em fase exponencial, como em fase estacionária observou-se que a CMI do óleo sobre ambas as estirpes exerce um efeito bactericida, sendo a concentração de 0.5µL/mL, a mínima a exercer este efeito, correspondendo a 0.5 e 0.25 vezes a CMI para *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, respectivamente.

Como utilizando esta metodologia se obtiveram efeitos bactericidas do óleo para concentrações inferiores às da CMI, previamente determinada, foi necessário perceber estes resultados. Uma possível explicação pode residir no facto de o óleo essencial testado ser constituído por um grande número de compostos voláteis, assim é possível que na determinação da CMI, realizada em microplaca, alguns componentes com forte actividade antibacteriana tenham volatilizado, levando à diminuição da actividade do óleo, quando comparada com os ensaios das curvas de morte. A volatilização de alguns componentes poderá ter ocorrido em microplaca e não nos tubos de centrífuga de 2mL, onde se realizaram os ensaios para as curvas de morte, uma vez que estes encontram-se fisicamente fechados

durante o ensaio, não permitindo a volatilização dos componentes do óleo. Para comprovar esta hipótese realizaram-se os ensaios de determinação da CMI fechando-se a placa com parafilme durante o tempo de incubação, obtendo-se CMI inferiores às obtidas segundo o procedimento descrito pela norma, sendo os valores de 0.25 e 1µL/mL para a estirpe LMG 1025 e 1041, respectivamente. Também é necessário referir que os inóculos utilizados para a determinação da CMI e para as curvas de morte são diferentes. Para determinar a CMI usa-se uma suspensão celular realizada a partir de células em placa, enquanto para as curvas de morte usa-se inóculo proveniente de uma cultura de células *overnight* em meio líquido. Todos estes factores poderão estar na origem dos resultados observados.

Nos ensaios realizados com as células em fase exponencial verificou-se que, usando a CMI do óleo, observou-se 100% inibição após 30 minutos de incubação, para a estirpe LMG1025 e após 15 minutos para a LMG 1041. Por sua vez, na concentração 8 vezes inferior à CMI, observou-se um decréscimo no número de células para ambas as estirpes, que após 24h foi restabelecido, aproximando-se dos valores do controlo positivo de crescimento (figura 7.1). Nas células em fase estacionária o efeito foi semelhante, uma vez que utilizando a CMI do óleo, verificou-se inibição total do crescimento após 2h sobre a estirpe LMG 1025 e 15min sobre a LMG1041 (figura 7.2). Com as restantes concentrações de óleo observou-se o mesmo efeito que nas células em fase exponencial. Esta rápida letalidade, muito provavelmente indica que a actividade antibacteriana do óleo essencial de sementes de coentros estará associada à disrupção da parede bacteriana das estirpes de *Acinetobacter* estudadas [113].

Em geral, observou-se que as células em fase exponencial de crescimento foram mais susceptíveis ao óleo essencial que as células em fase estacionária. O mesmo foi verificado por Gustafson, Kwieciński e Longbottom, que estudaram o efeito do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Nos seus estudos, todos verificaram que as células em fase estacionária mostram menos susceptibilidade ao óleo, uma vez que o tempo necessário para o óleo causar efeito bactericida em células em fase estacionária foi maior que em células em fase exponencial. Os autores descreveram que em geral a morfologia e fisiologia das células são diferentes em ambas as fases [79, 114, 115] . No entanto, considerando que na fase estacionária se verificam alterações na composição proteica da membrana celular, na sua fluidez, carga e hidrofobicidade, estas alterações podem estar relacionadas com alteração do efeito do óleo, uma vez que a parede celular é o seu alvo [113].

Os resultados obtidos pelos ensaios das curvas de morte são semelhantes aos descritos por Carson, que estudou o efeito do óleo de *Melaleuca* e de três componentes (1,8-cineole, terpinen-4-ol e α -terpineol), também existentes no óleo essencial de sementes de coentros, em *Staphylococcus aureus*. Nesse estudo, Carson verificou diminuição das UFC/mL para metade das iniciais, após 9min, com os três componentes do óleo, comuns ao óleo de sementes de coentros [116]. Também Kubo e os seus colaboradores, descreveram o efeito

bactericida de alguns componentes do óleo essencial de sementes de coentros contra *Salmonella choleraesuis*, verificando-se letalidade na primeira hora [113]. Dada a elevada heteroginicidade do óleo essencial de sementes de coentros são necessários mais estudos semelhantes ao de Carson [116], onde se estude as propriedades antimicrobianas não só do óleo essencial mas também dos seus constituintes. No entanto, como demonstrado neste estudo, a rápida e efectiva capacidade bactericida do óleo essencial de sementes de coentros torna-o um potencial agente antibacteriano contra infecções causadas por *A. baumannii*.

O DMSO foi utilizado tanto na determinação da CMI, como nas curvas de morte, para aumentar a solubilidade do óleo. Em ambos os casos não se verificou influência deste nos resultados. Como mostrado na figura 7.1 e 7.2, o controlo do DMSO (2% de DMSO), tem efeito sobreponível ao controlo de crescimento da bactéria com meio.

7.2. Ensaio de sinergismo

O potencial uso da combinação de compostos vegetais e antibióticos comerciais contra *Acinetobacter baumannii* foi documentada por várias publicações pelo que se torna pertinente o estudo do potencial sinérgico do óleo essencial de sementes de coentros com antibióticos convencionais. Para este estudo foram seleccionados antibióticos com diferentes alvos celulares e diferentes mecanismos de resistência. A cefoperazona pertence ao grupo das cefalosporina de 3ª geração e a piperacilina às penicilinas, no entanto ambos actuam através da ligação às proteínas de ligação à penicilina localizadas na parede celular, causando inibição da sua síntese. O cloranfenicol liga-se à subunidade ribossomal 50S inibindo a acção da transpeptidase e consequentemente a síntese proteica. A ciprofloxacina pertence à classe das fluoroquinolonas e inibe a acção das topoisomerasas bacterianas, enzimas que participam no superenrolamento do DNA, tornando possível o seu enrolamento numa direcção oposta ao da dupla hélice de DNA. A gentamicina inibe a síntese de proteínas devido à ligação à subunidade 30S do ribossoma. Por fim a tetraciclina actua na subunidade 30S, impedindo a ligação dos amioacil-tRNA ao ribossoma durante a tradução [37, 62].

Para testar o sinergismo entre o óleo essencial de sementes de coentros e os antibióticos convencionais referidos, utilizou-se a técnica de *checkerboard*. Esta técnica é usada frequentemente para avaliar interacções antimicrobianas *in vitro*. O *checkerboard* permite a variação das concentrações de cada antimicrobiano ao longo dos diferentes eixos, garantindo assim que cada poço contenha uma combinação diferente [94].

Na tabela 7.2 estão apresentados os resultados do ensaio de *checkerboard* para as estirpes de *A. baumannii* em estudo e as figuras (7.3 e 7.4) representam os perfis do óleo essencial de sementes de coentros com os antibióticos convencionais sobre essas estirpes.

Tabela 7.2 - Concentração inibitória fraccionada (CIF) e índices FIC (ICIF) do óleo de sementes de coentros em combinação com antibióticos convencionais contra duas estirpes de referência de *Acinetobacter baumannii*.

	<i>A. baumannii</i> LMG 1025		<i>A. baumannii</i> LMG 1041	
	CIF	ICIF	CIF	ICIF
Óleo essencial	0.500		0.500	
Cefoperazona	0.250	0.750	0.500	1.000
Óleo essencial	0.031	0.281	0.250	0.375
Ciprofloxacina	0.250		0.125	
Óleo essencial	0.250	0.312	0.016	0.047
Cloranfenicol	0.062		0.031	
Óleo essencial	0.125	0.250	0.250	0.375
Gentamicina	0.125		0.125	
Óleo essencial	0.500	1.000	0.500	0.625
Piperacilina	0.500		0.125	
Óleo essencial	0.062	0.312	0.062	0.185
Tetraciclina	0.250		0.125	

Sinergismo: $ICIF \leq 0.5$; sem interação: $0.5 < ICIF \leq 4$; antagonismo: $ICIF > 4$ [92].

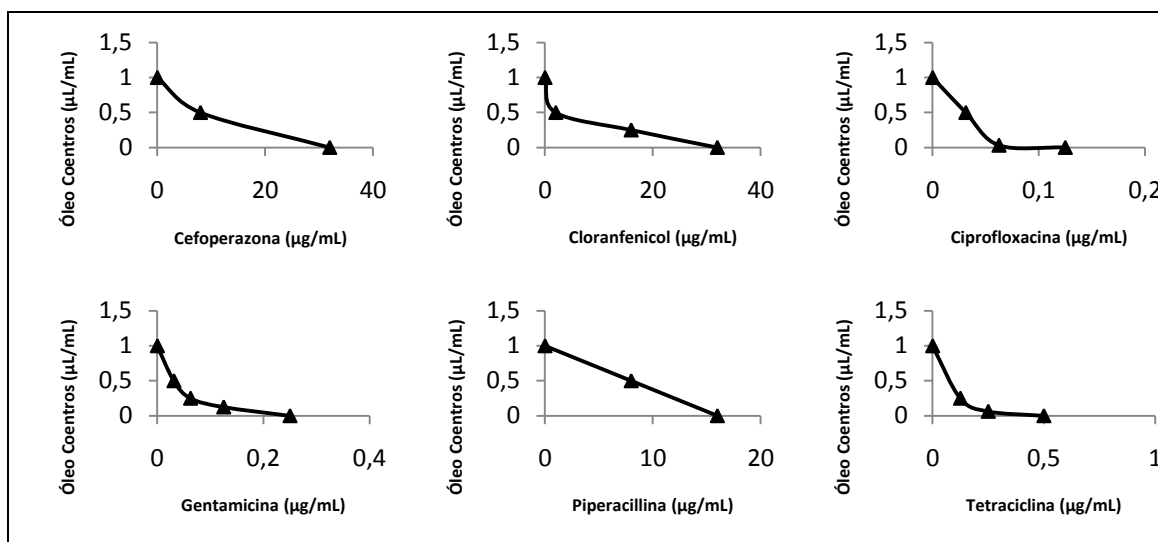


Figura 7.3 - Curvas representativas do efeito do óleo de sementes de coentros com antibióticos convencionais contra *Acinetobacter baumannii* LMG 1025.

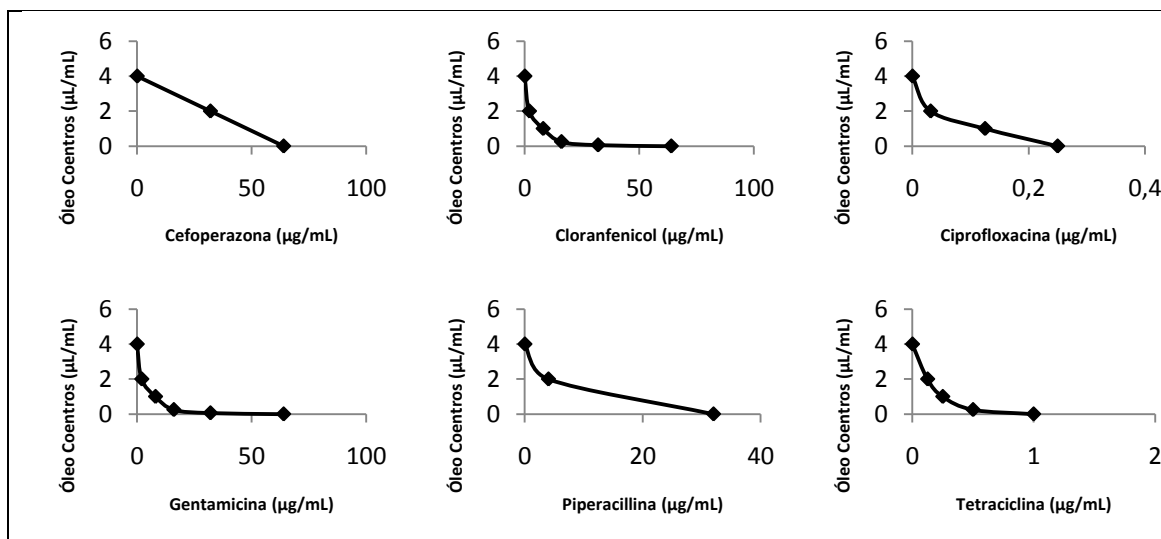


Figura 7.4 - Curvas representativas do efeito do óleo de sementes de coentros com antibióticos convencionais contra *Acinetobacter baumannii* LMG 1041.

Como mostrado na figura 7.4, o valor da CMI de cloranfenicol contra *A. baumannii* LMG 1041 diminuiu de 64 para 2 µg/mL quando combinado com o óleo de sementes de coentros e apresentou uma curva com inclinação para a esquerda, representativa de sinergismo entre o óleo e o antibiótico testado. O mesmo comportamento, porém menos acentuado, pode ser visto quando se combinou o óleo de sementes de coentros com ciprofloxacina, gentamicina ou tetraciclina, confirmado pelos ICIFs obtidos (Tabela 7.2). Apenas os testes entre cefoperazona/óleo essencial e piperacilina/óleo essencial tiveram um efeito aditivo (Figura 7.3 e 7.4) contra as estirpes testadas. As diferenças que ocorrem com estas combinações podem ser relacionadas com o facto de tanto o óleo como a cefoperazona e a piperacilina compartilharem os mesmos alvos celulares, enquanto as interações sinérgicas do óleo essencial de coentros com a gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol e ciprofloxacina podem dever-se à inibição simultânea de diferentes alvos pelo óleo e pelo antibiótico.

Um estudo dos componentes de gengibre (*Zingiber officinale*) em combinação com a tetraciclina, resultou numa diminuição da resistência de estirpes clínicas de *A. baumannii* à tetraciclina [117]. Em outro estudo, onde se usou o óleo essencial derivado de *Helichrysum italicum*, verificou-se redução da resistência ao cloranfenicol por estirpes de *A. baumannii*, devido à inibição dos mecanismos de efluxo [118]. A interação sinérgica entre a gentamicina e os óleos essenciais *Aniba rosaeodora* e *Pelargonium graveolens* também foi descrita por Rosato contra estirpes Gram positivas e negativas, sendo uma delas a estirpe de referência *A. baumannii* ATCC 19606. Neste estudo os autores observaram que estes óleos reduziram a CMI contra *A. baumannii* de 4 para 0.24 µg/mL, propondo que o elevado número de monoterpenos presentes nos óleos essenciais interagiram com as paredes celulares, levando ao dano da sua fracção lipídica, favorecendo assim a entrada da gentamicina na

célula, levando à interrupção da síntese proteica por ligação à subunidade 30S do ribossoma [119].

Considerando que o óleo essencial de sementes de coentros contém um elevado número de diferentes grupos de compostos químicos, a actividade antimicrobiana pode ser causada por um mecanismo de acção com diferentes alvos na célula [120]. No entanto, está descrito que devido à sua hidrofobicidade e elevado teor de álcoois, os óleos essenciais têm como principal alvo a parede celular promovendo a sua destabilização e permeabilização com consequente aumento da entrada de antibiótico na célula [121, 122].

O mecanismo exacto à recuperação da susceptibilidade de *A. baumannii* ao cloranfenicol ainda não foi percebido, mas um dos constituintes do óleo de sementes de coentros, o geraniol, foi descrito como um potente inibidor dos mecanismos de efluxo. Lorenzi e os seus colaboradores observaram que o geraniol aumentou significativamente a eficácia de β -lactâmicos, quinolonas e cloranfenicol contra isolados multirresistentes de espécies Gram negativas [118].

Assim, a observação, neste trabalho, de que o óleo de sementes de coentros tem efeitos sinérgicos com os antibióticos convencionais sugere a sua potencial utilização em terapêuticas futuras.

7.3. Biofilmes microbianos

7.3.1. Avaliação da formação de biofilmes em diferentes meios e temperaturas

A formação de biofilme depende de vários factores, tais como os meios de crescimento dos microrganismos e as condições ambientais a que são expostos [60, 70]. Assim, analisou-se o efeito de quatro meios de cultura e duas temperaturas, 30 e 37°C, na formação de biofilme por duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG 1025 e 1041. Os resultados obtidos apresentam-se na figura 7.5.

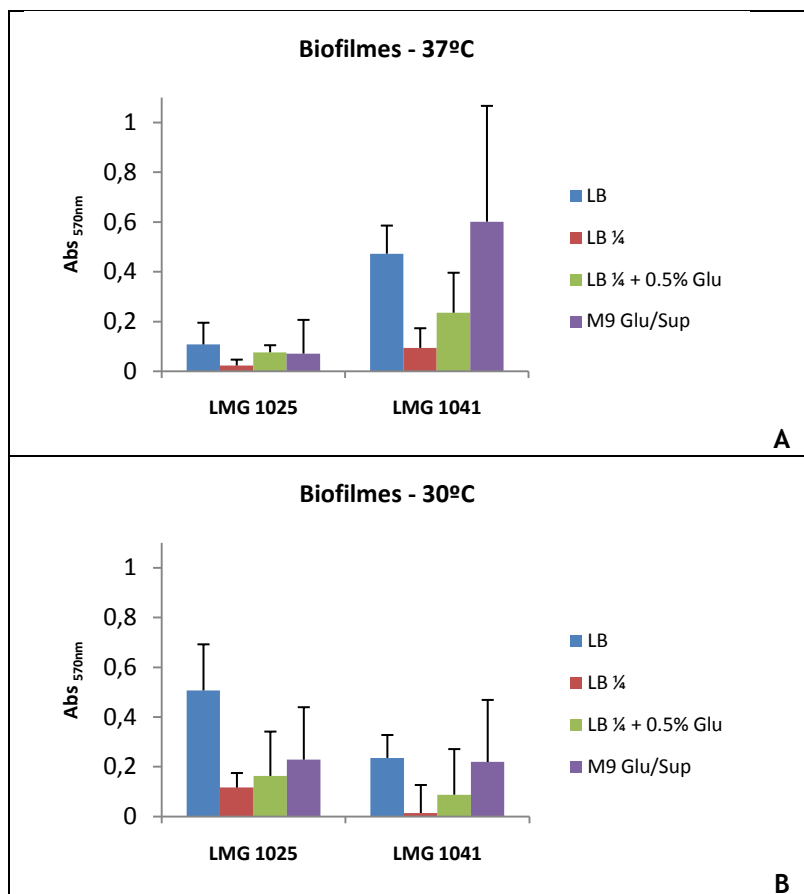


Figura 7.5 - Média e desvio padrão da absorvância a 570nm de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, a 37°C (A) e 30°C (B).

Observou-se que, a ambas as temperaturas, tanto o meio LB ¼, como o meio LB ¼+0.5% Glucose não favoreceram a formação de biofilme, em comparação com o meio LB ou M9 Glu/Sup. Em relação ao meio M9 Glu/Sup, observou-se maior formação de biofilme pela estirpe *A. baumannii* LMG 1041, comparando com o meio LB. No entanto o mesmo não se verificou para a estirpe LMG 1025, onde a formação de biofilme foi superior com o meio LB. Por fim observou-se que a temperatura afecta a formação de biofilme por ambas as estirpes, verificando-se que a estirpe LMG1025 tem maior formação de biofilme a 30°C, enquanto a estirpe LMG 1041 é favorecida a 37°C.

Apesar de um estudo semelhante ter sido realizado por Nucleo e colaboradores, que analisaram o efeito da glucose em meios de crescimento, para a formação de biofilmes por isolados clínicos de *A. baumannii*, não observou o mesmo comportamento descrito anteriormente, uma vez que relataram uma baixa adesão das células no meio LB em comparação com o meio LB ¼, sendo o meio M9 Glu/Sup o mais favorável para a formação de biofilmes por *A. baumannii* [123]. A divergência de resultados entre este estudo e o de Nucleo pode dever-se não só à diferença nos métodos utilizados, mas também às estirpes usadas. Neste trabalho utilizaram-se duas estirpes de referência (LMG 1025 e LMG 1041), enquanto no trabalho de Nucleo foi utilizado um isolado clínico de *A. baumannii*. Tendo em conta os

resultados obtidos, em que o meio LB mostrou ser um bom meio de cultura para o desenvolvimento de biofilmes por *A. baumannii* e uma vez que vários estudos sobre a formação de biofilmes por *A. baumannii* utilizam esse meio de cultura [58, 76, 124], neste estudo, todos os ensaios de biofilmes foram realizados em meio LB.

7.3.2. Comparação de dois métodos de quantificação de biofilmes

Existem várias técnicas descritas para a quantificação de biofilmes tomando por base a aplicação do corante cristal de violeta. Neste trabalho testaram-se dois métodos diferentes com o objectivo de seleccionar o que melhor se adaptava à realização de posteriores estudos do efeito do óleo essencial nos biofilmes. Assim, para quantificar o biofilme formado pelas estirpes *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, utilizaram-se os dois métodos (A e B) descritos no ponto 6.1.1.1.

Após a avaliação da formação de biofilmes pelas duas estirpes de referência de *A. baumannii*, verificou-se que para ambas as estirpes e temperaturas testadas, a quantificação de biofilme apresentou valores superiores com a técnica B (Figura 7.6, B). Para a *A. baumannii* LMG 1041, a 37°C obteve-se uma absorvância a 570nm de 0.473 pela técnica A e 0.801 pela técnica B. Também a 30°C, para a LMG 1025, se observou uma absorvância maior pela técnica B do que pela A, sendo os valores de 0.774 e 0.507, respectivamente.

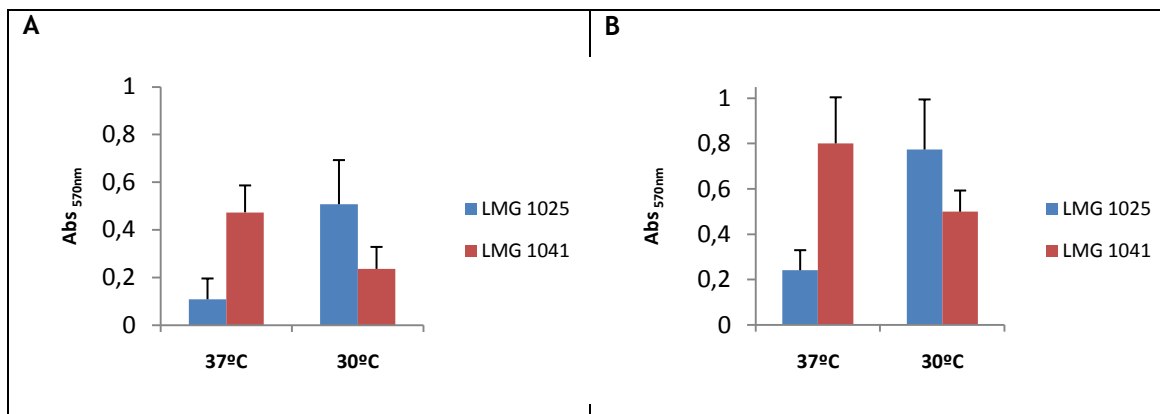


Figura 7.6 - Absorvância a 570nm de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, a 37°C e 30°C, pelos métodos A e B, descritos no ponto 6.6.1.1.

Também para a técnica B foi avaliado o efeito da temperatura na formação de biofilme, sendo que tal como descrito anteriormente no ponto 7.3.1, observou-se uma maior absorvância a 570nm para o ensaio a 30°C pelas estirpes *A. baumannii* LMG 1025 e a 37°C pela LMG 1041.

Os resultados obtidos podem ser explicados pela utilização de um volume diferente de inóculo em ambas as técnicas, na técnica A utilizam-se 200µL de inóculo, enquanto na B utilizam-se 100µL. A diferença de volume resulta num maior espaço livre sobre a superfície do meio do

inóculo, permitindo uma maior taxa de oxigenação, potenciando a formação de biofilme. Também a metodologia utilizada na quantificação dos biofilmes formados poderá ter interferência nos valores de absorvância obtidos.

O método B foi o escolhido para a realização de todos os ensaios com biofilmes ao longo do trabalho, uma vez que se obtiveram maiores absorvâncias do que com o método A, melhorando, por isso, a detecção de pequenas variações que se possam obter aquando da aplicação de agentes antimicrobianos.

7.4. Efeito do óleo essencial de sementes de coentros em biofilmes de *Acinetobacter baumannii*

7.4.1. Efeito do óleo essencial na formação do biofilme

A formação de biofilme pode explicar a elevada resistência a antimicrobianos por *A. baumannii*, assim como a sobrevivência deste organismo em ambientes hospitalares durante longos períodos de tempo, aumentando assim a probabilidade de aquisição de infecções hospitalares [74]. Assim, torna-se relevante a pesquisa de novos compostos com acção inibitória da formação de biofilmes por este organismo.

O efeito do óleo essencial de sementes de coentros na formação de biofilmes por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041 foi avaliado através da técnica de quantificação de biofilme pelo corante cristal de violeta, da actividade metabólica das células do biofilme e pela contagem das UFC/mL aderidas à microplaca. Para isso utilizaram-se cinco concentrações diferentes do óleo correspondendo a 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 vezes a CMI, ou seja, num intervalo de 0.125 a 2µL/mL e de 0.5 a 8µL/mL, para *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, respectivamente.

O efeito do óleo de sementes de coentros na formação de biofilme foi analisado através da quantificação de biofilme pelo método do corante cristal de violeta. Para a estirpe LMG 1025, observou-se uma inibição na formação de biofilme de 98% com 2µL/mL (2xCMI). Em relação à estirpe LMG 1041, a maior inibição da formação de biofilme, 94%, obteve-se com a concentração de óleo de 8µL/mL (2xCMI) e com uma vez a CMI (4µL/mL) observou-se uma inibição 85% (Figura 7.7).

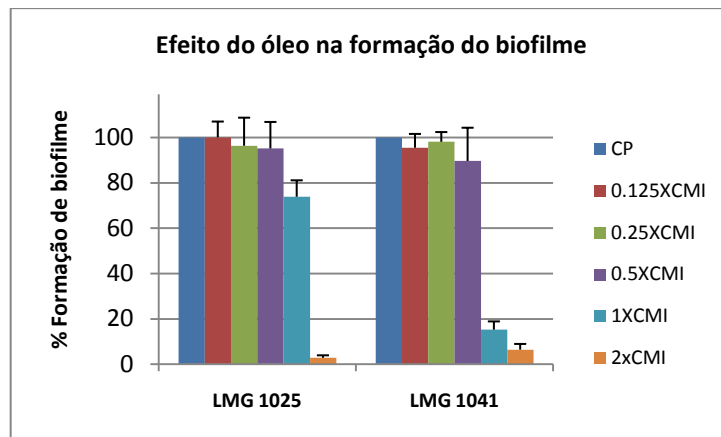


Figura 7.7 - Percentagem de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, através do método de cristal de violeta. Controlo positivo (CP).

A determinação da viabilidade das células presentes no biofilme pode fazer-se através da quantificação da actividade metabólica das células e da contagem das UFC. A técnica de quantificação baseada na actividade metabólica das células viáveis envolve o uso de sais de tetrazolium, como o XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-fenilaminocarbonil-tetrazolium)). Este método é baseado na redução do XTT a um formazano solúvel em água. Após o período de incubação a absorvância obtida é proporcional ao número de células microbianas metabolicamente activas [125]. Este método tem sido amplamente usado para estudar a actividade metabólica das células em biofilme e têm sido realizadas comparações com os testes de susceptibilidade padrão propostos pelo CLSI, mostrando a sua confiabilidade. Uma das grandes vantagens deste método é o pequeno tempo necessário para obter resultados [126]. No entanto, Kuhn descreve a baixa sensibilidade como uma desvantagem deste método [127]. Por sua vez, Cerca e colaboradores compararam a susceptibilidade a antibióticos de biofilmes formados por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* com a susceptibilidade das células planctónicas, para isso utilizaram o método XTT e a técnica de enumeração de UFC, concluindo que os resultados obtidos pelas duas técnicas foram semelhantes [128].

Os resultados obtidos na avaliação do efeito do óleo na viabilidade das células dos biofilmes formados por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041 estão apresentados na figura 7.8.

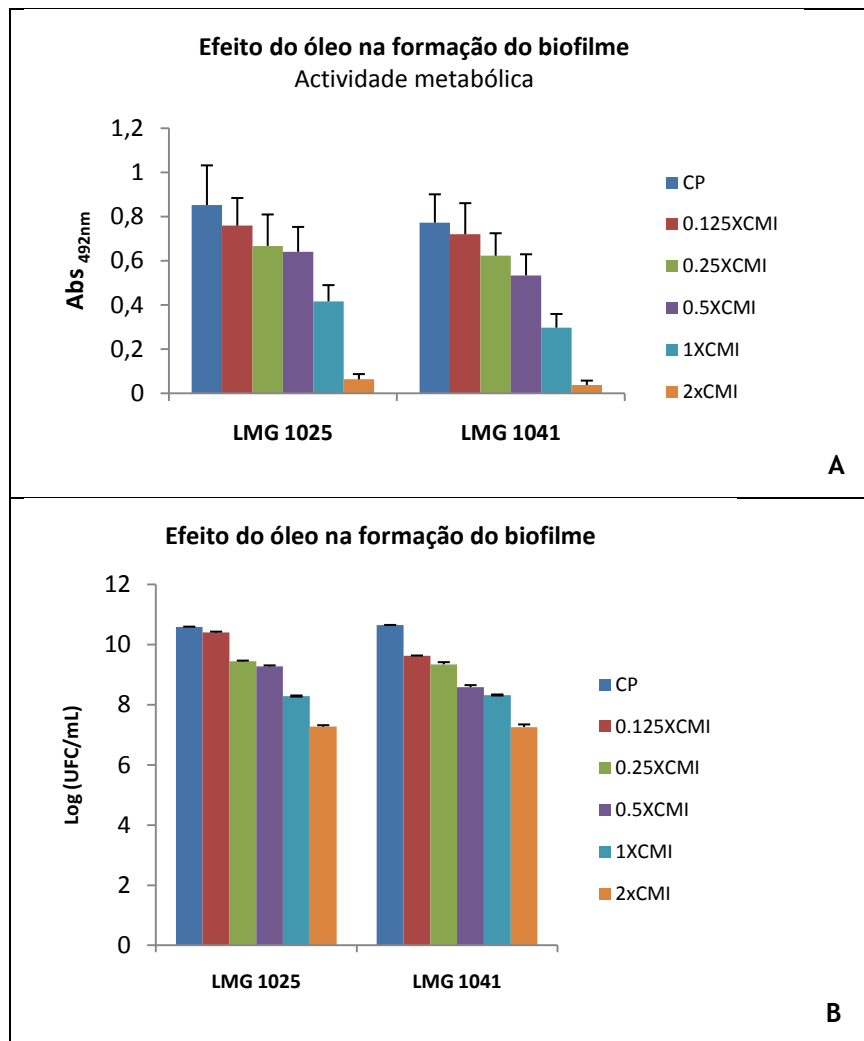


Figura 7.8 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de sementes de coentros na viabilidade das células do biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, após 24h de exposição. A viabilidade celular foi determinada pela avaliação da actividade metabólica das células pelo método XTT (A) e pela contagem das UFC/mL (B).

A diminuição da actividade metabólica das células foi gradual com o aumento da concentração do óleo, verificando-se uma diminuição da absorvância a 492nm de 0.772 para 0.037 em relação à estirpe LMG 1041 e de 0.851 para 0.063 na estirpe LMG 1025, com a concentração máxima de óleo (figura 7.8, A) A mesma tendência foi observada através da contagem das UFC. Utilizando duas vezes a CMI, observou-se um decréscimo do logaritmo das UFC/mL de 10.6 para 7.2, para a estirpe LMG 1041, semelhante ao observado para a estirpe LMG 1025 (figura 7.8, B).

Com concentrações inferiores à CMI, também se observou diminuição da actividade metabólica das células. Para a estirpe LMG 1025, utilizando uma concentração de 0.125 vezes a CMI, observou-se uma diminuição da absorvância a 492nm de 0.851 para 0.758. Relativamente à contagem de colónias e à actividade metabólica também se verificou uma

diminuição de ambos os parâmetros, para as duas estirpes em estudo, com concentrações 0.25 e 0.5 vezes a CMI.

Assim verificou-se que, em geral há uma diminuição da actividade metabólica das células e do número de UFC com o aumento da concentração do óleo essencial de sementes de coentros.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos por Nuryastuti, que estudou o efeito do óleo de canela na formação de biofilmes por *Staphylococcus epidermidis*. O autor verificou que após 24h, utilizando duas vezes a CMI do óleo resultou numa completa perda da actividade metabólica das células do biofilme [129]. Por sua vez, Aiemsaard, no seu estudo com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, observou que a concentrações menores que a CMI, este óleo e os componentes mostraram inibição na formação do biofilme. O mecanismo pelo qual isto acontece não está descrito, mas o autor propôs que os agentes testados afectaram a superfície celular podendo comprometer a adesão das células à superfície e consequentemente inibindo a formação de biofilme [130].

No entanto, com uma vez a CMI, para a estirpe *A. baumannii* LMG1025 observa-se 70% de formação de biofilme, o que não seria de esperar, uma vez que a CMI é a concentração mínima a que não se observa crescimento a olho nú. Resultados semelhantes foram observados por Sandasi e colaboradores num estudo sobre a actividade antibiofilme de vários extractos de plantas medicinais contra *Listeria monocytogenes*. No seu estudo o autor observou que os extractos de *G. glabra*, *S. aromaticum* e *C. sinensis* com concentração igual ou superior à CMI, apenas apresentaram aproximadamente 5, 30 e 20% de inibição na formação de biofilme por *L. monocytogenes* [131]. A razão para isto não foi ainda esclarecida, sendo necessários mais estudos. No entanto, uma possível razão é o facto de as suspensões bacterianas usadas para a determinação da CMI e para a formação de biofilme serem diferentes, uma vez que a primeira é uma suspensão realizada a partir de uma cultura em placa e a segunda é proveniente de uma cultura de meio líquido. Também Nostro e colegas que estudaram o efeito de óleo essencial de oregãos, do carvacrol e do timol na formação de biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis*, verificaram que a concentração inibitória de formação de biofilme foi duas a quatro vezes superior à concentração inibitória de células planctónicas [77].

Comparando os resultados obtidos em termos de formação de biofilme, pelos três métodos diferentes, cristal de violeta (figura 7.7), XTT e UFC/mL (figura 7.8), conclui-se que o óleo essencial de sementes de coentros exerce efeito inibitório na formação de biofilme pelas estirpes de referência de *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041.

7.4.2. Efeito do óleo essencial no biofilme estabelecido

A bactéria *A. baumannii* tem a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes hospitalares, potencializando a sua capacidade de disseminação nosocomial [3, 19, 20]. Pensa-se que isto esteja relacionado com a sua capacidade de formar biofilmes, por isso a limpeza dos ambientes tem sido relatada como sendo de grande importância no controlo de surtos por este microrganismo [19, 21, 22]. Dado isto avaliou-se o efeito do óleo essencial de sementes de coentros em biofilmes de *A. baumannii* previamente formados.

Após a formação de biofilme por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, adicionaram-se diferentes concentrações de óleo (0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 vezes a CMI) e observou-se o seu efeito ao longo do tempo, analisando-se após 4, 8 e 24h de incubação. Tal como realizado nos ensaios sobre o efeito do óleo na formação do biofilme, também se avaliou a quantidade de biofilme formado e a viabilidade das células através da sua actividade metabólica e contagem das UFC/mL no biofilme.

O efeito do óleo essencial de sementes de coentros no biofilme estabelecido por *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041 foi avaliado pela quantificação de biofilme formado através da coloração deste com cristal de violeta (Figura 7.9). Após 4h de exposição ao óleo com concentração duas vezes a CMI observou-se uma diminuição de 91% e 80% de biofilme formado pela estirpe LMG 1025 e LMG 1041, respectivamente. Utilizando concentrações inferiores à CMI também se observou um decréscimo das células aderidas, em relação ao poço controlo. No entanto ao longo do tempo, com concentrações de óleo inferiores à CMI verificou-se uma diminuição da capacidade do óleo de promover a destruição do biofilme.

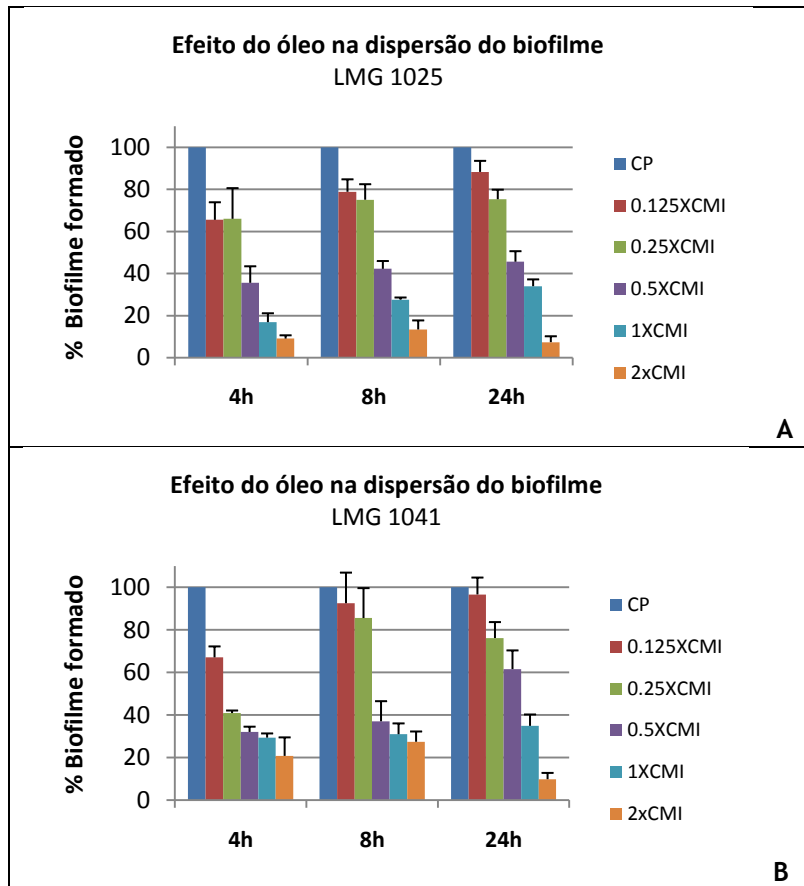


Figura 7.9 - Percentagem de biofilme formado por *A. baumannii* LMG 1025 (A) e LMG 1041 (B), ao longo do tempo, através do método de cristal de violeta. Controlo positivo (CP).

Através da avaliação da viabilidade das células presentes no biofilme (figura 7.10), verificou-se que ao longo do tempo, o óleo promoveu a destruição ou desagregação das células do biofilme. Após 24h de exposição do óleo, com concentração duas vezes a CMI, sobre o biofilme formado pela estirpe *A. baumannii* LMG 1025 verificou-se um decréscimo da absorvância a 492nm de 0.918, relativa ao controlo positivo, para 0.017 (figura 7.10, A). Este resultado é confirmado pela contagem das UFC presentes no biofilme, uma vez que se observou uma diminuição do logaritmo das UFC/mL de 10.6 para 7.3 (figura 7.10, B).

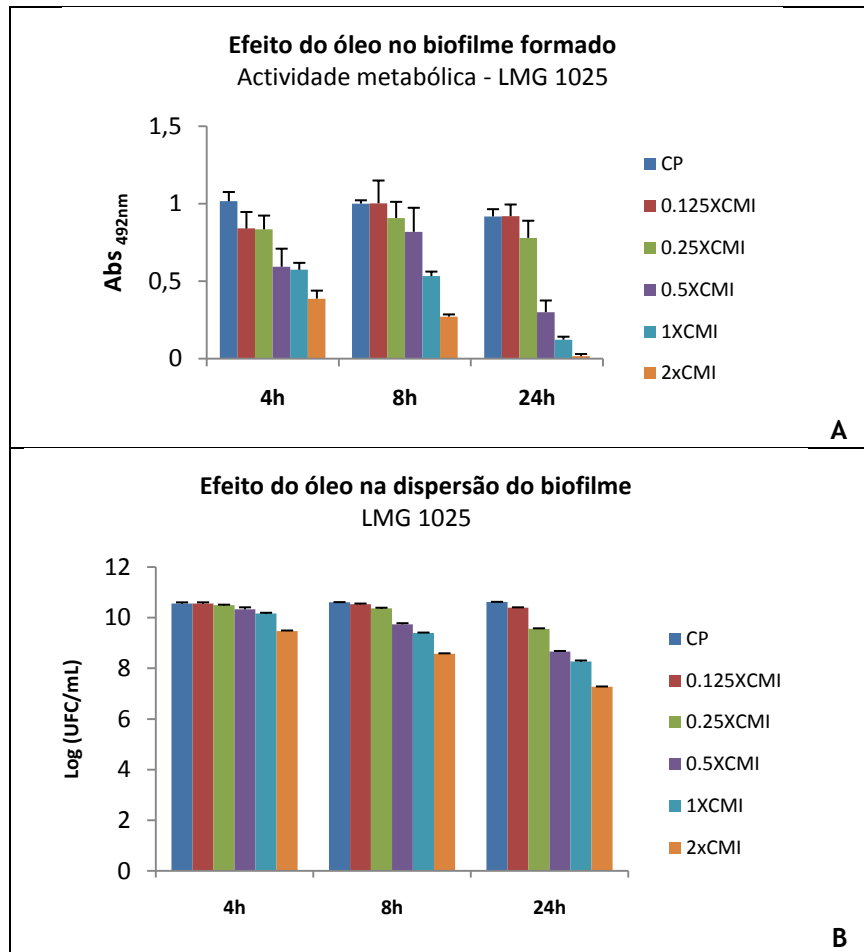


Figura 7.10 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de sementes de coentros na viabilidade das células do biofilme previamente formado por *A. baumannii* LMG 1025, após exposição ao óleo durante 4, 8 e 24h. A viabilidade celular foi determinada pela avaliação da actividade metabólica das células pelo método XTT (A) e pela contagem das UFC/mL (B).

Em relação à estirpe *A. baumannii* LMG 1041, observaram-se resultados semelhantes. Verificou-se que óleo com concentração 2 vezes superior a CMI, exerceu um forte efeito sobre o biofilme formado por esta estirpe, pois apenas após 4h foi verificado um decréscimo acentuado da actividade metabólica, diminuindo a absorvância de 1.054 para 0.052 (figura 7.11, A). Este decréscimo foi acompanhado pelo decréscimo das UFC presentes no biofilme (Figura 7.11, B). Após 24 de exposição ao óleo verificou-se uma diminuição do número de UFC, para todas as concentrações testadas. Esta diminuição não foi acompanhada pela diminuição da actividade metabólica para todas as concentrações, uma vez que só foi mais evidente o efeito para 2, 1 e 0.5 vezes a CMI. No entanto, através dos ensaios de microscopia (figura 7.12), observou-se uma diminuição do número de células no biofilme exposto ao óleo em relação ao controlo, sendo visível a diminuição de grandes agregados celulares quando comparado o controlo positivo (figura 7.12, A), com as concentração testadas de 0.25, 0.5 e 1 vez a CMI (figura 7.12, B, C e D). Após aplicação do óleo com as três concentrações analisadas, observou-se uma alteração no arranjo das bactérias aderidas à superfície, pois

apesar de se observarem agregados, este são em menor quantidade e é visível a existência de espaços sem células entre eles.

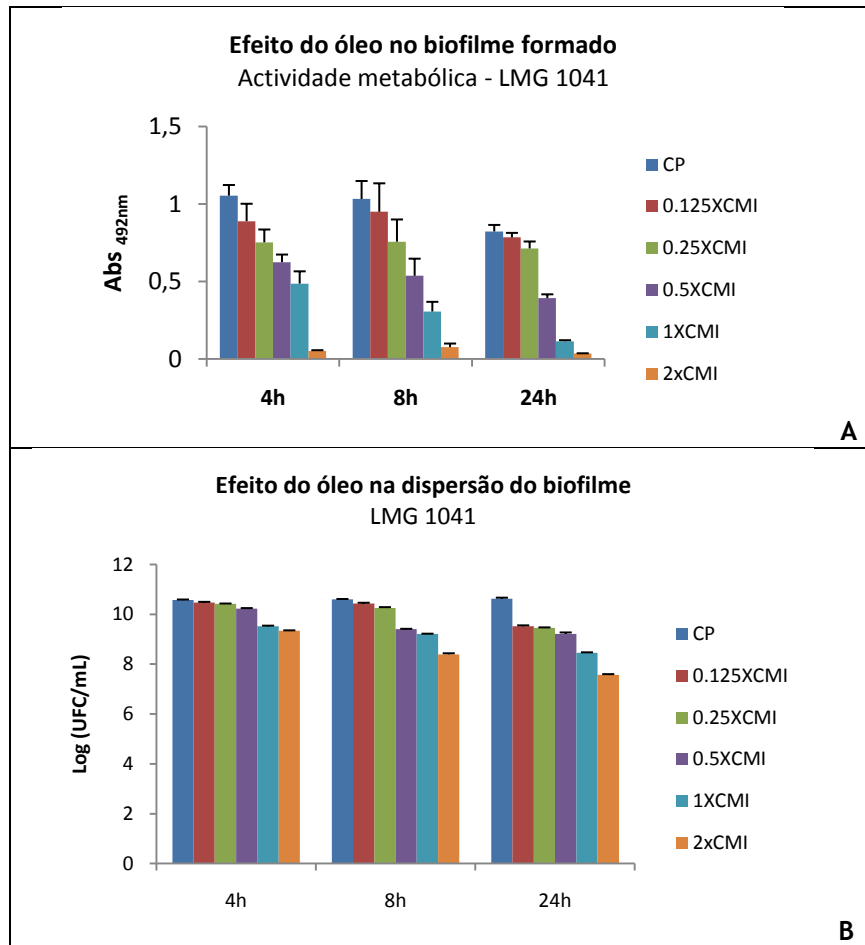


Figura 7.11 - Efeito de diferentes concentrações de óleo de sementes de coentros na viabilidade das células do biofilme previamente formado por *A. baumannii* LMG 1041, após exposição ao óleo durante 4, 8 e 24h. A viabilidade celular foi determinada pela avaliação da actividade metabólica das células pelo método XTT (A) e pela contagem das UFC/mL (B).

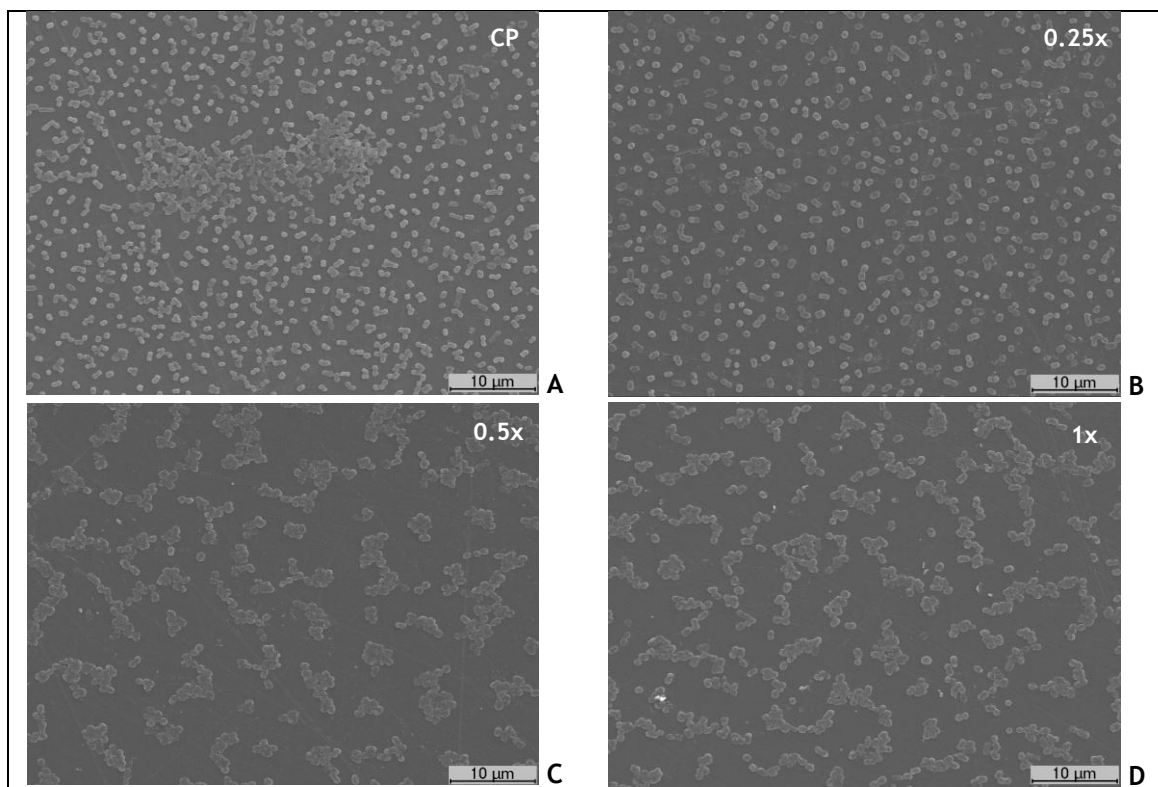


Figura 7.12 - Efeito do óleo essencial de sementes de coentros com concentração de 0.25 (B), 0.5 (C) e 1 vez (D) a CMI no biofilme previamente formado (A) por *A. baumannii* LMG 1041, após 24h de exposição. Observados por microscopia electrónica de varrimento com uma ampliação de 2000X.

Um estudo semelhante a este foi realizado por Kwieciński, onde o autor avaliou o efeito do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*, através da avaliação da actividade metabólica e da contagem das UFC presentes no biofilme. Kwieciński observou que ambos os métodos exibiram uma boa correlação e que após 24h de exposição ao óleo com concentração duas vezes superior à CMI, o biofilme era destruído, resultados estes confirmados por microscopia de varrimento electrónico [79]. Os resultados obtidos por Kwieciński e colaboradores foram semelhantes aos obtidos neste estudo para as estirpes de referência de *A. baumannii*. No mesmo estudo de Kwieciński, também se avaliou o efeito do óleo no biofilme formado por *S. aureus*, durante 2h após adição do óleo, observando-se um decréscimo exponencial da actividade metabólica das células. Após 2h, a actividade metabólica do biofilme foi de apenas 40% para o biofilme exposto a uma vez a CMI, em relação ao controlo, e de 15% com duas vezes a CMI [79]. Mais uma vez os resultados obtidos por este autor, foram semelhantes aos obtidos neste estudo, em que após 4h, se verificou a diminuição da actividade metabólica com uma vez a CMI, de aproximadamente 50%, para ambas as estirpes.

Utilizando a concentração de óleo essencial mais baixa (0.125xCMI) para ambas as estirpes, não se verificou alteração da actividade metabólica ao longo do tempo, mantendo-se sempre próxima da actividade metabólica do controlo. Um efeito semelhante foi observado por

Kwieciński, que sugeriu que as células dentro do biofilme, mantêm a sua actividade metabólica elevada com baixas concentrações do agente em estudo, em resposta a reacções de stress [79].

Resultados semelhantes também foram obtidos por Nostro, que no seu estudo sobre o efeito de três óleos (orégão, carvacrol e timol) sobre *S. aureus* e *S. epidermidis*, mostrou que foram necessárias concentrações duas ou quatro vezes superiores à CMI para exercer efeito inibitório tanto na formação como na dispersão de biofilmes [77]. Aiemsaard, no seu estudo com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, também mostrou que as bactérias presentes no biofilme tiveram maior resistência ao óleo do que em células planctónicas [130].

Por fim, deve-se ter em conta que foram desenvolvidos vários ensaios para quantificar a susceptibilidade a agentes antimicrobianos em biofilmes, mas estes ensaios não fornecem uma base de comparação com o ensaio padrão de determinação da CMI em células planctónicas. Isto acontece uma vez que a Norma [101] para determinação da CMI estipula a utilização de inóculos com baixa concentração de células planctónicas, enquanto nos biofilmes as células bacterianas estão em elevada densidade celular. Estas diferenças afectam os ensaios de susceptibilidade, uma vez que comparando a CMI de células planctónicas com a CMI em células do biofilme, pode resultar em grandes diferenças nos níveis de susceptibilidade. De forma similar, Cerca concluiu que os níveis de susceptibilidade em células planctónicas não reflectem a correspondente susceptibilidade de células em biofilmes [128].

Em suma, mostrou-se que o óleo essencial de sementes de coentros inibiu o metabolismo das células do biofilme formado por ambas as estirpes em estudo. Esta inibição foi observada com 0.5, 1 e 2 vezes a CMI do óleo. A maioria dos antibióticos são cerca de 1000 vezes menos eficientes contra bactérias em biofilme do que em suspensão, o que faz do óleo de sementes de coentros uma potencial alternativa de tratamento. As imagens obtidas através de microscopia electrónica de varrimento também mostram uma diminuição do número de células aderidas à superfície após exposição ao óleo, levando a colocar a hipótese de que o óleo de sementes de coentros promove a morte das células do biofilme e que a sua possível acção sobre a parede celular, pode levar à sua destabilização e conseqüentemente promover a remoção das células da superfície a que estão aderidas. Assim, o óleo essencial de sementes de coentros pode ser uma alternativa promissora para a erradicação de *A. baumannii*, tanto como desinfectante, como possível tratamento de infecções.

7.5. Formação de biofilme por estirpes clínicas de *Acinetobacter baumannii*

O *Acinetobacter baumannii* é um importante patógeno nosocomial, descrito como resistente a um elevado número de agentes antimicrobianos e responsável por várias infecções. Em muitos casos, a disseminação da *A. baumannii* nos ambientes hospitalares deve-se à sua propagação entre pacientes, ou através dos profissionais de saúde [16]. Também vários procedimentos clínicos e cirúrgicos podem contribuir para a contaminação e propagação deste microrganismo [17, 18]. Está descrita a associação de estirpes multirresistentes de *A. baumannii* à capacidade de adesão e formação de biofilmes em objectos inanimados e superfícies hospitalares, podendo explicar a sua sobrevivência por longos períodos de tempo em ambientes hospitalares e potencializando a sua capacidade de disseminação nosocomial [3, 19, 20]. Um estudo recente mostrou uma correlação positiva entre a formação de biofilme e a presença de um amplo espectro de β -lactamases entre isolados de *A. baumannii* [54], apesar de uma observação contrária ter sido observada em outro estudo [74]. Assim, são necessários mais estudos que permitam estabelecer correlações entre a formação de biofilmes e diversos factores de risco, como o sexo dos pacientes, a resistência a antibióticos das estirpes de *A. baumannii*, entre outros.

A formação de biofilmes pelas estirpes de *A. baumannii* isoladas no Hospital Cova da Beira, foi analisada recorrendo à coloração dos biofilmes com cristal de violeta e os resultados são apresentados na figura 7.13. Para analisar se o sexo do paciente, a amostra de onde foi isolado o microrganismo ou a resistência a antibióticos está associada a uma forte ou moderada capacidade de formação de biofilme, analisaram-se os dados estatisticamente através do teste de Qui-Quadrado. Este teste permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, a probabilidade de tais características serem independentes. Quando $p < 0.05$ consideram-se os desvios significativos, ou seja, que as variáveis não são independentes.

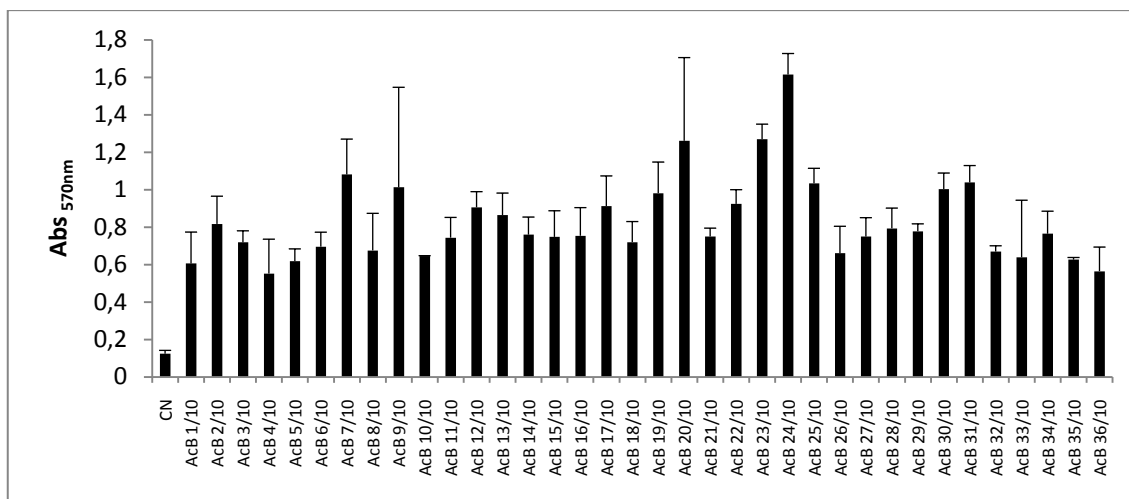


Figura 7.13 - Média e desvio padrão da absorvância a 570nm de 36 estirpes clínicas de *A. baumannii* aderidas e poços controle (CN).

No ensaio quantitativo de avaliação da formação de biofilme, os isolados foram classificados de acordo com Simões [103], como não produtores de biofilme, fraco, moderado ou forte produtores. Após esta avaliação foi verificado que as 36 estirpes clínicas tiveram capacidade de formação de biofilmes, sendo que 11 (31%) apresentaram moderada capacidade de formação de biofilmes e 25 (69%) forte capacidade.

Num estudo para avaliar a capacidade de formação de biofilmes por *A. baumannii*, Sechi e colaboradores, demonstraram que 16 de 20 estirpes clínicas de *A. baumannii* foram capazes de formar biofilme [132]. Por sua vez, na avaliação de três factores de virulência em isolados clínicos de *A. baumannii*, Cevahir observou que 64 de 86 isolados foram positivos para a formação de biofilmes, com 10 isolados apresentando forte capacidade de formação, 27 moderada e 27 fraca capacidade [58]. Ambos os autores utilizaram o mesmo método para qualificar as estirpes quanto à capacidade de formação de biofilme, sendo este método diferente ao utilizado neste trabalho.

No seu estudo, Rao, estudou a possível correlação entre a formação de biofilme por isolados clínicos de *A. baumannii* e a sua resistência a antibióticos, verificando que 62% dos isolados mostraram capacidade de formação de biofilme [133]. Os resultados obtidos nesses estudos não foram semelhantes aos nossos, uma vez que todos os isolados estudados neste trabalho se mostraram formadores de biofilmes.

Através da análise das amostras de onde foi feito o isolamento de *A. baumannii*, observou-se que 17 dos 36 isolados foram obtidos a partir de uroculturas, verificando-se que a forte ou moderada formação de biofilme pelas estirpes é independente do isolamento de *A. baumannii* a partir de uroculturas, para um intervalo de confiança de 95% ($p > 0.05$). Também para as restantes amostras de isolamento, não se verificou a dependência entre a moderada ou forte capacidade de formação de biofilme com o tipo de amostra usada para o isolamento (tabela

7.3). Rodriguez-Bano, num estudo onde avaliou vários factores de risco para a formação de biofilme por *A. baumannii*, verificou que apenas as amostras de origem do tracto respiratório, mostraram ser um factor de risco para a formação de biofilme [74], o mesmo não foi observado neste estudo, uma vez que todas as estirpes estudadas mostraram capacidade de formação de biofilme.

Tabela 7.3 - Formação de biofilme por estirpes clínicas de *A. baumannii* em função da amostra de onde foi feito o isolamento

Cultura	Formação de biofilme		Total	Valor de p
	Moderado	Forte		
Urocultura	4	13	17	0.309
Biópsia rectal	1	2	3	0.678
Expectoração	4	8	12	0.544
Cateter	1	-	1	0.306
Hemocultura	-	2	2	0.476
Líquido peritoneal	1	-	1	0.306
Total	11	25	36	

Também se pretendeu avaliar se o sexo dos pacientes poderá ser um factor que influencie a moderada ou forte formação de biofilme (tabela 7.4). Mais uma vez se verificou que estas variáveis são independentes, para um intervalo de confiança de 95% ($p > 0.05$). Esta observação está de acordo com o descrito por Rodriguez-Bano, quanto à relação do sexo com a capacidade ou não de formação de biofilme [74].

Tabela 7.4 - Formação de biofilme por estirpes clínicas de *A. baumannii* em função do sexo do paciente

Sexo	Formação de biofilme		Total	Valor p
	Moderado	Forte		
Feminino	4	7	11	0.449
Masculino	7	18	25	
Total	11	25	36	

A avaliação da susceptibilidade a 18 antibióticos foi realizada para 30 dos 36 isolados clínicos. Todos os 30 isolados mostraram resistência a 12 dos 18 antibióticos testados, sendo eles Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulânico, Piperacilina/Tazbactan, Cefalotina, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Cefotaxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Meropenem e Nitrofurantoina, podendo assim considerar-se que os isolados em estudo são multirresistentes

a antibióticos. Assim procedeu-se à avaliação da possível dependência entre a resistência aos 6 antibióticos para os quais foram encontrados isolados clínicos que se apresentavam como susceptíveis ou intermédios aos mesmos e a capacidade moderada ou forte de formar biofilme. Como mostrado na tabela 7.5, para os 6 antibióticos observou-se que a resistência a estes é independente da capacidade de formação de biofilme pelas estirpes clínicas, para um intervalo de confiança de 95% ($p>0.05$).

Tabela 7.5 - Formação de biofilme por estirpes clínicas de *A. baumannii* em função da resistência a antibióticos.

Resistência ^a	Formação de biofilme		Total (n=30)	Valor p
	Moderado (n=9)	Forte (n=21)		
Gentamicina	9	20	29	0.700
Amikacina	3	1	4	0.069
Tobramicina	9	19	28	0.483
Trimetoprim/Sulfametoxazol	9	20	29	0.700
Colistina	0	1	1	0.700
Tigeciclina	2	2	4	0.345

^a Para os outros antibióticos testados (Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulânico, Piperacilina/Tazbactam, Cefalotina, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Cefotaxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Meropenem e Nitrofurantoina) observou-se resistência por todas as estirpes, pelo que não se justifica análise estatística.

Algumas estirpes de *A. baumannii* são clinicamente importantes devido à capacidade de colonizar a pele e mucosas de pacientes, assim como dispositivos médicos. A formação de biofilme desempenha um papel importante no processo de colonização, podendo também explicar a elevada resistência a antimicrobianos por *A. baumannii*. Este potencial tem sido demonstrado em estudos que mostram que um isolado clínico da bactéria pode formar biofilmes em superfícies de vidro e outras [19, 105, 132]. Neste estudo através da análise estatística dos resultados obtidos, observou-se que todos os isolados clínicos apresentaram capacidade de formar biofilmes, não se verificando dependência significativa entre a moderada ou forte capacidade de formação de biofilme e a amostra de onde foi isolada a estirpe, o sexo do paciente ou a resistência a antibióticos. No entanto, pode não se ter encontrado nenhuma associação, uma vez que os 36 isolados de *A. baumannii* mostraram capacidade de formação de biofilme.

Dado o elevado potencial de formação de biofilmes por este microrganismos é importante a pesquisa de agentes com capacidade de erradicar os biofilmes formados por *A. baumannii*. Como foi demonstrado para as estirpes de *A. baumannii* LMG 1025 e 1041, o óleo essencial de sementes de coentros pode ser um promissor agente antimicrobiano contra esta bactéria, exercendo efeito tanto em células planctónicas como em biofilmes. Assim estudos futuros

com este agente contra isolados clínicos de *A. baumannii*, podem mostrar um potencial uso do óleo essencial de sementes de coentros contra a formação de biofilme por estas estirpes.

7.6. Testes de motilidade

As espécies do género *Acinetobacter*, estão descritas como não apresentando motilidade [36], no entanto, têm sido apresentados estudos que demonstram que alguns destes microrganismos possuem motilidade “Twitching”, provavelmente devido à presença de fímbrias [25, 36]. Mussi e os seus colaboradores, estudaram o efeito da luz em estirpes de *Acinetobacter baumannii*, demonstrando que este microrganismo, no escuro, forma biofilmes, película e apresenta motilidade. A motilidade foi avaliada em placas de “Swimming”, observando-se motilidade para a estirpe de referência *A. baumannii* ATCC 17978 [39].

A motilidade é um factor que pode afectar a formação de biofilmes, tal como Shroud descreveu para *Pseudomonas aeruginosa* [134]. Sendo que a *P. aeruginosa* e outras bactérias se podem mover ao longo de uma superfície usando um movimento mediado por pili (“Twitching”), que é aproximadamente cem vezes mais lento do que o movimento mediado por flagelo (“Swimming”) [66]. Apesar da motilidade dependente de flagelo não ser descrita para *Acinetobacter baumannii*, uma vez que membros deste género não formam flagelos, foi descrito que a motilidade de algumas estirpes pode resultar da formação de pili polar durante a fase de crescimento exponencial [135].

Assim, para testar a motilidade das estirpes clínicas de *A. baumannii* (AcB 1/10 a 36/10) e das estirpes de referência LMG 1025 e 1041, utilizaram-se placas de “Swimming” como descrito por Rashid [106], considerando-se placas de estudo de motilidade geral. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 7.14.

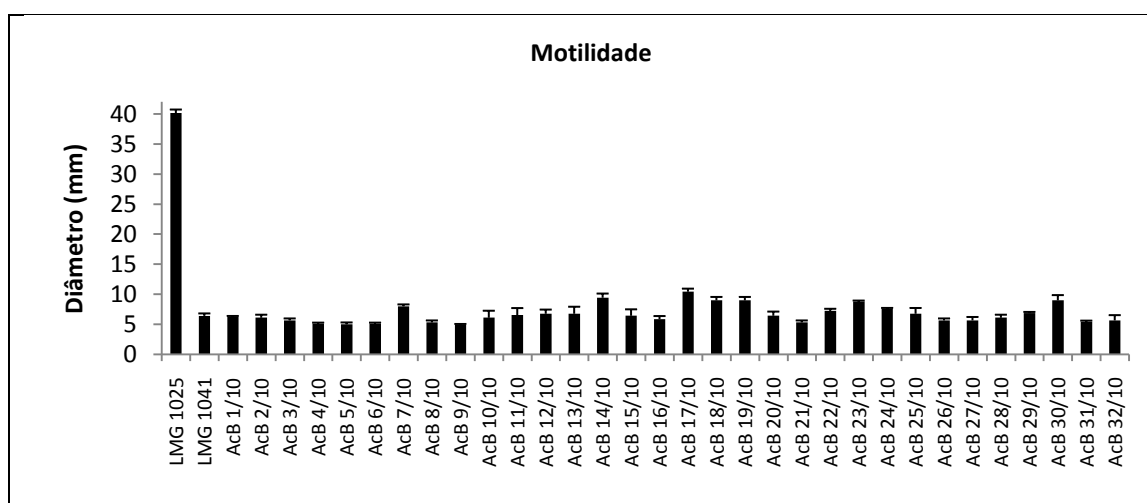


Figura 7.14 - Representação gráfica da média dos diâmetros do crescimento das estirpes de *A. baumannii* em placas de “Swimming”.

Tal como observado por Mussi [39], também neste estudo se observou motilidade pela estirpe *A. baumannii* LMG 1025 (equivalente à estirpe ATCC 17978), apresentando um diâmetro médio de 40mm, tal como se pode observar na figura 7.15, A. Para as restantes estirpes, todos os valores obtidos foram bastante semelhantes, variando o diâmetro médio de crescimento entre 5 e 7mm. Destacando-se apenas as estirpes AcB 14/10, 17/10, 18/10, 19/10 e 23/10, cuja motilidade variou entre 8.8 e 10.4 mm, como se pode ver para a estirpe 14/10 na figura 7.15, B.

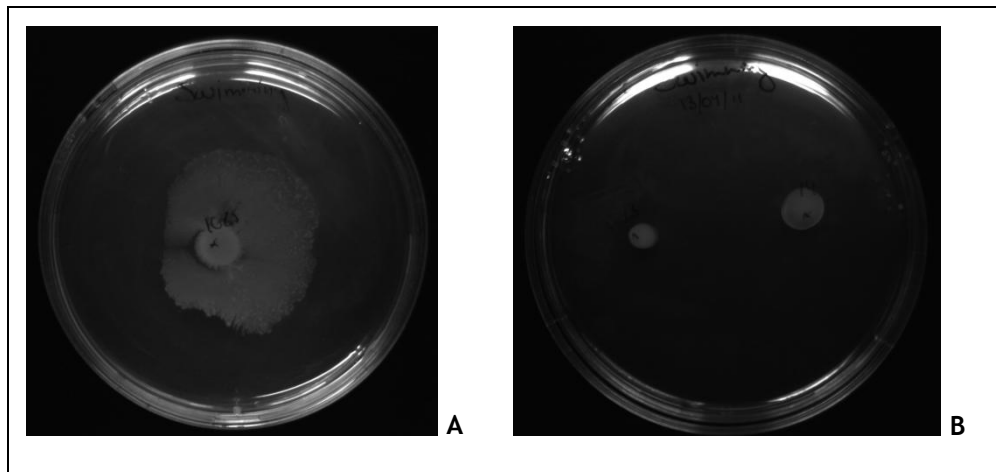


Figura 7.15 - Motilidade em placas semi-sólidas de “Swimming”. Placas fotografadas após incubação durante 24h a 37°C. Estirpe *A. baumannii* LMG 1025 (A) e estirpes clínicas AcB 13/10 e 14/10 (B).

Tal como concluído por McQueary [135], também neste estudo não se verificou correlação entre a motilidade e a capacidade de formar biofilme, uma vez que as estirpes com maior motilidade formaram mais, menos ou igual quantidade de biofilme do que as estirpes sem motilidade.

7.7. Ensaio de hemólise e hemaglutinação

Alguns óleos essenciais têm demonstrado elevada actividade antimicrobiana. No entanto, o uso do óleo essencial como um todo, não permite determinar o agente activo devido à complexidade de componentes. Também é possível que certos componentes dos óleos essenciais em minoria, possam exercer alguns efeitos tóxicos ou adversos *in vivo* [136]. Assim, para além dos diversos estudos das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, também é necessário avaliar a toxicidade destes, garantindo que tenham baixa citotoxicidade [78].

A capacidade de hemólise e hemaglutinação do óleo essencial de sementes de coentros em eritrócitos humanos foi testada, tendo sido os eritrócitos humanos expostos a diferentes concentrações do óleo essencial (32 a 0.015µL/mL) durante 1h e avaliada a hemólise e

hemaglutinação provocadas por este. Com nenhuma das concentrações testadas se observou hemaglutinação a olho nú ou por microscopia óptica. No entanto, relativamente à hemólise observou-se que a percentagem desta diminui com a diminuição da concentração de óleo testada, obtendo-se com a concentração máxima de óleo (32µL/mL) 53% de hemólise. Para as CMI, 1µL/mL e 4µL/mL, das estirpes *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, observou-se 0.26% e 1% de hemólise, respectivamente. Com estes resultados verifica-se a baixa citotoxicidade do óleo essencial de sementes de coentros, evidenciando o seu potencial como agente terapêutico contra o microrganismo *A. baumannii*, tanto isolado em células planctónicas como organizado em biofilmes.

Capítulo 8 - Conclusões e Perspectivas futuras

Os estudos efectuados ao longo deste trabalho permitiram um melhor conhecimento das propriedades antimicrobianas do óleo essencial de sementes de coentro sobre estirpes de *Acinetobacter baumannii*, assim como da capacidade de formação de biofilmes por este microrganismo. Assim, as principais conclusões deste trabalho foram:

- Foi avaliada a susceptibilidade de duas estirpes de referência de *A. baumannii*, LMG 1025 e 1041, ao óleo essencial de sementes de coentro, assim como a cefoperazona, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, piperacilina e tetraciclina, tendo-se observado que ambas as estirpes apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos avaliados. Em relação ao óleo, obteve-se uma concentração mínima inibitória de 1µL/mL e 4µL/mL, para a estirpe LMG 1025 e LMG 1041, respectivamente.
- Foi estudado o efeito do óleo sobre células de *A. baumannii* em fase estacionária e exponencial de crescimento, através da determinação do número de bactérias viáveis ao longo do tempo, observando-se um rápido efeito bactericida do óleo sobre células em ambas as fases de crescimento. Sendo as células em fase estacionária de crescimento menos susceptíveis ao agente antibacteriano.
- O uso da combinação do óleo essencial e antibióticos contra *A. baumannii*, mostrou efeito sinérgico quando se combinou o óleo com cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina ou tetraciclina, sendo que os testes entre o óleo essencial e a cefoperazona ou piperacilina apenas mostraram um efeito aditivo. Os resultados sugerem que estas diferenças poderão estar relacionadas com o facto de tanto o óleo como a cefoperazona e piperacilina compartilharem os mesmos alvos celulares, enquanto as interacções sinérgicas do óleo essencial de sementes de coentros com a gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol e ciprofloxacina poderem estar relacionadas com a inibição simultânea de diferentes alvos pelo óleo e pelo antibiótico.
- Foi avaliado o efeito de diferentes meios de cultura e temperaturas na formação de biofilmes por duas estirpes de *A. baumannii*, LMG 1025 e 1041, tendo-se observado que tanto o meio LB como o M9 Glu/Sup, favorecem a formação de biofilme e que a estirpe LMG 1025 tem maior capacidade de formar biofilme a 30°C, enquanto a LMG 1041 é favorecida a 37°C.
- Foi estudado o efeito do óleo essencial de sementes de coentros na formação de biofilmes por *A. baumannii* e em biofilmes previamente formados por este organismo, tendo-se verificado que o óleo inibe a formação de biofilmes e promove a dispersão de biofilmes já formados.

- Foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes, assim como motilidade, de estirpes clínicas de *A. baumannii* resistentes a vários antibióticos. Os resultados obtidos sugerem que todas as estirpes estudadas apresentam moderada ou forte capacidade de formar biofilme, mas sem dependência significativa entre a moderada ou forte capacidade de formação de biofilme e a amostra de onde foi isolada a estirpe, o sexo do paciente ou a resistência a antibióticos. Também não foi estabelecida relação entre a capacidade de formar biofilme e a presença de motilidade.

Por tudo o exposto anteriormente, o presente trabalho, contribui não só para o melhor conhecimento científico das características do *Acinetobacter baumannii*, como também para a possível utilização do óleo essencial de sementes de coentro no controlo deste microrganismo tanto em células planctónicas, como em células organizadas em biofilme, o que poderá possibilitar, no futuro, o desenvolvimento de novos agente terapêuticos.

Será importante em estudos futuros procurar obter mais amostras clínicas de *A. baumannii* e fazer a respectiva caracterização genética por PFGE, assim como avaliar a capacidade de formação de biofilmes por estes isolados clínicos em materiais associados a equipamentos médicos, superfícies hospitalares ou cateteres. E ainda, realizar ensaios de detecção molecular de genes de adesinas e estudar os factores que podem ter influência sobre a capacidade de formação de biofilme, nomeadamente a expressão diferencial de polissacarídeos, ou proteínas, por células planctónicas ou em biofilme, e a hidrofobicidade da superfície celular. Em termos de alternativas terapêuticas, são necessários mais estudos com o óleo essencial de sementes de coentro, quer ensaios de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade *in vivo*, quer o estudo das propriedades antimicrobianas dos componentes isolados do óleo

Referências bibliográficas

1. Perez, F., A.M. Hujer, K.M. Hujer, B.K. Decker, P.N. Rather, et al., *Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2007. **51**(10): p. 3471-3484.
2. Rice, L.B., *Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa*. Clinical infectious diseases, 2006. **43**(Suppl 2): p. S100-105.
3. Jung, J.Y., M.S. Park, S.E. Kim, B.H. Park, J.Y. Son, et al., *Risk factors for multi-drug resistant Acinetobacter baumannii bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit*. BMC infectious diseases, 2010. **10**: p. 228-239.
4. Villegas, M.V. and A.I. Hartstein, *Acinetobacter Outbreaks, 1977-2000*. Infection control and hospital epidemiology, 2003. **24**(4): p. 284-295.
5. Peymani, A., M.-R. Nahaei, S. Farajnia, A. Hasani, A. Mirsalehian, et al., *High prevalence of metallo-beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii in a teaching hospital in Tabriz, Iran*. Japanese journal of infectious diseases, 2011. **64**(1): p. 69-71.
6. Hamouda, A., B.a. Evans, K.J. Towner and S.G.B. Amyes, *Characterization of epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes*. Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(7): p. 2476-2483.
7. Andriamanantena, T.S., E. Ratsima, H.C. Rakotonirina, F. Randrianirina, L. Ramparany, et al., *Dissemination of multidrug resistant Acinetobacter baumannii in various hospitals of Antananarivo Madagascar*. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 2010. **9**: p. 17-23.
8. Koo, S.H., K.C. Kwon, H.H. Cho and J.Y. Sung, *Genetic basis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea*. The Korean journal of laboratory medicine, 2010. **30**(5): p. 498-506.
9. Kuo, L.C., L.J. Teng, C.J. Yu, S.W. Ho and P.R. Hsueh, *Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant Acinetobacter baumannii at a university hospital in Taiwan*. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(5): p. 1759-1763.
10. Da Silva, G.J., S. Quinteira, E. Bértolo, J.C. Sousa, L. Gallego, et al., *Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii clone in the Iberian Peninsula*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2004. **54**(1): p. 255-258.
11. Da Silva, G., L. Dijkshoorn, T. van der Reijden, B. van Strijen and A. Duarte, *Identification of widespread, closely related Acinetobacter baumannii isolates in Portugal as a subgroup of European clone II*. Clinical microbiology and infection, 2007. **13**(2): p. 190-195.
12. Manikal, V.M., D. Landman, G. Saurina, E. Oydna, H. Lal, et al., *Endemic carbapenem-resistant Acinetobacter species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage*. Clinical infectious diseases, 2000. **31**(1): p. 101-106.

13. Navon-Venezia, S., R. Ben-Ami and Y. Carmeli, *Update on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii infections in the healthcare setting*. Current opinion in infectious diseases, 2005. **18**(4): p. 306-313.
14. Looveren, M.V. and H. Goossens, *Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe*. Clinical microbiology and infection 2004. **10**(8): p. 684-704.
15. Forster, D.H. and F.D. Daschner, *Acinetobacter species as nosocomial pathogens*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 1998. **17**(2): p. 73-77.
16. Morgan, D.J., S.Y. Liang, C.L. Smith, J.K. Johnson, A.D. Harris, et al., *Frequent Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Contamination of Gloves, Gowns, and Hands of Healthcare Workers*. Infect Control Hosp Epidemiol., 2010. **31**(7): p. 716-721.
17. Maragakis, L.L., S.E. Cosgrove, X. Song, D. Kim, P. Rosenbaum, et al., *An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii associated with pulsatile lavage wound treatment*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2004. **292**(24): p. 3006-3011.
18. Yorioka, K., S. Oie and A. Kamiya, *Microbial Contamination of Suction Tubes Attached to Suction Instruments and Preventive Methods*. Jpn. J. Infect. Dis, 2010. **63**(2): p. 124-127.
19. Wendt, C., B. Dietze, E. Dietz and H. Rüdén, *Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces*. Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(6): p. 1394-1397.
20. Husni, R.N., *Risk Factors for an Outbreak of Multi-Drug-Resistant Acinetobacter Nosocomial Pneumonia Among Intubated Patients*. Chest journal, 1999. **115**(5): p. 1378-1382.
21. Choi, W.S., S.H. Kim, E.G. Jeon, M.H. Son, Y.K. Yoon, et al., *Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in intensive care units and successful outbreak control program*. Journal of Korean medical science, 2010. **25**(7): p. 999-1004.
22. Denton, M., M.H. Wilcox, P. Parnell, D. Green, V. Keer, et al., *Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of Acinetobacter baumannii on a neurosurgical intensive care unit*. The Journal of hospital infection, 2004. **56**(2): p. 106-110.
23. Corbella, X., a. Montero, M. Pujol, M.a. Domínguez, J. Ayats, et al., *Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii*. Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(11): p. 4086-4095.
24. Bergogne-Bérézin, E. and K.J. Towner, *Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features*. Clinical microbiology reviews, 1996. **9**(1): p. 148-165.
25. Peleg, A.Y., H. Seifert and D.L. Paterson, *Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen*. Clinical microbiology reviews, 2008. **21**(3): p. 538-582.
26. van den Broek, P.J., J. Arends, a.T. Bernards, E. De Brauwier, E.M. Mascini, et al., *Epidemiology of multiple Acinetobacter outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001*. Clinical microbiology and infection, 2006. **12**(9): p. 837-43.

27. Peleg, A.Y., J.M. Bell, A. Hofmeyr and P. Wiese, *Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2006. **57**(4): p. 794-795.
28. Vanechoutte, M., L.a. Devriese, L. Dijkshoorn, B. Lamote, P. Deprez, et al., *Acinetobacter baumannii-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic*. Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(11): p. 4280-4281.
29. Guardabassi, L., S. Schwarz and D.H. Lloyd, *Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2004. **54**(2): p. 321-332.
30. Berlau, J., H.M. Aucken, E. Houang and T.L. Pitt, *Isolation of Acinetobacter spp. including A. baumannii from vegetables: implications for hospital-acquired infections*. The Journal of hospital infection, 1999. **42**(3): p. 201-204.
31. Girlich, D., L. Poirel and P. Nordmann, *First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental Acinetobacter baumannii isolate*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**: p. 578-579.
32. Bouvet, P.J.M. and P.A.D. Grimont, *Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of nov . and Emended Descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwofii*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986. **36**(2): p. 228-240.
33. Henriksen, S.D., *Moraxella, Acinetobacter, and the Mimeae*. Bacteriological reviews, 1973. **37**(4): p. 522-561.
34. Rossau, R., a. Van Landschoot, M. Gillis and J. De Ley, *Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera Moraxella, Acinetobacter, and Psychrobacter and Related Organisms*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991. **41**(2): p. 310-319.
35. Thornley, M.J., *A taxonomic study of Acinetobacter and related genera*. Journal of general microbiology, 1967. **49**(2): p. 211-257.
36. Juni, E., *Genus II. Acinetobacter*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, J.B. Don, Noel R. Krieg, James T. Staley, Editor. 2005, Springer Science & Business Media, Inc: New York. p. 425-437.
37. Ferreira, W.F.C., J.C.F.d. Sousa and N. Lima, *Microbiologia*. 2010, Lisboa: Lidel.
38. Prescott, L.M., J.P. Harley and D.A. Klein, *Microbiology*. 5th ed. 2002: McGrawHill. 59.
39. Mussi, M.a., J.a. Gaddy, M. Cabruja, B.a. Arivett, A.M. Viale, et al., *The Opportunistic Human Pathogen Acinetobacter baumannii Senses and Responds to Light*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(24): p. 6336-6345.
40. Siroy, A., P. Cosette, D. Seyer, C. Lemaître-Guillier, D. Vallenet, et al., *Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strain and a reference strain*. Journal of proteome research, 2006. **5**(2): p. 3385-3398.
41. Smith, M.G., T.A. Gianoulis, S. Pukatzki, J.J. Mekalanos, L.N. Ornston, et al., *New insights into Acinetobacter baumannii pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis*. Genes & development, 2007. **21**(1): p. 601-614.

42. Touati, A., W. Achour, A. Cherif, H.B. Hmida, F.B. Afif, et al., *Outbreak of Acinetobacter baumannii in a neonatal intensive care unit: antimicrobial susceptibility and genotyping analysis*. Annals of epidemiology, 2009. **19**(6): p. 372-378.
43. Durmaz, R., B. Otlu, F. Koksall, S. Hosoglu, R. Ozturk, et al., *The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp.* Japanese journal of infectious diseases, 2009. **62**(5): p. 372-377.
44. Tuon, F.F., S.R. Pentead-Filho, D. Amarante, M.A. Andrade and L.A. Borba, *Mortality rate in patients with nosocomial Acinetobacter meningitis from a Brazilian hospital*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2010. **14**(5): p. 437-440.
45. Garnacho-Montero, J., C. Ortiz-Leyba, E. Fernández-Hinojosa, T. Aldabó-Pallás, A. Cayuela, et al., *Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings*. Intensive care medicine, 2005. **31**(5): p. 649-655.
46. Munoz-Price, L.S. and R.A. Weinstein, *Acinetobacter infection*. The New England journal of medicine, 2008. **358**(12): p. 1271-1281.
47. Wisplinghoff, H., M.B. Edmond, M.a. Pfaller, R.N. Jones, R.P. Wenzel, et al., *Nosocomial bloodstream infections caused by Acinetobacter species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility*. Clinical infectious diseases, 2000. **31**(3): p. 690-697.
48. Chen, K.-J., C.-H. Hou, M.-H. Sun, C.-C. Lai, C.-C. Sun, et al., *Endophthalmitis caused by Acinetobacter baumannii: report of two cases*. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(3): p. 1148-1150.
49. Kau, H.-C., C.-C. Tsai, S.-C. Kao, W.-M. Hsu and J.-H. Liu, *Corneal ulcer of the side port after phacoemulsification induced by Acinetobacter baumannii*. Journal of cataract and refractive surgery, 2002. **28**(5): p. 895-897.
50. García-Garmendia, J.L., C. Ortiz-Leyba, J. Garnacho-Montero, F.J. Jiménez-Jiménez, C. Pérez-Paredes, et al., *Risk factors for Acinetobacter baumannii nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study*. Clinical infectious diseases, 2001. **33**(7): p. 939-946.
51. Fournier, P.E. and H. Richet, *The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities*. Clinical infectious diseases, 2006. **42**(5): p. 692-699.
52. Dorsey, C.W., A.P. Tomaras, P.L. Connerly, M.E. Tolmasky, J.H. Crosa, et al., *The siderophore-mediated iron acquisition systems of Acinetobacter baumannii ATCC 19606 and Vibrio anguillarum 775 are structurally and functionally related*. Microbiology, 2004. **150**: p. 3657-3667.
53. Mihara, K., T. Tanabe, Y. Yamakawa, T. Funahashi, H. Nakao, et al., *Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by Acinetobacter baumannii ATCC 19606T*. Microbiology, 2004. **150**(9): p. 2587-2597.
54. Lee, H.-W., Y.M. Koh, J. Kim, J.-C. Lee, Y.-C. Lee, et al., *Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces*. Clinical microbiology and infection, 2008. **14**(1): p. 49-54.

55. Gaddy, J.A., A.P. Tomaras and L.A. Actis, *The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells*. Infection and immunity, 2009. **77**(8): p. 3150-3160.
56. Choi, C.H., E.Y. Lee, Y.C. Lee, T.I. Park, H.J. Kim, et al., *Outer membrane protein 38 of Acinetobacter baumannii localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells*. Cellular microbiology, 2005. **7**(8): p. 1127-1138.
57. de Breij, A., L. Dijkshoorn, E. Lagendijk, J. van der Meer, A. Koster, et al., *Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of Acinetobacter baumannii?* PloS one, 2010. **5**(5): p. e10732.
58. Cevahir, N., M. Demir, I. Kaleli, M. Gurbuz and S. Tikvesli, *Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in Acinetobacter baumannii strains*. Journal of microbiology, immunology, and infection, 2008. **41**(6): p. 513-518.
59. King, L.B., E. Swiatlo, A. Swiatlo and L.S. McDaniel, *Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. FEMS immunology and medical microbiology, 2009. **55**(3): p. 414-421.
60. Gaddy, J.A. and L.A. Actis, *Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation*. Future microbiology, 2009. **4**(3): p. 273-278.
61. Kayser, F.H., *General Bacteriology*, in *Medical Microbiology*, K.A.B. F.H. Kayser, J. Eckert, R.M. Zinkernagel, Editor. 2005, Thieme: New York. p. 187-202.
62. Sousa, J.C.d., *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. 2ª Edição ed. 2006, Porto: Universidade Fernando Pessoa.
63. Donlan, R.M., *Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process*. Clinical infectious diseases, 2001. **33**(8): p. 1387-1392.
64. Donlan, R.M., *Biofilms and device-associated infections*. Emerging infectious diseases, 2001. **7**(2): p. 277-281.
65. Raad, I., R. Reitzel, Y. Jiang, R.F. Chemaly, T. Dvorak, et al., *Anti-adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2008. **62**(4): p. 746-750.
66. O'Toole, G., H.B. Kaplan and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*. Annual Reviews in Microbiology, 2000. **54**: p. 49-79.
67. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(2): p. 167-193.
68. Costerton, J., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, et al., *Biofilms, the customized microniche*. Journal of bacteriology, 1994. **176**(8): p. 2137-2142.
69. Tomaras, A.P., M.J. Flagler, C.W. Dorsey, J.a. Gaddy and L.a. Actis, *Characterization of a two-component regulatory system from Acinetobacter baumannii that controls biofilm formation and cellular morphology*. Microbiology, 2008. **154**: p. 3398-3409.
70. Davey, M.E. and G.a. O'toole, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiology and molecular biology reviews, 2000. **64**: p. 847-867.

71. Swift, S., J.P. Throup, P. Williams, G.P. Salmond and G.S. Stewart, *Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype*. Trends in biochemical sciences, 1996. **21**: p. 214-219.
72. James, G.a., L. Beaudette and J.W. Costerton, *Interspecies bacterial interactions in biofilms*. Journal of Industrial Microbiology, 1995. **15**: p. 257-262.
73. Stanley, N.R. and B.a. Lazazzera, *Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation*. Molecular microbiology, 2004. **52**: p. 917-924.
74. Rodriguez-Bano, J., S. Marti, S. Soto, F. Fernández-Cuenca, J. Cisneros, et al., *Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications*. Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**: p. 276-278.
75. Huigens, R.W., L. Ma, C. Gambino, P.D.R. Moeller, A. Basso, et al., *Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives*. Molecular bioSystems, 2008. **4**: p. 614-621.
76. Huigens, R.W., S.a. Rogers, A.T. Steinhauer and C. Melander, *Inhibition of Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation with a class of TAGE-triazole conjugates*. Organic & biomolecular chemistry, 2009. **7**: p. 794-802.
77. Nostro, A., A. Sudano Roccaro, G. Bisignano, A. Marino, M.a. Cannatelli, et al., *Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms*. Journal of medical microbiology, 2007. **56**: p. 519-523.
78. He, M., M. Du, M. Fan and Z. Bian, *In vitro activity of eugenol against Candida albicans biofilms*. Mycopathologia, 2007. **163**: p. 137-143.
79. Kwieciński, J., S. Eick and K. Wójcik, *Effects of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil on Staphylococcus aureus in biofilms and stationary growth phase*. International journal of antimicrobial agents, 2009. **33**: p. 343-347.
80. Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, *Biological effects of essential oils--a review*. Food and chemical toxicology, 2008. **46**: p. 446-475.
81. Singh, G., I.P.S. Kapoor, S.K. Pandey, U.K. Singh and R.K. Singh, *Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices*. Phytotherapy research : PTR, 2002. **16**: p. 680-682.
82. Ozek, G., F. Demirci, T. Ozek, N. Tabanca, D.E. Wedge, et al., *Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from Salvia rosifolia Sm., and evaluation for biological activity*. Journal of chromatography. A, 2010. **1217**: p. 741-748.
83. Eikani, M., F. Golmohammad and S. Rowshanzamir, *Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (Coriandrum sativum L.)*. Journal of Food Engineering, 2007. **80**: p. 735-740.
84. Delaquis, P.J., K. Stanich, B. Girard and G. Mazza, *Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils*. International journal of food microbiology, 2002. **74**: p. 101-109.

85. Tohidpour, a., M. Sattari, R. Omidbaigi, a. Yadegar and J. Nazemi, *Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Phytomedicine, 2010. **17**(2): p. 142-145.
86. Hammer, K.a., C.F. Carson and T.V. Riley, *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of applied microbiology, 1999. **86**: p. 985-990.
87. Faleiro, M.L., M.G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venâncio, R. Tavares, et al., *Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus*. Letters in applied microbiology, 2003. **36**: p. 35-40.
88. Grosso, C., J.a. Coelho, J.S. Urieta, A.n.M.F. Palavra and J.G. Barroso, *Herbicidal Activity of Volatiles from Coriander, Winter Savory, Cotton Lavender, and Thyme Isolated by Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010: p. 11007-11013.
89. Burdock, G.a. and I.G. Carabin, *Safety assessment of coriander (Coriandrum sativum L.) essential oil as a food ingredient*. Food and chemical toxicology, 2009. **47**: p. 22-34.
90. Wangensteen, H., a. Samuelsen and K. Malterud, *Antioxidant activity in extracts from coriander*. Food Chemistry, 2004. **88**: p. 293-297.
91. Rattanachaiakunsopon, P. and P. Phumkhachorn, *Potential of Coriander (Coriandrum sativum) Oil as a Natural Antimicrobial Compound in Controlling Campylobacter jejuni in Raw Meat*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010. **74**: p. 31-35.
92. Hemaiswarya, S., A.K. Kruthiventi and M. Doble, *Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases*. Phytomedicine, 2008. **15**: p. 639-52.
93. White, R.L., D.S. Burgess, M. Manduru and J.a. Bosso, *Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1996. **40**: p. 1914-1918.
94. Verma, P., *Methods for Determining Bactericidal Activity and Antimicrobial Interactions: Synergy Testing, Time-Kill Curves, and Population Analysis.*, in *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, L.S.-M. Richard Schwalbe, Avery C. Goodwin, Editor. 2007, Taylor & Francis Group: New York. p. 275-298.
95. Wagner, H. and G. Ulrich-Merzenich, *Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals*. Phytomedicine, 2009. **16**: p. 97-110.
96. D'Arrigo, M., G. Ginestra, G. Mandalari, P.M. Furneri and G. Bisignano, *Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Phytomedicine, 2010. **17**: p. 317-322.
97. Rosato, A., C. Vitali, M. Piarulli, M. Mazzotta, M.P. Argentieri, et al., *In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of Origanum vulgare and Pelargonium graveolens against some Candida species*. Phytomedicine, 2009. **16**: p. 972-975.
98. Silva, F., S. Ferreira, A. Duarte, D.I. Mendonça and F.C. Domingues, *Antifungal activity of Coriandrum sativum essential oil, its mode of action against Candida species and potential synergism with amphotericin B*. Phytomedicine, 2011. Em publicação.

99. Vuuren, S.F.v., S. Suliman and a.M. Viljoen, *The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials*. Letters in applied microbiology, 2009. **48**: p. 440-446.
100. Wang, H.-M., C.-Y. Chen, H.-A. Chen, W.-C. Huang, W.-R. Lin, et al., *Zingiber officinale (ginger) compounds have tetracycline-resistance modifying effects against clinical extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii*. Phytotherapy research, 2010. **24**: p. 1825-1830.
101. NCCLS, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. M7-A6. 2003.
102. Chen, C.-Y., G.W. Nace and P.L. Irwin, *A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli*. Journal of Microbiological Methods, 2003. **55**: p. 475-479.
103. Simões, L.C., M. Simões and M.J. Vieira, *Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 2010. **98**(3): p. 317-329.
104. Sousa, C., P. Teixeira and R. Oliveira, *The role of extracellular polymers on Staphylococcus epidermidis biofilm biomass and metabolic activity*. Journal of Basic Microbiology, 2009. **49**: p. 363-370.
105. Tomaras, A.P., C.W. Dorsey, R.E. Edelman and L.A. Actis, *Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system*. Microbiology, 2003. **149**: p. 3473-3484.
106. Rashid, M.H. and a. Kornberg, *Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa*. PNAS, 2000. **97**: p. 4885-4890.
107. Sovadinova, I., E.F. Palermo, R. Huang, L.M. Thoma and K. Kuroda, *Mechanism of polymer-induced hemolysis: nanosized pore formation and osmotic lysis*. Biomacromolecules, 2011. **12**: p. 260-268.
108. Qaiyumi, S., *Macro- and Microdilution Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing*, in *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, L.S.-M. Richard Schwalbe, Avery C. Goodwin, Editor. 2007, Taylor & Francis Group: New York. p. 75-79.
109. Valentine, S.C., D. Contreras, S. Tan, L.J. Real, S. Chu, et al., *Phenotypic and molecular characterization of Acinetobacter baumannii clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California*. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**: p. 2499-2507.
110. Hood, M.I., A.C. Jacobs, K. Sayood, P.M. Dunman and E.P. Skaar, *Acinetobacter baumannii increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(3): p. 1029-1041.
111. Finberg, R.W., R.C. Moellering, F.P. Tally, W.A. Craig, G.A. Pankey, et al., *The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease*. Clinical infectious diseases, 2004. **39**: p. 1314-1320.
112. Chambers, H.F., *Bactericidal vs. Bacteriostatic Antibiotic Therapy: A Clinical Mini-Review*. Clinical Infectious Diseases, 2003. **VI**(4): p. 1-4.

113. Kubo, I., K.-I. Fujita, A. Kubo, K.-I. Nihei and T. Ogura, *Antibacterial activity of coriander volatile compounds against Salmonella choleraesuis*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. **52**(11): p. 3329-3332.
114. Gustafson, J.E., Y.C. Liew, S. Chew, J. Markham, H.C. Bell, et al., *Effects of tea tree oil on Escherichia coli*. Letters in applied microbiology, 1998. **26**: p. 194-198.
115. Longbottom, C.J., C.F. Carson, K.a. Hammer, B.J. Mee and T.V. Riley, *Tolerance of Pseudomonas aeruginosa to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2004. **54**: p. 386-392.
116. Carson, C.F., B.J. Mee and T.V. Riley, *Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**: p. 1914-1920.
117. Wang, H.M., C.Y. Chen, H.A. Chen, W.C. Huang, W.R. Lin, et al., *Zingiber officinale (ginger) compounds have tetracycline-resistance modifying effects against clinical extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii*. Phytother Res. **24**(12): p. 1825-30.
118. Lorenzi, V., A. Muselli, A.F. Bernardini, L. Berti, J.M. Pages, et al., *Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(5): p. 2209-2211.
119. Rosato, A., M. Piarulli, F. Corbo, M. Muraglia, A. Carone, et al., *In Vitro Synergistic Action of Certain Combinations of Gentamicin and Essential Oils*. Current Medicinal Chemistry, 2010. **17**(28): p. 3289-3295.
120. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **94**(3): p. 223-253.
121. Gill, a.O. and R.a. Holley, *Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics*. International journal of food microbiology, 2006. **108**: p. 1-9.
122. Moon, S.-E., H.-Y. Kim and J.-D. Cha, *Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria*. Archives of Oral Biology, 2011, in press.
123. Nucleo, E., L. Steffanoni, G. Fugazza, R. Migliavacca, E. Giacobone, et al., *Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of Acinetobacter baumannii*. BMC microbiology, 2009. **9**: p. 270-284.
124. Choi, A.H.K., L. Slamti, F.Y. Avci, G.B. Pier and T. Maira-Litrán, *The pgaABCD locus of Acinetobacter baumannii encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation*. Journal of bacteriology, 2009. **191**: p. 5953-5963.
125. Peeters, E., H.J. Nelis and T. Coenye, *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates*. Journal of microbiological methods, 2008. **72**: p. 157-165.
126. Hawser, S.P., H. Norris and C.J. Jessup, *Comparison of a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfo-phenyl)-5-[(Phenyl-amino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT)*

Colorimetric Method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of Testing Clinical Yeast Isolates for Susceptibility to Antifungal Agents. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(5): p. 1450-1452.

127. Kuhn, D., M. Balkis, J. Chandra, P. Mukherjee and M. Ghannoum, *Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism.* Journal of clinical microbiology, 2003. **41**: p. 506-508.
128. Cerca, N., S. Martins, F. Cerca, K.K. Jefferson, G.B. Pier, et al., *Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **56**(2): p. 331-336.
129. Nuryastuti, T., H.C. van der Mei, H.J. Busscher, S. Irvati, A.T. Aman, et al., *Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis.* Applied and environmental microbiology, 2009. **75**: p. 6850-6855.
130. Aiensaard, J., S. Aiumlamai, C. Aromdee, S. Taweechaisupapong and W. Khunkitti, *The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on Staphylococcus aureus DMST 4745.* Research in veterinary science, 2011: p. 1-7.
131. Sandasi, M., C.M. Leonard and A.M. Viljoen, *The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against Listeria monocytogenes.* Letters in applied microbiology. **50**: p. 30-35.
132. Sechi, L.A., A. Karadenizli, A. Deriu, S. Zanetti, F. Kolayli, et al., *PER-1 type beta-lactamase production in Acinetobacter baumannii is related to cell adhesion.* Medical science monitor, 2004. **10**: p. BR180.
133. Rao, R., R. Karthika, S. Singh, P. Shashikala, R. Kanungo, et al., *Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii.* Indian Journal of Medical Microbiology, 2008. **26**(4): p. 333-337.
134. Shrout, J.D., D.L. Chopp, C.L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, et al., *The impact of quorum sensing and swarming motility on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation is nutritionally conditional.* Molecular microbiology, 2006. **62**: p. 1264-1277.
135. McQueary, C.N. and L.A. Actis, *Acinetobacter baumannii biofilms: Variations among strains and correlations with other cell properties.* Journal of microbiology, 2011. **49**(2): p. 243-250.
136. Dorman, H.J. and S.G. Deans, *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.* Journal of applied microbiology, 2000. **88**: p. 308-316.