



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAYANE CRISTINE SANTOS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EMULSÕES FORMULADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetragastris catuaba*
CUNHA. (BURSERACEAE)**

Recife
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAYANE CRISTINE SANTOS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EMULSÕES FORMULADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetragastris catuaba*
CUNHA. (BURSERACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giovanna Machado

Co-orientadora: Dr^ª. Isabel Renata de Souza Arruda

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Rayane Cristine Santos da

Caracterização química e avaliação da atividade biológica de emulsões formuladas com óleo essencial de *Tetragastris catuaba* Cunha. (Burseraceae) / Rayane Cristine Santos da Silva. – 2018.

95 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Giovanna Machado.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Renata de Souza Arruda.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Plantas medicinais 2. Agentes anti-infecciosos 3. Câncer. I. Machado, Giovana (Orientadora). II. Arruda, Isabel Renata de Souza (Coorientadora). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 421

RAYANE CRISTINE SANTOS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EMULSÕES FORMULADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetragastris catuaba*
CUNHA. (BURSERACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Giovanna Machado (Orientadora)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Prof^ª. Dr^ª Clarissa Piccinin Frizzo
Departamento de Química - UFSM

Prof^ª. Dr^ª Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof^ª. Dr^º Paulo Euzébio Cabral Filho
Departamento de Biofísica – UFPE

Dr^ª Germana Michelle de Medeiros e Silva
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Recife
2018

*Dedico este trabalho à minha família, meu pai (in memoriam), minha mãe e minha irmã.
Minhas maiores conquistas foram sustentadas e celebradas em família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, pelo direcionamento dos meus passos e por todo favor oferecido. Até aqui me ajudou o Senhor.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Giovanna Machado, por todo incentivo, apoio e ensino. Obrigada por acreditar em mim e por ser um exemplo de força e determinação tão importante.

A minha co-orientadora Dr^a Isabel Arruda pela ajuda nos experimentos, pelo suporte quando as coisas não davam certo e por me ajudar a pensar em uma coisa de cada vez.

A Carolina Malafaia pelo treinamento e colaboração nos experimentos microbiológicos, e por sempre estar disponível para ajudar.

A Wesley Felix pela ajuda em todos os experimentos de citotoxicidade, pela paciência e colaboração.

As professoras Tereza Correia e Marcia Vanuza pela colaboração.

A professora Clarissa Frizzo pela disponibilidade em ceder o Líquido iônico.

A Alexandre Gomes pela identificação botânica.

Ao professor Paulo Euzébio pelas contribuições tão importantes no desenvolvimento do trabalho.

A Paloma Barreto pela amizade e contribuição em todas as vezes em que pedi ajuda.

Aos colegas do laboratório de Nanotecnologia que de forma direta ou indireta me ajudaram.

Aos amigos Daniela e Whanderson pelas conversas e ajuda nos momentos difíceis.

As amigas Patricia, Camila, Kamilla, Suyana, Beatriz e Fernanda que estiveram presentes no início dessa jornada e se fazem até hoje.

Ao Laboratório de Produtos Naturais e ao Professor Nicácio Henrique por ceder o espaço para extração de óleo essencial.

Aos técnicos e laboratórios do CETENE pela concessão da estrutura para realização do trabalho.

A FACEPE pela concessão da bolsa.

Agradeço especialmente a minha mãe e irmã que estiveram presentes em todos os momentos, me apoiando nos momentos mais difíceis e me incentivando a avançar.

RESUMO

Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário vegetal que frequentemente atuam na defesa das plantas contra patógenos e herbívoros. Devido às suas características naturais, diversos estudos relatam a aplicação de óleos essenciais na medicina, indústria alimentícia e outros. As emulsões são sistemas promissores de transporte de compostos cujo principal objetivo é promover o encapsulamento de substâncias garantindo a proteção e o controle de liberação. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antitumoral de nanoemulsões formuladas com o óleo essencial (OE) de *Tetragastris catuaba* (Burseraceae), bem como de seu composto majoritário, o β -cariofileno. Para tal, o óleo essencial foi extraído através de um sistema de hidrodestilação e caracterizado através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). As nanoemulsões foram formuladas a partir de um sistema contendo uma mistura de tensoativos, líquido iônico, o óleo essencial ou o β -cariofileno e água. A avaliação da atividade antitumoral foi realizada com células de câncer cervical (HeLa) através do ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT, e a avaliação do mecanismo de morte foi realizada com marcadores Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo. A CG-EM apresentou 54 compostos na composição do OE, sendo o β -cariofileno o componente majoritário (25,6%). A nanoemulsão do OE apresentou tamanho de partícula de $23,7 \pm 0,37$ nm e a nanoemulsão do β -cariofileno de $31,2 \pm 1,24$ nm. As atividades antimicrobiana e antibiofilme revelaram que para o OE livre e sua nanoemulsão, houve redução significativa ($p < 0,05$) do crescimento planctônico e do biofilme de *L. monocytogenes* e *E. faecalis*. Porém, para o β -cariofileno livre a atividade antimicrobiana e antibiofilme foi observada apenas contra *E. faecalis*, e para sua nanoemulsão apenas redução do crescimento planctônico. A atividade citotóxica contra células de câncer cervical revelou que o OE, o β -cariofileno e suas respectivas nanoemulsões ativam mecanismos de morte por apoptose nessas células, com valores de CC_{50} de 28,68 μ g/mL para o OE, 43,08 μ g/mL para o β -cariofileno, 34,60 μ g/mL para a nanoemulsão do OE e 31,67 μ g/mL para a nanoemulsão do β -cariofileno. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que o óleo essencial de *T. catuaba* é uma fonte promissora de compostos antimicrobianos e anticancerígenos, e que as nanoemulsões formuladas destes podem ser uma boa alternativa para futuras aplicações no campo da saúde e medicina.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Câncer. Biofilmes. Bactérias. Nanoemulsões.

ABSTRACT

Essential oils are volatile compounds produced by secondary plant metabolism that often act to defend plants against pathogens and herbivores. Due to their natural characteristics, several studies report the application of essential oils in medicine, food industry, perfumery, cosmetics and others. Emulsions are promising systems that transports compounds whose main objective is to promote the encapsulation of substances ensuring the protection and control of release. The present work aims to evaluate the antimicrobial and antitumor activity of nanoemulsions formulated with the essential oil (EO) of *Tetragastris catuaba* (Burseraceae), as well as its major compound, β -caryophyllene. For this, the essential oil was extracted through a hydrodistillation system and characterized by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). Nanoemulsions were formulated from a system containing a mixture of surfactants, ionic liquid, essential oil or β -caryophyllene and water. The evaluation of antitumor activity was performed with cervical cancer cells (HeLa) through the cytotoxicity assay by the MTT method and evaluation of the mechanism of death was performed with Annexin V-FITC and Propidium Iodide. GC-MS presented 54 compounds in the composition of EO, with β -caryophyllene being the major component (25.6%). The EO nanoemulsion had a particle size of $23.7\pm 0.37\text{nm}$ and the β -caryophyllene nanoemulsion of $31.2 \pm 1.24\text{nm}$. The antimicrobial and antibiofilm activities revealed that for free EO and its nanoemulsion, there was a significant ($p < 0.05$) reduction of planktonic growth and biofilm formation of *L. monocytogenes* and *E. faecalis*. However, for the free β -caryophyllene the antimicrobial and antibiofilm activity was observed only against *E. faecalis*, and for its nanoemulsion only reduction of the planktonic growth. The cytotoxic activity against cervical cancer cells revealed that EO, β -caryophyllene and their respective nanoemulsions activate mechanisms of apoptosis death in these cells, with CC_{50} values of $28.68 \mu\text{g/mL}$ for EO, $43.08 \mu\text{g/mL}$ for β -caryophyllene, $34.60 \mu\text{g/mL}$ for EO nanoemulsion and $31.67 \mu\text{g/mL}$ for β -caryophyllene nanoemulsion. Thus, the results obtained demonstrate that the essential oil of *T. catuaba* is a promising source of antimicrobial and anticancer compounds, and formulating nanoemulsions can be a good alternative for future applications in the field of health and medicine.

Key words: Essential oils. Cancer. Biofilms. Bacteria. Nanoemulsions.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1 - Óleoresina exsudada do tronco de espécies de <i>Protium</i> (Família Bruseraceae).....	20
Figura 2 - Mapa da distribuição de espécies de <i>Tetragastris</i> no Leste do Brasil.....	20
Figura 3 - Estrutura química de monoterpenos e sesquiterpenos comumente encontrados em óleos essenciais.....	22
Figura 4 - Sistemas baseados em emulsões.....	25
Figura 5 - Esquema ilustrativo das etapas da formação de biofilme, sendo representada a adesão, maturação e dispersão das células.....	29

Artigo 1

Figura 1 - Estrutura química do líquido iônico derivado de serina.....	50
Figura 2 - Aparência visual das nanoemulsões preparadas com o óleo essencial de <i>Tetragastris catuaba</i> (A) e seu composto majoritário, β -cariofileno (B)...	57
Figura 3 - Aspectos visuais das nanoemulsões formuladas com β -cariofileno em 0h (A) e após 24h (B).....	58
Figura 4 - Curvas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras do óleo essencial e <i>Tetragastris catuaba</i> e β -cariofileno livres.....	59
Figura 5 - Curvas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras das nanoemulsões do óleo essencial e <i>Tetragastris catuaba</i> e do β -cariofileno.....	60
Figura 6 - Micrografias obtidas por MET de nanoemulsões contendo o óleo essencial de <i>T. catuaba</i> (A) e β -cariofileno (B).....	62
Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	66

LISTA DE FIGURAS

Artigo 2

Figura 1 -	Efeito citotóxico em células HeLa submetidas ao tratamento em diferentes concentrações das amostras após 72h de incubação.....	80
Figura 2 -	Análise de citometria de fluxo para determinação de apoptose e necrose em células de HeLa submetidas a diferentes tratamentos por 72h.....	82
Figura 3 -	Morfologia celular de HeLa submetidas a diferentes tratamentos após 72h de incubação.....	84

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1 -	Características dos diferentes tipos de emulsões.....	25
------------	---	----

Artigo 1

Tabela 1 -	Identificação dos constituintes do óleo essencial obtido de folhas de <i>Tetragastris catuaba</i>	54
Tabela 2 -	Propriedades físicoquímicas nanoemulsões formuladas com o óleo essencial de <i>Tetragastris catuaba</i> e β -cariofileno.....	61
Tabela 3 -	Atividade biológica de óleo essencial (OE), β -Cariofileno (BC) e suas respectivas nanoemulsões contra a formação de biofilme e crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C/min	Graus célsius por minuto
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Micro litro
µm	Micrometro
AN	Anexina
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BC	β-cariofileno
BHI	Brain heart infusion
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC ₅₀	Concentração Citolóxica 50%
CG/EM	Cromatografia gasosa/espectrometria de massas
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
eV	Elétrons-volt
g	Gramas
HPV	Human papiloma vírus
IP	Iodeto de propídeo
L	Litros
m	Metro
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitro
mm	Milímetro
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
OE	Óleo essencial
PBS	Solução Fosfato Salina
PDI	Índice de polidispeção
pH	Potencial Hidrogeniônico
SFB	Soro Fetal Bovino
Span 80	Monooleato de sorbitano
TG	Termogravimetria
Tween 80	Polissorbato 80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	<i>TETRAGASTRIS CATUABA</i> : CONSIDERAÇÕES SOBRE FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE.....	17
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
2.3	EMULSÕES.....	21
2.4	BIOFILMES BACTERIANOS.....	24
2.4.1	Etapas da formação do biofilme.....	26
2.4.2	Biofilmes na indústria de alimentos.....	27
2.4.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.4.2.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	31
2.5	CÂNCER CERVICAL.....	31
3	RESULTADOS.....	34
3.1	ARTIGO 1 - Ação de nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>Tetragastris catuaba</i> (Burseraceae) sobre crescimento e produção de biofilmes bacterianos importantes na indústria alimentícia.....	34
3.2	ARTIGO 2 - Atividade antitumoral de nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>Tetragastris catuaba</i> (Burseraceae) em células de câncer cervical humano.....	61
4	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF HOSPITAL INFECTIONS.....	85
	APÊNDICE B - DADOS DE RMN DE ¹H DO LÍQUIDO IÔNICO.....	92
	APÊNDICE C - ESPECTROS DE MASSA DO LÍQUIDO IÔNICO.....	93
	APÊNDICE D - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO LÍQUIDO IÔNICO.....	94
	APÊNDICE E - CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DO LÍQUIDO IÔNICO.....	95

1 INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de produzir uma grande diversidade de compostos moleculares conhecidos como metabólitos secundários. Diferente dos metabólitos primários, que são fundamentais à vida da planta (carboidratos, amino ácidos, lipídeos, ácidos nucleicos, etc.), os metabólitos secundários foram inicialmente considerados não essenciais, uma vez que a sua função era desconhecida (SCHIMIDT; CHENG, 2017). Contudo, milhares de metabólitos secundários já foram isolados e sabe-se que tais compostos evoluíram em diferentes linhagens de plantas atuando, por exemplo, como sinalizadores químicos para polinização e como compostos tóxicos contra patógenos e herbívoros, conferindo adaptação e defesa à planta em seu ambiente (PICHERSKY; GANG, 2000). Com o avanço da tecnologia, os compostos naturais se tornaram uma fonte de recursos para a indústria e a medicina. Diversos metabólitos secundários são comercialmente importantes, como por exemplo, a cafeína (estimulante), a vanilina (flavorizante), os óleos essenciais (aromatizantes), a morfina e a cocaína (alucinógenos, anestésicos), a piretrina (inseticidas), a vincristina e a vimblastina (anticâncer) (BALANDRIN et al., 1985; ROBBINS, 2000). Além disso, as plantas são utilizadas na medicina tradicional há séculos para o tratamento de enfermidades, e esse conhecimento etnobotânico tem se tornado a base para a bioprospecção de novos fármacos de origem vegetal (GARNATJE; PEÑUELAS; VALLÈS, 2017).

De forma geral, os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos, os compostos fenólicos, os terpenos e esteroides, e os alcaloides (BOURGAUD et al., 2001). Dentre estes grupos, estão os óleos essenciais, que em sua maioria são constituídos de terpenos e fenilpropanóides (OMONJO et al., 2017). Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, são compostos de baixo ponto de ebulição, tipicamente líquidos e oleosos, que conferem características aromáticas às plantas (BRENES; ROURA, 2010). Esses óleos são notáveis por possuírem propriedades biológicas, apresentando atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, e outras, comprovadas pela literatura (ACAMOVIC; BROOKER, 2005). A atividade antimicrobiana é bem pronunciada para os óleos essenciais, e em seu trabalho de revisão Ayala-Zavala e colaboradores (2009) listaram 10 óleos essenciais de plantas comestíveis com atividade contra diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas, sugerindo seu uso como conservantes de alimentos. A atividade contra células tumorais também tem sido bastante estudada, havendo relatos da atividade de óleos essenciais contra linhagens celulares de câncer oral, de pulmão, mama, ovário, próstata, pele e outros (PATEL; GOGNA, 2015).

Devido as suas características físico-químicas como volatilidade e lipofilicidade, a aplicação dos óleos essenciais se torna limitada, dessa forma sistemas de encapsulamento que confiram proteção a esses compostos podem atuar melhorando a estabilidade, dispersão e até mesmo a atividade dos óleos essenciais (ASBAHANI et al., 2015). Nesse contexto, emulsões óleo em água são amplamente empregadas como sistemas de transporte de componentes lipofílicos (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). Dentre as emulsões, as nanoemulsões destacam-se por serem sistemas com tamanho de partícula entre 20 e 100 nm, apresentando maior estabilidade a separação e coalescência que emulsões convencionais (MCCLEMENTS, 2011, 2015). Esses sistemas tem ganhado importância em indústrias de alimentos e farmacêutica pela capacidade de encapsular elementos lipofílicos como óleos, vitaminas, conservantes e medicamentos (MCCLEMENTS, 2011).

Dessa maneira, no presente trabalho o óleo essencial de *Tetragastris catuaba* Cunha. (Burseraceae) foi extraído e nanoemulsões foram formuladas a fim de avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica desses compostos livres e encapsulados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo identificar a composição química e avaliar o potencial antimicrobiano, antibiofilme e citotóxico do óleo essencial de *Tetragastris catuaba* Cunha. (Burseraceae) através da formulação e caracterização de nanoemulsões.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Extrair óleos essenciais de *Tetragastris catuaba* através de hidrodestilação em aparato de Clevenger;
- Realizar a identificação da composição química do óleo essencial através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas;
- Elaborar e caracterizar nanoemulsões do óleo essencial e de seu composto majoritário;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial, seu composto majoritário e suas respectivas nanoemulsões, contra bactérias patogênicas que se destacam em indústrias de alimentos;

- Avaliar a atividade citotóxica do óleo essencial, seu composto majoritário e suas respectivas nanoemulsões contra células de linhagem de câncer cervical;
- Escrever artigo de revisão sistemática sobre o impacto dos biofilmes bacterianos para saúde.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

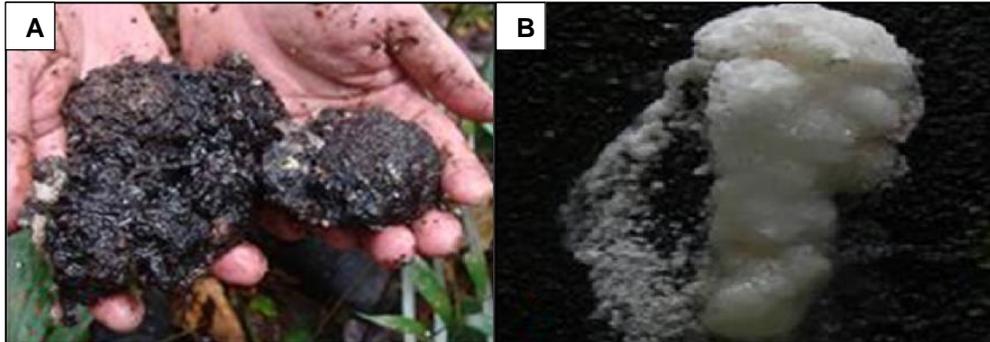
2.1 *TETRAGASTRIS CATUABA*: CONSIDERAÇÕES SOBRE FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE

A família Burseraceae inclui cerca de 20 gêneros e 500 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo ainda representada por alguns táxons em regiões temperadas quentes (SOUZA; LORENZI, 2008). No Brasil ocorrem cerca de 60 espécies, das quais a grande maioria é nativa da região amazônica (SOUZA; LORENZI, 2008). A família pertence à ordem Sapindales e é dividida em três tribos, Canarieae, Protieae e Bursereae (WEEKS; DALY; SIMPSON, 2005). Todas as tribos encontram-se distribuídas entre os trópicos da América, África e Indo Ásia, possuindo maior diversidade de gêneros na região Sul do hemisfério.

Uma das principais características diagnósticas para o reconhecimento das Burseraceae é o forte aroma exalado pelas suas cascas e folhas. Algumas de suas espécies são conhecidas pela produção de óleos essenciais e resinas, sendo essa uma das principais propriedades de valor econômico da família (CRAVEIRO et al., 1981; SOUZA; LORENZI, 2008). Um grande número de resinas produzidas por espécies da família Burseraceae são conhecidas como “Elemi”, e são utilizadas na preparação de vernizes e ceras, as quais são empregadas na produção de brinquedos, móveis e instrumentos (DE LA CRUZ-CAÑIZARES et al., 2005). O Elemi brasileiro é uma resina translúcida e perfumada, proveniente da exsudação dos troncos de várias espécies do gênero *Icica* e *Protium* (DE LA CRUZ-CAÑIZARES et al., 2005). O gênero *Protium*, por exemplo, produz certos tipos de resinas que são empregadas para fins artísticos, como o balsamo de *Protium canara*, que é utilizado para produção de incensos e vernizes (DE LA CRUZ-CAÑIZARES et al., 2005).

Os óleos essenciais de algumas espécies de Burseraceae podem ser extraídos a partir das resinas exsudadas do tronco das árvores, as quais podem conter cerca de 30% desses óleos voláteis (RÜDIGER; SIANI; VEIGA JUNIOR, 2007). Em sua pesquisa, Silva e colaboradores (2016) estudaram a composição dos óleos essenciais extraídos do breu branco e do breu preto de seis espécies de *Protium*, relatando que os monoterpenos α -pineno, limoneno, β -felandreno, *p*-cimeno e α -termineol foram encontrados em comum no óleo essencial das espécies estudadas (Fig. 1).

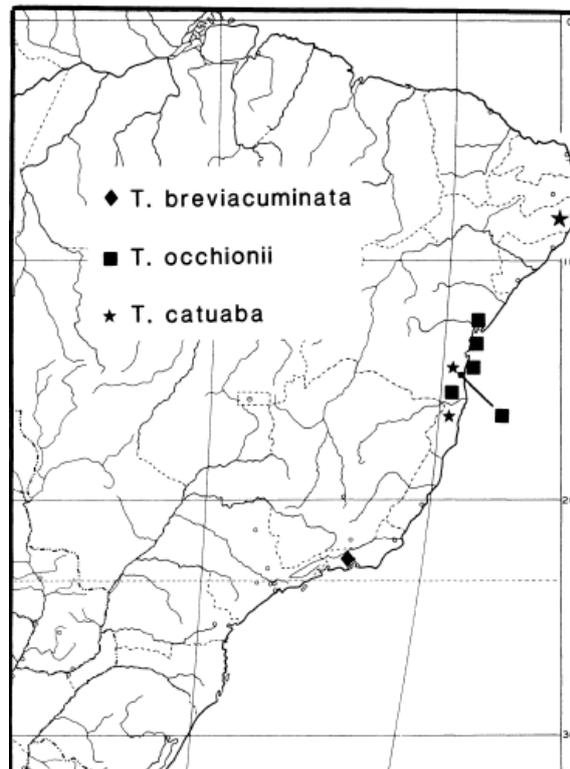
Figura 1: Óleo-resina exsudada do tronco de espécies de *Protium* (Família Burseraceae). A- Breu preto; B- Breu branco.



Fonte: Silva et al., 2016.

O gênero *Tetragastris* pertence à tribo *Protieae* e é um gênero estreitamente relacionado à *Protium* (DALY, 1990). *Tetragastris* é geralmente encontrado em florestas úmidas de baixa altitude na América Central, no norte da América do Sul e em algumas partes do Caribe (DALY, 1990). Em seu estudo, Daly (1990) reconheceu nove espécies para este gênero, havendo a ocorrência de três espécies no leste do Brasil, sendo estas *T. breviacuminata* Swarte (Rio de Janeiro), *T. catuaba* Cunha (Bahia e Pernambuco) e *T. occhionii* (Rizzini) Daly (Bahia) como mostra a figura 2.

Figura 2: Mapa da distribuição de espécies de *Tetragastris* no Leste do Brasil.



Fonte: Daly 1990.

A espécie *Tetragastris catuaba* é uma árvore de médio a grande porte, rara e restritamente distribuída em florestas úmidas de baixa latitude (DALY, 1990). Popularmente esta espécie pode ser conhecida como Catuaba, contudo, existem diferentes espécies com esse nome popular, pertencentes a diferentes famílias botânicas. As mais populares são *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae), *Tetragastris catuaba* e *Trichilia catigua* (Maliaceae) (LORENZI; MATOS, 2002). A catuaba é frequentemente utilizada na medicina popular no Brasil devido a suas propriedades analgésicas, de estímulo ao sistema nervoso central, tônica e afrodisíaca (DALY, 1990). Porém, estudos investigando as atividades biológicas de *Tetragastris catuaba* são escassos.

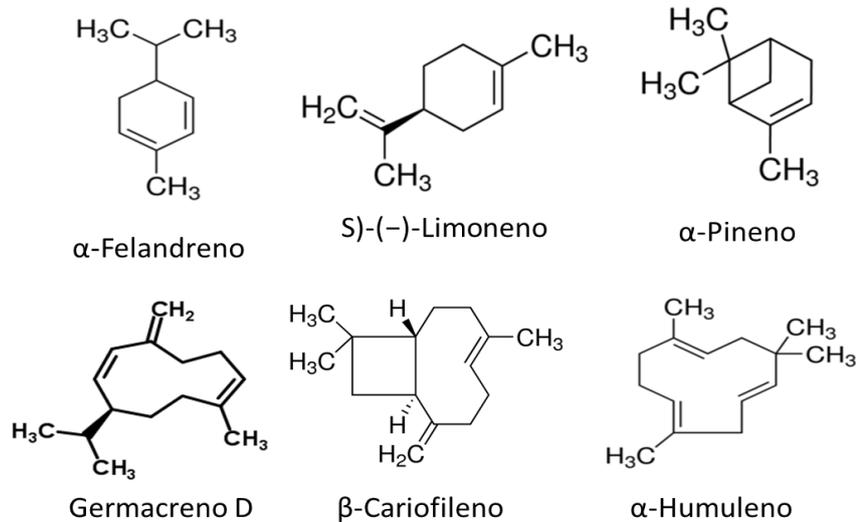
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são formados por uma mistura complexa de compostos naturais voláteis produzidos por determinadas espécies vegetais, os quais conferem suas características aromáticas devido ao seu odor (ALMEIDA; MOTTA; LEITE, 2003). Esses óleos geralmente são produzidos por estruturas secretoras especializadas tais como tricomas glandulares, células parenquimáticas, canais oleíferos e bolsas específicas, podendo ser encontrados em diversos órgãos da planta como flores, folhas, cascas, raízes, rizomas, frutos e sementes, porém a sua composição pode variar de acordo com a localização do tecido vegetal (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário vegetal e são constituídos especialmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, álcoois, aldeídos e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). A grande maioria dos constituintes químicos dos óleos essenciais são derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo esses últimos os mais frequentes (SIMÕES; SPITZER, 1999). Os terpenóides originam diversas substâncias vegetais, cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno. Tais unidades pentacarbonadas podem se originar a partir de pelo menos duas rotas biossintéticas. Na rota ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA se unem através de uma série de etapas para formar o ácido mevalônico, o qual será modificado para formar o Isopentenil difosfato (IPP) e posteriormente, os esqueletos carbônicos dos terpenóides são formados pela condensação dessas unidades isoprênicas (SIMÕES; SPITZER, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2004). Através da rota do metileritritol fosfato o IPP é formado pela combinação de gliceraldeído-3-fosfato e dois carbonos derivados do piruvato, formando um intermediário que será convertido em IPP (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dessa

forma, as estruturas contendo C_5 , são classificadas como hemiterpenos, os quais darão origem aos monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e finalmente os politerpenos (C_n), contendo um grande número dessas unidades (Fig. 3) (GUENTHER, 1948).

Figura 3: Estrutura química de monoterpenos e sesquiterpenos comumente encontrados em óleos essenciais.



Fonte: O Autor, 2018.

Essa mistura de compostos voláteis que formam os óleos essenciais, frequentemente atuam na defesa das plantas contra patógenos e herbívoros (TAIZ; ZEIGER, 2004). Devido às suas características naturais, um crescente interesse em estudar as propriedades dos óleos essenciais surgiu, sendo possível atribuir uma diversidade de atividades biológicas a esses compostos. São conhecidas as atividades antimicrobiana contra fungos e bactérias, antiviral, citotóxica (BISHOP, 1995; DJIHANE et al., 2017; PEREIRA et al., 2017), além de serem utilizados na indústria alimentícia, perfumaria, cosméticos e medicina (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). O d-limoneno, por exemplo, é um monoterpeno bastante encontrado na casca de frutas cítricas e empregado como agente flavorizante de alimentos e medicamentos, sendo também aplicado como biosolvente e pesticida “eco-friendly” (CIRIMINNA et al., 2014).

Diversos métodos são utilizados para extração de óleos essenciais. Esses métodos podem ser classificados em duas categorias, os métodos convencionais/clássicos e os métodos avançados/inovadores (ASBAHANI et al., 2015). Dentre os métodos clássicos destacam-se a extração por hidrodestilação, arraste a vapor, extração com solventes orgânicos e prensagem a

frio, sendo a hidrodestilação o mais comumente usado (ASBAHANI et al., 2015). As técnicas mais avançadas para extração de óleos essenciais compreendem a extração por fluido supercrítico, líquidos de extração subcrítica (H_2 e CO_2), extração com CO_2 subcrítico, extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas (ASBAHANI et al., 2015). Porém, a desvantagem do uso de tais métodos, é o elevado custo associado aos equipamentos quando comparado às técnicas tradicionalmente utilizadas.

Quanto à identificação da composição química dos óleos essenciais, a cromatografia gasosa (CG) é uma técnica bastante utilizada que permite a análise quantitativa e também qualitativa dos compostos voláteis quando acoplada a um espectrômetro de massas (EM). A CG abrange um intervalo de operação de massa molecular de 2 a 1500 unidades de massa atômica, dessa forma, gases, compostos voláteis e semi-gases podem ser separados através desta análise (BINIECKA; CAROLI, 2011). Através da técnica de CG-EM é possível inferir o tempo de retenção de cada composto, através do qual os índices de retenção serão calculados, para que juntamente com os espectros de massa, cada composto presente no óleo essencial seja identificado com auxílio de padrões comerciais e dados da literatura (DA SILVA et al., 2015).

Apesar dos óleos essenciais apresentarem aplicações promissoras em diferentes campos, características como volatilidade, reatividade na presença luz e oxigênio, e baixa solubilidade em água, dificultam sua utilização comercial. Dessa forma, faz-se necessário o estudo de formulações que forneçam estabilidade para esses compostos a fim de aprimorar suas aplicações.

2.3 EMULSÕES

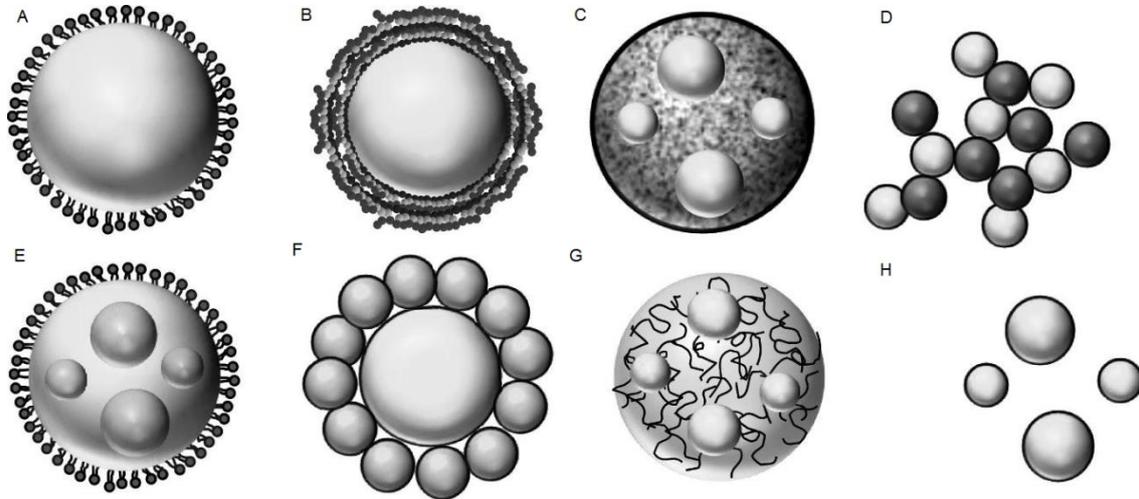
As emulsões podem ser caracterizadas como sistemas heterogêneos de dois líquidos imiscíveis, normalmente óleo e água, onde uma fase está dispersa na forma de gotículas líquidas em outra fase contínua circundante (LI et al., 2012). De acordo com a organização das fases aquosa e oleosa, os sistemas podem ser classificados como emulsões óleo-em-água (O/E), quando gotículas de óleo estão dispersas em uma fase aquosa, ou emulsões água-em-óleo, quando gotículas de água estão dispersas em uma fase oleosa (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). De forma geral, é conhecida como fase dispersa, a fase composta pela substância que compõe as gotículas, e fase contínua ou dispersante, a fase composta pela substância que compõe o líquido circundante (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

A homogeneização é o processo pelo qual as emulsões são formadas. Para produzir uma emulsão é necessário água, óleo e a aplicação de energia, para que ocorra a quebra da interface óleo/água e gotículas menores sejam formadas (HU et al., 2017). As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e o uso de agentes emulsificantes é necessário para estabilizar a interface formada e evitar que as gotículas coalesçam (JAFARI et al., 2008). O tempo de estabilidade pode variar dependendo das características da interface que separa a fase dispersa e contínua, portanto, as moléculas do emulsificante precisam apresentar características anfifílicas de modo que as partes hidrofílicas e hidrofóbicas se associem as fases polar e apolar do sistema (WILDE, 2000).

Os emulsificantes podem ser classificados como moléculas poliméricas anfifílicas, ou surfactantes solúveis em água ou óleo, os quais formam uma fina camada adsorvida diminuindo a tensão superficial dos líquidos (WILDE, 2000). Existem diferentes emulsificantes disponíveis que podem ser usados na formulação de emulsões. O equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) descrito por Griffin (1949), é uma técnica que tem sido usada há décadas para auxiliar na escolha de um emulsificante ou de uma mistura de emulsificantes adequados para estabilizar emulsões (AL-SABAGH, 2002). Neste método, cada emulsificante apresenta um valor de ELH baseado em sua composição, um emulsificante lipofílico irá apresentar um baixo valor de ELH, enquanto um emulsificante hidrofílico apresentará um valor alto de ELH (GRIFFIN, 1949). Segundo Griffin (1949) emulsificantes com ELH entre 4 e 6 são apropriados para emulsões água em óleo, e aqueles com valores de ELH entre 8 e 18, são indicados para sistemas óleo em água. A combinação dos emulsificantes com ELH próximo ao da fase dispersa irá fornecer a informação necessária para a escolha de emulgentes ideais para formular a emulsão.

Emulsões com diferentes estruturas podem ser produzidas para aperfeiçoar o desempenho de suas aplicações. Emulsões múltiplas, micro clusters, emulsões multicamada, nanoemulsões, emulsões preenchidas com partículas de hidrogel, e outras estruturas podem ser encontradas como mostra a figura 4 (MCCLEMENTS, 2015).

Figura 4: Sistemas baseados em emulsões. (A) Emulsões, (B) Emulsões multicamadas, (C) Emulsões preenchidas com partículas sólidas, (D) Micro clusters, (E) Emulsões múltiplas, (F) Coloidossomas, (G) Emulsões preenchidas com partículas de hidrogel, (H) Nanoemulsões.



Fonte: Extraído de McClements (2015).

As emulsões convencionais, também conhecidas como macroemulsões, possuem diâmetros de gotícula entre 100 nm e 100 μm , e apresentam a tendência de serem turvas ou opacas, isto porque as gotículas têm tamanho semelhante ao comprimento de onda da luz visível ($d \approx \lambda$) (MCCLEMENTS, 2010). As nano e microemulsões, são emulsões com tamanhos de gotículas menores, o que permite que esses sistemas sejam transparentes e apresentem melhor estabilidade a separação e agregação quando comparados às macroemulsões (Tabela 1) (MCCLEMENTS, 2010).

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de emulsões.

Tipo de Emulsão	Tamanho de partícula	Estabilidade termodinâmica	Aparência
Macroemulsão	0.1 – 100 μm	Instável	Turva/opaca
Nanoemulsão	20 – 100 nm	Instável	Translúcida
Microemulsão	5 – 50 nm	Estável	Translúcida

Fonte: Adaptado de McClements (2010)

As emulsões podem ser aplicadas como sistemas promissores de transporte de compostos atuando em diversas áreas como indústrias de alimentos, cosméticos e farmácia

(CALLENDER et al., 2017; MCCLEMENTS, 2015). O principal objetivo do sistema de encapsulamento de substâncias ativas é garantir a proteção e o controle de liberação de compostos. Essa liberação pode ser mediada por fatores como temperatura, pH, biodegradação, difusão e solubilidade no meio, permitindo que a liberação de compostos de interesse possa ser controlada (SUAVE et al., 2006). Muitas substâncias ativas exibem baixa solubilidade em água e necessitam da criação de veículos lipídicos adequados para que a sua administração e entrega sejam eficientes (KOROLEVA et al., 2016). Callender (2017) cita em sua revisão que o uso de microemulsões como sistemas de entrega de fármacos é direcionado preferencialmente para drogas lipofílicas, sendo 79,4% das publicações dos últimos cinco anos voltadas para esse contexto, enquanto que 15,9% são para drogas hidrofílicas. Na indústria de alimentos, por exemplo, o uso de óleos essenciais como agentes flavorizantes e antimicrobianos requer o encapsulamento destes agentes antes de serem empregados em alimentos (MCCLEMENTS, 2015). Porém, apesar dos óleos essenciais serem amplamente estudados quanto as suas aplicações, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos direcionados ao melhoramento de suas aplicações. Segundo Donsì e colaboradores (2016) trabalhos abordando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e trabalhos sobre nanoemulsões, cresceram exponencialmente ao longo dos anos, enquanto que trabalhos sobre nanoemulsões de óleos essenciais crescem vagarosamente, perfazendo pouco mais de 20 publicações por ano nos últimos dois anos (considerado o ano de sua publicação). Dessa forma, o estudo das emulsões e suas diversas aplicações ainda permanece um campo amplamente aberto para estudo, apresentando diversas vantagens e desafios a serem elucidados.

2.4 BIOFILMES BACTERIANOS

Os biofilmes bacterianos são estruturas formadas pela união de microrganismos em uma comunidade, na qual estas unidades unicelulares se acumulam e proliferam envoltas em uma matriz de exopolissacarídeos, formando um aglomerado séssil que pode se desenvolver sobre superfícies bióticas ou abióticas (MAH; O'TOOLE, 2001). A grande maioria das bactérias podem alternar entre a forma planctônica e séssil, e estima-se que aproximadamente 80% da biomassa microbiana mundial esteja em estado de biofilme (CLAESSEN et al., 2014; SUH; RAMAKRISHNAN; PALMER, 2010).

Quando aderidas em superfícies, as bactérias tendem a produzir uma matriz de polissacarídeos como forma de proteção, sendo necessário apenas umidade e uma superfície

de contato para iniciar a formação do biofilme (SANDHOLM; WIRTANEN, 1992). No biofilme, a massa de seca de microrganismos perfaz menos de 10% do seu peso total e cerca de 90% corresponde a matriz de material extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A matriz ajuda na aderência do biofilme e na coesão entre as células, podendo adquirir uma morfologia diferenciada. A estrutura espacial da matriz restringe a penetração de agentes e substâncias nocivas, além de gerar um gradiente de dispersão de nutrientes e sinais que impulsionam a diferenciação de populações (DRAGOŠ; KOVÁCS, 2017). De forma geral, a arquitetura, função e formação do biofilme irão depender de diferentes combinações de fatores que vão desde a morfologia da superfície de adesão, até condições ambientais e fatores microbiológicos de cada espécie bacteriana (WHITEHEAD; VERRAN, 2015). Diferentes tipos de estruturas podem ser encontrados, havendo biofilmes de morfologia lisa, plana, áspera, esponjosa, filamentosa, porosa, até macro colônias semelhantes a cogumelos cercados por canais cheios de água que favorecem a circulação de substâncias (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Conhecidas como “substâncias poliméricas extracelulares” (EPS), essa matriz é formada por uma mistura de diferentes tipos de biopolímeros como exopolissacarídeos, proteínas extracelulares, DNA extracelular, lipídeos e água (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Os componentes da matriz podem atuar na sinalização entre as células dentro do biofilme. O eDNA, por exemplo, foi observado atuando como sinalizador de mecanismos de defesa em *Pseudomonas aeruginosa*, ele age acidificando o meio e promovendo o fenótipo de resistência a antibióticos (WILTON et al., 2016). Estudos com este mesmo microrganismo mostraram que o Psl, um polissacarídeo presente na matriz desta espécie, atua como um sinal para induzir a produção de um segundo mensageiro molecular intracelular, o c-di-GMP, que promove o estilo de vida sésil e a produção do biofilme (IRIE et al., 2012).

O ambiente criado pela matriz torna-se ideal para a troca de material genético, uma vez que, as células são mantidas próximas e a troca horizontal de genes é facilitada (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007). O “quorum sensing” (QS) é usado por muitas bactérias para comunicação em sistemas com grande densidade populacional, permitindo que as suas atividades sejam coordenadas (AGUILAR et al., 2010). Os auto-indutores são pequenas moléculas produzidas pelas células bacterianas que se acumulam proporcionalmente ao crescimento populacional (RUMJANEK et al., 2004). Ao perceber a concentração dos auto-indutores através do sistema do QS, as bactérias podem deduzir o tamanho populacional, e a partir de determinada concentração limite, a transcrição de genes passa a ser regulada para

promover benefícios para bactéria (RUMJANEK et al., 2004). O mecanismo QS desencadeia a expressão de genes envolvidos em fatores de virulência e em etapas distintas da produção de biofilme como adesão, maturação e dispersão (AGUILAR et al., 2010).

2.4.1 Etapas da formação do biofilme

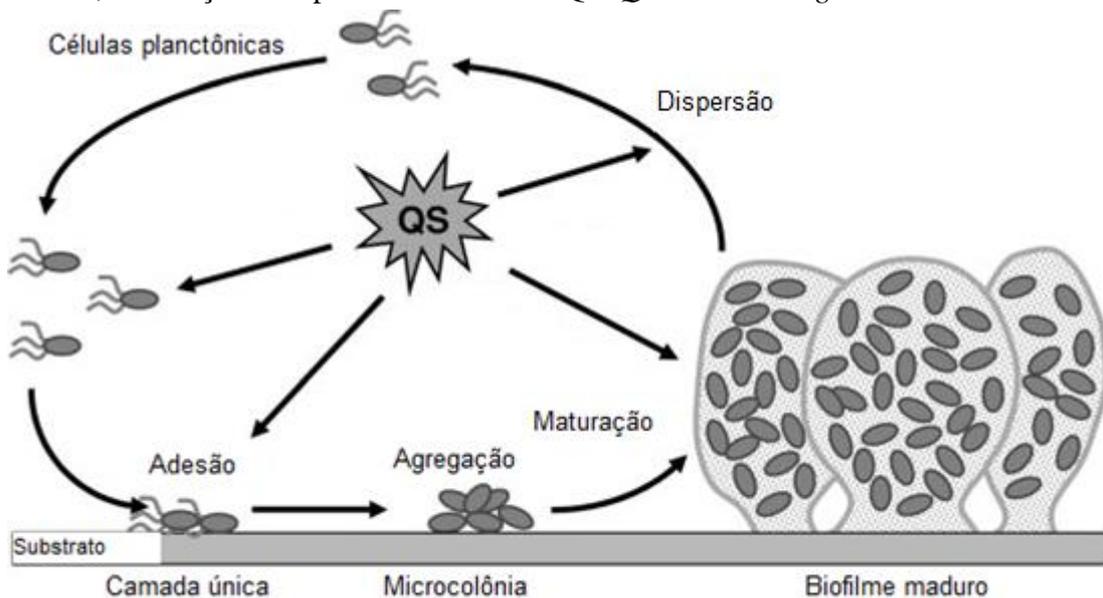
A formação do biofilme bacteriano pode ser descrita em três etapas, a adesão, maturação e dispersão. O primeiro passo para adesão envolve a aproximação da bactéria a superfície, gerando um série de forças de atração e repulsão ocasionadas pela presença de cargas na membrana celular bacteriana e na superfície do ambiente (RABIN et al., 2015). A adesão pode ser estabelecida quando as forças de atração vencem a repulsão, isto acontece por interações eletrostáticas, forças de van der Waals ou mesmo por interações mecânicas através de flagelos e fímbrias que se ligam a superfície (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008). A adesão pode ser reversível quando a adsorção das bactérias à superfície se dá pela interação de forças fracas, nesta etapa ainda é possível que as bactérias apresentem movimentos Brownianos sendo fácil a sua remoção (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

Ao passo que várias células permanecem imobilizadas elas tornam-se irreversivelmente adsorvidas. Isto se dá pela presença de apêndices físicos como pelos, flagelos e fímbrias que ao entrarem em contato com a superfície interagem através de ligações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações covalentes e iônicas, e interações hidrofóbicas, estabelecendo a ligação da célula ao substrato (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). Neste ponto, a remoção das células requer a aplicação de forças mais intensas como raspagem ou uso de produtos químicos que quebrem estas ligações, como enzimas, detergentes, surfactantes e sanitizantes (KUMAR; ANAND, 1998; SINDE; CARBALLO, 2000).

A presença de nutrientes dispersos no meio permite que as bactérias aderidas cresçam e multipliquem, formando uma camada de células sobre a superfície que irão originar micro colônias. Em determinado momento, as micro colônias se diferenciam em biofilmes verdadeiros (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999) e a maturação ocorre quando o biofilme desenvolve-se em uma estrutura organizada e complexa, com a formação de camadas e uma matriz tridimensional. Em cada etapa genes únicos são expressos para induzir a formação da matriz extracelular, que irá ajudar na ancoragem e estabilização do biofilme (KUMAR; ANAND, 1998).

A última etapa é a dispersão, nesta fase ocorre o rompimento das células do biofilme, resultando na disseminação de células agrupadas ou individuais no meio. Antes da dispersão, células no interior do biofilme são lisadas, servindo de nutrientes para as células que serão dispersas, nessa fase, diversos sinais são orquestrados para que células específicas sejam liberadas do biofilme ao final do seu ciclo (KUMAR et al., 2017). Ao mesmo tempo, enzimas são produzidas para digerir os polissacarídeos que estruturam o biofilme, e as células que serão dispersas interrompem a expressão de genes que codificam exopolissacarídeos e passam a expressar genes que codificam proteínas e flagelos necessários para a vida planctônica (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; KUMAR et al., 2017). A figura abaixo representa o esquema das etapas da formação do biofilme.

Figura 5: Esquema ilustrativo das etapas da formação de biofilme, sendo representada a adesão, maturação e dispersão das células. QS: *Quorum sensing*.



Fonte: Adaptado de Aguilar e colaboradores (2010).

2.4.2 Biofilmes na indústria de alimentos

Como é sabido, o biofilme confere proteção às bactérias contra diversos fatores e de forma geral, as bactérias aderidas em um biofilme são mais resistentes a tratamentos que bactérias planctônicas. Células aderidas em um biofilme podem expressar um fenótipo que as tornam até 1000 vezes mais resistentes a antimicrobianos que células planctônicas (PHILLIPS, 2016). Para a indústria alimentícia, a capacidade de microrganismos patogênicos formarem biofilmes

sobre superfícies de contato com alimentos tem se tornando um problema, uma vez que esses biofilmes são reservatórios de contaminação (SHI; ZHU, 2009). Uma ampla gama de doenças pode ser transmitida pelo consumo de alimentos contaminados e segundo a Organização Mundial de Saúde estima-se que 600 milhões de pessoas adoecem após consumir alimentos contaminados, resultando em 420 mil mortes todos os anos, sendo que 40% são crianças menores de cinco anos, chegando a 125 mil mortes anualmente (WHO, 2017a).

Mesmo com a aplicação de procedimentos de higienização microrganismos aderidos a superfícies das plantas das indústrias alimentares podem ser observados, incluindo superfícies de aço inoxidável, plástico, vidro, borracha, cimento, madeira, cerâmica, poliestireno, entre outras superfícies comuns nessas indústrias (BANG et al., 2014; DI BONAVENTURA et al., 2008; FAILLE et al., 2017; JOSEPH et al., 2001; LI; KUDA; YANO, 2014; SINDE; CARBALLO, 2000; VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

A adesão a superfícies abióticas é afetada pelas propriedades físicas e químicas da superfície das células e do substrato, o qual é modificado por um filme condicionante formado pelo meio (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Segundo Chmielewski e Frank (2003) a adesão máxima das bactérias à superfície irá depender da molhabilidade da superfície e da alta energia livre, superfícies com essas características como o aço inoxidável e o vidro, têm a característica de serem hidrofílicas e permitirem maior adesão e formação de biofilme que superfícies hidrofóbicas. A textura lisa ou rugosa da superfície também irá influenciar na adesão de bactérias. Porém, estas características de superfície (textura, hidrofobicidade e carga), podem ser alteradas por fatores ambientais que irão influenciar na formação do biofilme como pH, temperatura, oxigenação e nutrientes do meio (GARCÍA-GONZALO; PAGÁN, 2015). Temperaturas ideais, por exemplo, podem propiciar um aumento na produção de biofilme. Han e colaboradores (2016) avaliaram o efeito da temperatura na produção de biofilme de *Vibrio parahaemolyticus*, um patógeno associado a frutos do mar, e observaram que temperaturas de 15 a 37°C induziram uma forte formação de biofilme, enquanto que temperaturas de 4 a 10°C ocasionaram a aderências das bactérias em monocamadas, indicando que temperaturas mais elevadas (15-37°C) podem gerar condições ameaçadoras para segurança alimentar.

Diversas estratégias e métodos são descritos para prevenir ou reduzir a formação de biofilmes nas plantas das indústrias de alimentos. Meyer (2003) sugeriu a existências de três diferentes estratégias para enfrentar problemas com biofilmes: a desinfecção “in time”, antes do biofilme ser formado, a desinfecção do biofilme usando desinfetantes agressivos e a seleção de superfícies de materiais que inibam a adesão dos microrganismos ou a

suplementação de nutrientes. De forma geral, métodos físicos (campo magnético, pulso elétrico, escovação), químicos (ozônio, cloro, peróxido, ácidos), produtos naturais (óleos essenciais) e biológicos (enzimas) são empregados (PHILLIPS, 2016).

A utilização de correntes elétricas em combinação ao uso de antibióticos mostrou-se efetivo no controle dos biofilmes, segundo Costerton e colaboradores (1994) a corrente elétrica permite que as moléculas de antibiótico sejam conduzidas através da matriz EPS atingindo as células bacterianas no biofilme. Agentes químicos podem reagir com a matriz EPS, permitindo que a remoção mecânica dos biofilmes seja melhorada, essas duas técnicas podem agir sinergicamente para eliminação das bactérias (SREY; JAHID; HA, 2013). Um dos desinfetantes mais utilizados é o peróxido de hidrogênio, ele possui uma alta capacidade de oxidação produzindo radicais livres que afetam a matriz do biofilme (SREY; JAHID; HA, 2013). Contudo, existem trabalhos que relatam a resistência de microrganismos em biofilmes a este agente, como *Clostridium perfringens*, que se mostrou tolerante a diversos desinfetantes utilizados nas indústrias de alimentos, como monopersulfato de potássio, cloreto de amônio quaternário, peróxido de hidrogênio e glutaraldeído (CHARLEBOIS et al., 2017). O uso de enzimas combinado a surfactantes também tem se mostrado uma alternativa para o controle dos biofilmes. No entanto, devido à heterogeneidade da matriz EPS, e da especificidade no mecanismo de ação das enzimas, identificar enzimas efetivas para os diferentes tipos de biofilmes torna a sua aplicação complexa, sendo necessária uma mistura de enzimas para atuar eficazmente na degradação do biofilme (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Diversas bactérias são capazes de formar biofilmes, e dentre as bactérias patogênicas para indústria alimentícia podem ser citadas *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre outros (GKANA et al., 2017; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; PICOLI et al., 2017). Dessa forma, é fundamental entender as características peculiares de cada microrganismo, a fim de que medidas efetivas sejam tomadas para prevenção e eliminação dos biofilmes bacterianos nas indústrias de alimentos, evitando gastos financeiros e riscos para saúde pública.

2.4.2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva associada a diversos surtos de doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados. Conhecida como listeriose, a doença causada por *L. monocytogenes* é caracterizada por septicemia, meningite e aborto em mulheres grávidas, estimando-se que 95% das infecções resultem em hospitalização e que a

taxa de mortalidade esteja entre 15 a 20% (DATTA; BURALL, 2017). A população mais susceptível a listeriose inclui jovens, idosos, mulheres grávidas e pessoas imunocomprometidas (DATTA; BURALL, 2017).

Diversos alimentos como produtos lácteos, mariscos, embutidos, carnes, aves e vegetais contaminados, já foram reportados dentre os surtos de listeriose (EPELBOIN; BOSSI, 2011). Devido a sua capacidade de sobrevivência em diferentes condições ambientais como baixas temperaturas (4-37°C), altas concentrações salinas, e baixo pH, o controle de *L. monocytogenes* é um desafio para as indústrias de alimentos (EPELBOIN; BOSSI, 2011; SCHODER, 2016). *L. monocytogenes* pode colonizar superfícies de equipamentos, tubos, correias e pavimentos, sendo capaz de permanecer viáveis por até um ano em plantas de processamento, podendo atuar na contaminação cruzada de alimentos (BERRANG et al., 2005; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017).

Listeria monocytogenes apresenta uma grande heterogeneidade entre as diferentes cepas, sendo descritos 13 sorotipos nomeados de 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e e 7 (RENIER; HÉBRAUD; DESVAUX, 2011). Os principais sorotipos causadores de doenças em humanos são 1/2a, 1/2b, e 4b (DATTA; BURALL, 2017). Norwood e Gilmour (1999) avaliaram a aderência de diferentes sorotipos a superfícies de aço inoxidável observando que o sorotipo 4b mostrou adesão significativamente maior que o 1/2a, e segundo McLauchlin (1987) o sorotipo 4b é encontrado em 59% dos casos de *L. monocytogenes* em humanos.

A formação de biofilme garante a proteção das células bacterianas e a sua persistência no meio, em *L. monocytogenes* o uso de flagelos está associado à aderência a superfícies, bem como proteínas e mecanismos moleculares que regulam a formação do biofilme (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017). Pan e colaboradores (2006) realizaram um estudo simulando condições de indústrias de processamento de alimentos e avaliaram o desenvolvimento de resistência de cepas de *L. monocytogenes* a sanitizantes utilizados comumente em indústrias. Neste estudo, os autores puderam constatar que ao longo de três semanas no regime do experimento, os biofilmes conferiram resistência bacteriana ao peróxido de hidrogênio, amônio quaternário e cloro, e que não houve diferença na susceptibilidade das células livres e do controle, sugerindo que a resistência aos sanitizantes seja atribuída a componentes da matriz EPS e não de atributos intrínsecos da bactéria.

2.4.2.2 *Enterococcus faecalis*

Micro-organismo membros do grupo *Enterococcus* comumente são encontrados em diversos ambientes como o trato digestivo animal e humano, solo, água e plantas, além de serem encontrados em uma variedade de alimentos como queijos artesanais e salsichas fermentadas (LEPAGE et al., 2006). Por muito tempo espécies desse gênero foram consideradas inofensivas e sem importância médica, porém espécies como *E. faecalis* e *E. faecium* têm emergido como causadoras de doenças infecciosas, sendo que *E. faecalis* têm sido reportada como causadora de 60 a 80% das infecções por espécies de *Enterococcus* (LEPAGE et al., 2006).

Enterococcus faecalis é uma bactéria gram-positiva anaeróbica facultativa, capaz de se desenvolver em temperaturas que vão de 5 a 60°C e variações de pH de 4.6 a 9.9 (FISHER; PHILLIPS, 2009). Graças à alta tolerância a variações de temperatura e condições ambientais adversas, espécies de *Enterococcus* são capazes de habitar diversos nichos e sua presença pode ser um indicador da qualidade sanitária em alimentos (GIRAFFA, 2002). A presença de *Enterococcus* no trato gastrointestinal de animais é uma das causas de contaminação de carne no momento do abate (FRANZ et al., 2003). Aarestrup e colaboradores (2002) avaliou a presença de *Enterococcus* em carnes de porco e sua resistência a antibióticos, constatando a presença de *E. faecalis* e *E. faecium* nas amostras coletadas, e a expressão de genes de resistência a antibióticos como eritromicina. Em abatedouros, a presença de *E. faecalis* em carnes de aves se mostrou predominante dentre as espécies de *Enterococcus* isoladas destas amostras (TURTURA; LORENZELLI, 1994). *E. faecalis* pode ser um problema não só em alimentos crus, como também em alimentos cozidos, graças a sua capacidade de sobreviver ao cozimento em temperaturas de até 60°C, estando envolvida no processo de deterioração dos alimentos (GIRAFFA, 2002). Ademais a capacidade inerente de formar biofilmes permite adaptação a condições ambientais severas e é um importante mecanismo de virulências em *Enterococcus* (KAFIL et al., 2016).

2.5 CÂNCER CERVICAL

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres ao redor do mundo, sendo estimada a ocorrência de 530 mil novos casos em 2012, compreendendo cerca de 7,9% dos cânceres femininos (WHO, 2017b). Aproximadamente 265 mil mortes ocorrem anualmente, sendo que cerca de 87% das mortes ocorrem em países pouco

desenvolvidos, com recursos limitados para tratamento de doenças (BASU et al., 2017). O câncer cervical é um tipo de tumor maligno invasivo capaz de se espalhar para outras partes do corpo e em muitos casos está associado ao papiloma vírus humano (HPV) de alto risco, o qual é capaz de causar lesões malignas (MEDINA-ALARCÓN et al., 2017). As manifestações invasivas são mais raras de serem encontradas em mulheres de idade inferior a 30 anos, havendo maior possibilidade de detectar lesões de alto grau em mulheres entre 35 e 45 anos (BASU et al., 2017).

A associação entre o câncer cervical e infecções por HPV é bem estabelecida e estudos indicam que o DNA do HPV pode ser detectado em 90 a 100% dos casos desse tipo de câncer (BOSCH et al., 2002). Existem mais de 100 tipos de HPV identificados, dos quais 40 estão associados a infecções humanas, sendo classificados como de alto risco ou baixo risco para o desenvolvimento de câncer cervical (PAAVONEN, 2007). Procedimentos cirúrgicos, quimioterapia e radioterapias são os principais métodos usados para o tratamento do câncer cervical (MEDINA-ALARCÓN et al., 2017).

A cultura de células surgiu no século XX com o objetivo de estudar o comportamento de células animais e atualmente é uma técnica amplamente aplicada em investigações científicas relacionadas ao câncer (CRUZ et al., 2009). A cancerologia experimental *in vitro* tem se tornado um importante recurso para pesquisa de moléculas antineoplásicas eficientes e seguras (ROSAS et al., 2013). Fundado na década de 60 o *American Type Culture Collection* (ATCC), é um banco de células que mantém várias coleções celulares certificadas de onde é possível se obter linhagens padrões para pesquisa (ROSAS et al., 2013). A linhagem celular de câncer cervical HeLa é um dos modelos experimentais mais utilizados na cancerologia experimental (ROSAS et al., 2013).

Por mais de 30 anos produtos originários de plantas tem desempenhado um importante papel como recursos quimioterapêuticos no tratamento de câncer. Moléculas naturais são uma fonte de novos fármacos e muitas drogas são sintetizadas para mimetizar estas moléculas (FEHER; SCHMIDT, 2003). A vincristina e vimblastina, por exemplo, são alcaloides isolados de *Chataranthus roseus*, amplamente utilizados no tratamento de linfomas, leucemia, câncer de mama, câncer de testículo e sarcoma de Kaposi (PRAKASH et al., 2013). O Furanodieno, um sesquiterpeno isolado do óleo essencial de *Curcuma wenyujin*, e o óleo essencial do rizoma desta planta, são capazes de inibir a proliferação de células de câncer cervical HeLa (PATEL; GOGNA, 2015). A timoquinona isolada do óleo essencial de *Nigella sativa* é conhecida por ser ativa contra diversas doenças, e foi capaz de induzir a morte celular de HeLa por apoptose, estimulando a produção de genes pró-apoptóticos e reduzindo a

expressão de genes anti-apoptóticos (SAKALAR et al., 2013). Ainda segundo Feher e Schimdt (2003), é possível que produtos naturais sejam combinados com moléculas sintéticas, tornando estas moléculas combinadas mais eficientes pela possível adição de centros quirais, anéis aromáticos, heteroátomos e saturações.

Sistemas de entrega localizada de fármacos têm sido bastante estudados para o tratamento quimioterápico de câncer cervical, oferecendo vantagens como a entrega direta para o local de ação, com conseqüente diminuição da dose do fármaco necessária e redução de efeitos colaterais (MAJOR; MCCONVILLE, 2017). A localização do colo do útero o torna acessível à implantação de forma não invasiva de dispositivos para entrega de fármacos ou formulações, que ao entrarem em contato com o tecido canceroso podem combater as células tumorais (MAJOR; MCCONVILLE, 2017). Segundo Major e McConville (2017) dispositivos como tabletes, géis vaginais, anéis vaginais, cápsulas e sistemas particulados, como nanopartículas e lipossomas têm sido investigados para fins terapêuticos. As nanopartículas como sistemas de entrega de fármacos vaginais tem recebido atenção por permitirem a liberação controlada e a ação em células alvo, além de poderem aumentar a eficiência terapêutica e apresentar propriedades melhoradas atuando como antimicrobianos (ENSIGN; CONE; HANES, 2014). Nesse contexto, a aplicação da nanotecnologia se apresenta como uma ferramenta promissora aliada ao tratamento do câncer cervical.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1

Ação de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Tetragastris catuaba* (Burseraceae) sobre crescimento e produção de biofilmes bacterianos importantes na indústria alimentícia

Artigo a ser traduzido e submetido à revista Food Control

IF: 3.496

Qualis: B1

**Ação de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Tetragastris catuaba* (Burseraceae)
sobre crescimento e produção de biofilmes bacterianos importantes na indústria
alimentícia**

Rayane Cristine Santos da Silva*¹; Isabel Renata de Souza Arruda¹; Carolina Barbosa Malafaia¹; Marcilio Martins de Moraes³; Alexandre Gomes da Silva²; Márcia Vanusa da Silva²; Claudio Augusto Gomes da Camara³; Clarissa Piccinin Frizzo⁴; Maria Tereza dos Santos Correia²; Giovanna Machado*¹.

¹ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Autor para correspondência:

E-mail: rayanecss@yahoo.com.br; giovanna@cetene.gov.br

Tel.: +55 81 3334 7200

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial (OE) de folhas de *Tetragastris catuaba* e de seu composto majoritário, o β -cariofileno, através do desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões. Para tal, a composição química do OE foi identificada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As nanoemulsões foram formuladas a partir de um sistema contendo uma mistura de tensoativos, Tween 80 e Span 80, uma fase oleosa, contendo o óleo essencial ou o β -cariofileno, e uma fase aquosa contendo água e líquido iônico. Os componentes foram misturados em agitador magnético e, posteriormente, em ultrassom de ponta. O óleo essencial apresentou 54 compostos, sendo o β -cariofileno o componente majoritário (25,6%), seguido do α -Copaeno (8,3%), α -himachaleno (7,9%), *Iso*-Silvestreno (5,8%), Linalool butanoato (5,2%), α -Pineno (5,1%) e Guaieno (4,4%). As nanoemulsões apresentaram tamanho de partícula entre 23,7 \pm 0,37nm e 31,2 \pm 1,24nm, para o OE e o β -cariofileno, respectivamente. As atividades antimicrobiana e antibiofilme foram observadas principalmente para o OE livre e sua

nanoemulsão, apresentando uma redução significativa ($p < 0,05$) do crescimento planctônico e do biofilme de *L. monocytogenes* e *E. faecalis*. Para o β -cariofileno livre foi possível observar atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *E. faecalis*, porém, para a sua nanoemulsão apenas redução do crescimento das bactérias planctônicas. O β -cariofileno não foi ativo contra *L. monocytogenes*. A relação observada entre a ação do óleo essencial e do β -cariofileno frente às bactérias estudadas, podem indicar que outros compostos presentes no óleo essencial atuam em sinergismo para determinar a sua atividade. Além disso, as nanoemulsões baseadas em óleos essenciais se apresentam como alternativas eficazes para aplicações biotecnológicas no controle de microrganismos patogênicos.

Palavras Chave: Catuaba, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, óleo essencial, β -cariofileno, nanoemulsão.

1. Introdução

Enterococcus faecalis e *Listeria monocytogenes* são bactérias gram positivas anaeróbias, a primeira com célula do tipo diplococos e a última um bacilo. Ambas apresentam um alto potencial de causar doenças em humanos (Bakshi, Sarkar, Paul, & Dutta, 2016; Zhu, Gooneratne, & Hussain, 2017). *E. faecalis* pode se tornar patogênica causando, por exemplo, infecções do trato urinário, endocardite, meningite entre outras doenças (Vu & Carvalho, 2011). Além disso, a presença de *Enterococcus* sp. no trato intestinal de animais é um importante fator de contaminação de carnes no momento do abate, e graças a capacidade de tolerar variações de temperatura, a presença de *E. faecalis* em carnes tem sido associada a deterioração desses produtos (Franz, Holzapfel, & Stiles, 1999). *L. monocytogenes* encontra-se disseminada em diversos ambientes, como água e solo, além de serem achadas em inúmeros alimentos, como vegetais, produtos lácteos, mariscos, embutidos e carnes (Epelboin & Bossi, 2011). Esse patógeno é capaz de infectar humanos causando listeriose, doença que ocorre exclusivamente após a ingestão de alimentos contaminados, podendo causar septicemia e meningocelalite em indivíduos com imunidade comprometida (Schuppler & Loessner, 2010).

As bactérias em geral adotam dois estilos de vida, sendo um deles de vida livre ou planctônica que permite a dispersão para novos ambientes, e a forma de vida séssil, ou biofilme que as torna tolerantes às condições ambientais adversas (Malafaia et al., 2017; Trentin, Giordani, & Macedo, 2013). Graças a estas vantagens, recentemente os biofilmes têm

atraído uma atenção notável devido ao seu impacto na medicina e saúde pública (Silva et al., 2015).

A investigação de novos agentes antimicrobianos, com ação tanto nas bactérias planctônicas como em biofilmes, tem sido estimuladas dado o acúmulo de resistências pelo uso indiscriminado de antibióticos. Nesse contexto, os óleos essenciais são compostos voláteis, de natureza lipofílica, produzidos pelo metabolismo secundário vegetal que são amplamente investigados quanto as suas propriedades biológicas (Bilia et al., 2014). Porém, características como baixa solubilidade em água, volatilidade e susceptibilidade a decomposição sob condições ambientais, tornam a aplicabilidade dos óleos essenciais limitada, sendo o encapsulamento desses compostos uma alternativa eficaz para aumentar a sua estabilidade física (Bilia et al., 2014). A família Burseraceae apresenta uma variedade de plantas aromáticas produtoras de óleos essenciais com atividades biológicas como inseticida, antimicrobiana, antiproliferativa, repelente, antifúngica, e outras (Nagawa, Böhmendorfer, & Rosenau, 2015; Prakash, Mishra, Kedia, & Dubey, 2014; Vuuren, Kamatou, & Viljoen, 2010; Yagi, Babiker, Tzanova, & Schohn, 2016; Younoussa, Nukenine, Pierre, Danga, & Esimone, 2016). A espécie *Tetragastris catuaba* pertence à família Burseraceae, e o óleo essencial produzido por ela é descrito pela primeira vez neste trabalho.

Nanoemulsões são sistemas formados usualmente pela mistura de dois líquidos imiscíveis, que devido ao seu pequeno tamanho de partícula, exibem grande estabilidade física (Singh et al., 2017). Esses sistemas se apresentam como uma alternativa potencial para o encapsulamento de compostos lipofílicos bioativos, promovendo maior proteção e solubilidade em meios aquosos (Arancibia, Miranda, Matiacevich, & Troncoso, 2017). Nesse contexto, as nanoemulsões são estruturas amplamente empregadas como sistemas de entrega controlada de substâncias, e podem ser aplicadas em diferentes campos, como em indústrias de alimentos, farmacêutica e cosméticos (Callender, Mathews, Kobernyk, & Wettig, 2017; Singh et al., 2017). Dessa forma, o objetivo do presente estudo é caracterizar o óleo essencial de *Tetragastris catuaba* e avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial e de seu composto majoritário encapsulados em nanoemulsões contendo líquido iônico, para aplicações biotecnológicas contra *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal

Folhas de *Tetragastris catuaba* foram coletadas na Usina São José (coordenadas 7°46'55.5"S 35°00'33.6"W) município de Goiana, Pernambuco, Brasil, em fevereiro de 2015. A espécie foi identificada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco e um exemplar foi depositado sob exsicata de número 96.789. O material foi coletado em sacos plásticos e armazenado sob refrigeração (-24 °C) até a extração do óleo essencial.

2.2 Extração dos óleos essenciais

A técnica empregada para a extração do óleo essencial foi a hidrodestilação com aparato de Clevenger. A cada extração, eram pesadas 500g de folhas moídas e adicionado 2,5L de água destilada. O tempo de extração foi de 4 h. Ao término da extração o óleo essencial foi coletado e tratado com sulfato de sódio anidro para a retirada total da água presente na amostra. O óleo essencial foi armazenado em recipientes de vidro tipo âmbar sob refrigeração (-20 °C) até uso nos experimentos.

2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Os compostos voláteis foram analisados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) em um sistema Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra com detector seletivo de massa, equipado com uma coluna apolar Rxi®-5ms (Crossbond® 5% de difenil / 95% de dimetilpolisiloxano) (10 m x 0,10 mm ID x 10 µm df). Para a análise o volume de injeção da amostra foi de 0,5 µL de solução diluída (1/100) de óleo essencial em n-hexano. A temperatura do forno foi programada de 40 a 250°C a uma taxa de aquecimento de 25°C/min para fins de integração. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 260°C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1 mL/min e pressão de entrada de 30 p.s.i. no modo split (1:30). Os espectros de massa foram registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan-s e fragmentos de 40 a 550 Da.

A partir da análise dos tempos de retenção dos componentes da amostra do óleo e dos padrões de n-alcenos C8-C40, foi calculado o índice de retenção para cada composto, segundo a equação de Van den Dool and Kratz (1963). Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com aqueles de padrões

autênticos disponíveis na biblioteca de referência NIST 98 e WILEY e dados da literatura de publicada em Adams (2009).

2.4 Obtenção do líquido iônico

O líquido iônico (LI) dicatiônico foi sintetizado e cedido pela Dra. Clarissa Piccinin Frizzo, do Departamento de Química, do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Dados referentes à caracterização encontram-se disponíveis nos Apêndices I ao IV.

2.4.1 Síntese

Resumidamente, 5 mmol de 1-metilimidazol e acetonitrila (50 mL) foram adicionados a um balão conectados a um condensador de refluxo sob atmosfera inerte e agitado por 2 min. A seguir, 25 mmol of 1,10-dibromodecano foi lentamente adicionado. A mistura foi mantida a 70 °C por 72 h. Ao final, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, lavado com dietileter, e seco sob vácuo (4 mbar, 50 °C, 48 h) e o produto foi obtido com alta pureza. Para a reação de troca do ânion o hidróxido de 1,10-bis(3-metilimidazolíneo-1-il) decano foi preparado a partir do brometo de 1,10-bis(3-metilimidazolíneo-1-yl) decano em água, usando resina de troca iônica (IRN78). Finalmente, o LI dicatiônico foi obtido pela adição lenta do hidróxido de 1,10-bis(3-metilimidazolíneo-1-il) decano em água a um leve excesso de hidrocloreto de serina em água. A mistura foi agitada a 25°C por 12h. O solvente foi evaporado a 70°C sob vácuo. Um volume de 9 mL de acetonitrila e 10 mL de metanol foram adicionados à mistura sob agitação vigorosa. A mistura foi então filtrada para remover o excesso de aminoácido. O filtrado foi evaporado para remoção dos solventes e o produto seco a vácuo por 48h a 70 °C.

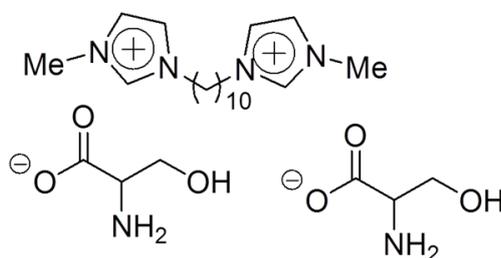


Figura 1. Estrutura química do líquido iônico dicatiônico derivado de serina.

2.5 Preparo das nanoemulsões

Para o preparo das nanoemulsões, o volume de óleo essencial ou β -cariofileno (Sigma-Aldrich) foi fixado em 2% do volume total da formulação e a concentração do líquido iônico

fixada em 1 mg/mL, a fim de manter uma concentração suficiente de óleo para aplicações biológicas e evitar a toxicidade do líquido iônico. Para determinar as proporções de tensoativos foram feitas formulações contendo proporções 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9 (v/v) de Tween® 80 (Dinâmica) e Span® 80 (Sigma-Aldrich), respectivamente, utilizando o β -cariofileno como fase oleosa. As emulsões foram avaliadas através dos aspectos visuais após 24h e a formulação que se apresentou límpida, translúcida e sem separação de fases foi selecionada. Após selecionada a melhor proporção de tensoativos, a nanoemulsão contendo óleo essencial como fase oleosa foi elaborada. As formulações foram produzidas em duas etapas: primeiramente uma alíquota do óleo foi submetida à agitação magnética durante 5 min. juntamente com o Tween 80 e o Span 80 para homogeneização dos componentes. Em seguida, foi adicionado uma solução aquosa do líquido iônico a 1 mg/mL, mantendo-se a agitação por mais 30 min. Por fim, a mistura foi submetida à homogeneização em ultrasonicador de ponta (Qsnica Sonicators, Ultrasonic Processor 125 Watt, 20 kHz) por 3 min a 60% de amplitude e 4s de pulso. Após o processo, as formulações límpidas foram estocadas em temperatura ambiente até uso. Uma mistura contendo apenas β -cariofileno e as proporções estabelecidas de Tween 80 e Span 80 (MF1) foi preparada, bem como uma formulação contendo apenas β -cariofileno e a solução aquosa do líquido iônico (MF2), para verificar a estabilidade dos sistemas separadamente.

2.6 Caracterização das nanoemulsões

2.6.1 Análises térmicas

As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TG) foram obtidas no analisador térmico simultâneo NETZSCH STA 449 F3 Jupiter. As análises foram realizadas em cadinhos de alumínio contendo cerca de 2 mg das amostras, sob atmosfera de azoto dinâmico (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10°C/min no intervalo de temperatura de 40°C - 600°C. Os resultados foram analisados no software Proteus® da NETZSCH.

2.6.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho de gotícula, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta das nanoemulsões foram medidos utilizando um Zetsizer ZS90 (Malvern Instruments) à temperatura de 25°C. As amostras foram diluídas em uma proporção 1: 20 com água Milli-Q

e submetidos à análise. O equipamento foi calibrado usando solução padrão Silica Coloidal (ERM-FD102). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.6.3 Medida de pH

O pH das nanoemulsões foi avaliado em um pHmetro digital (Hanna Instruments HI 2221) equipado com eletrodo de vidro e sensor de temperatura. As análises foram realizadas em triplicata.

2.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das nanoemulsões foi avaliada em microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução (FEI TECNAIG2 200 kV). Uma gota da amostra foi depositada sobre um grid Holey Carbon (Sigma-Aldrich) e posteriormente contrastado com ácido fosfotungstico (Agar R1213) a 2%. Em seguida cada amostra foi lavada com água Milli-Q para retirada do excesso de contrastante.

2.7 Isolados bacterianos e condições de cultura

As atividades antimicrobiana e antibiofilme foram testadas em *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, cultivados em BHI ágar e mantidos em estufa por 24h a 37°C. A partir do cultivo foram preparadas suspensões em solução salina (0,9% NaCl), correspondendo a 0,5 na escala de McFarland, para serem usados nos experimentos.

2.8 Ensaio antimicrobianos e antibiofilme

Para este teste foi empregado o protocolo de Trentin e colaboradores (2011), utilizando cristal violeta em placas de microtitulação estéreis de poliestireno de fundo chato. Foram testados o óleo essencial puro e o β -cariofileno e suas respectivas nanoemulsões. Aos poços das microplacas foram adicionados 80 μ l da suspensão bacteriana, 80 μ l das soluções testes (concentração final variando de 8 a 0,3 mg/ml para os testes com óleo essencial e 4 a 0,03 mg/ml para o β -cariofileno) e 40 μ l de meio BHI caldo. Um controle substituindo o volume de solução de teste por água foi realizado. Após incubação a 37 °C por 24 h, o conteúdo dos poços foi removido e os mesmos lavados três vezes com solução salina a fim de remover as células não aderidas. As bactérias aderidas foram termofixadas em estufa a 60 °C por 1 h. A camada de biofilme formado foi corada com cristal violeta a 0,4% por 15 min a temperatura ambiente, em seguida o corante foi descartado e lavado com água até que restasse

apenas o que estava impregnado no biofilme. O corante ligado foi solubilizado com etanol 99,5% e após 30 min a absorbância foi medida a 570 nm. O crescimento planctônico das bactérias foi avaliado por diferença entre a absorbância medida a 600 nm no final e no início do tempo de incubação das placas de microtitulação. Tanto a formação de biofilme quanto o crescimento planctônico no controle foi considerada como 100%. Valores superiores a 100% representam estimulação da formação de biofilme ou crescimento planctônico em comparação com o controle.

2.9 Microscopia eletrônica de varredura

Biofilmes foram cultivados como descrito no item 2.7 com um *slide* de Thermanox™ Coverslips (Thermo Fisher Scientific) em cada poço. Após 24h de incubação a 37 °C, os slides foram removidos, lavados com solução salina e fixados em Glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,1 M, em seguida as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona P.A (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %). Os *slides* de Thermanox™ foram secos por CO₂ ponto crítico (CDP030 BALTEC) e fixados em stubs de alumínio para metalização com ouro. A densidade da formação de biofilme foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 200 FEG).

2.10 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais. Os resultados foram expressos como média da percentagem \pm desvio padrão. Diferenças entre grupos tratados e controle foram avaliadas por teste t não pareado e foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1 Composição química do óleo essencial

Através das análises cromatográficas foram identificados 54 compostos no óleo essencial das folhas de *T. catuaba*. Os quais estão distribuídos em duas classes, sendo os sesquiterpenos a classe dominante perfazendo cerca de 79,5% do óleo essencial, seguido dos monoterpenos com 18,8%. O composto majoritário do óleo essencial de *T. catuaba* é o β -cariofileno, constituindo cerca de 25,6% do teor do óleo. Dentre os compostos de menor proporção, se destacam o α -Copaeno (8,3%), α -himachaleno (7,9%), *Iso*-Silvestreno (5,8%), Linalool

butanoato (5.2%), α -Pineno (5.1%) e Guaieno (4.4%). Compostos entre 1 e 3% perfazem cerca de 19,8% do óleo e compostos com menos de 1% constituem cerca de 15,8% (tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos constituintes do óleo essencial obtido de folhas de *Tetragastris catuaba*.

Nº do pico	Compostos	IR ^a	IR ^b	%
1	α -Pineno	932	928	5.19
2	Sabineno	969	960	0.34
3	β -Pineno	974	971	2.62
4	Mirceno	988	985	0.25
5	δ -2-Careno	1001	999	0.20
6	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	1003	1001	3.84
7	<i>Iso</i> -Silvestreno	1007	1005	5.88
8	α -terpineno	1014	1011	0.35
9	Terpinen-4-ol	1174	1172	0.14
10	δ -Elemeno	1335	1331	0.44
11	α -Cubebeno	1345	1343	0.98
12	α -Ylangeno	1373	1370	0.37
13	α -Copaeno	1374	1375	8.33
14	2- <i>Epi</i> - β -funebreno	1411	1410	0.32
15	β -Ionol	1412	1414	0.90
16	β -Cariofileno	1417	1418	25.66
17	β -Cedreno	1419	1419	0.52
18	β -Ylangeno	1419	1420	0.17
19	β -Dupreziano	1421	1421	0.36
20	Linalool butanoato	1421	1421	5.20
21	β -Copaeno	1430	1428	0.46
22	β -Gurjuneno	1431	1433	0.42
23	γ -Elemeno	1434	1434	1.06
24	Guaieno	1437	1437	4.45

25	Aromadendreno	1439	1438	1.33
26	6,9-guaiadieno	1442	1441	0.70
27	α -himachaleno	1449	1445	7.95
28	Amorfa-4,11-dieno	1449	1450	0.48
29	<i>Cis</i> -Cadina-1(6),4-dieno	1461	1458	2.37
30	Aristolocheno	1487	1482	0.25
31	α -Cupreneno	1505	1501	0.62
32	γ -Cadineno	1513	1510	0.22
33	δ -Cadineno	1522	1519	0.36
34	γ -cupreneno	1532	1533	0.28
35	Elemol	1548	1542	2.62
36	Epi-longipinanol	1562	1565	0.14
37	Maaliol	1566	1566	0.42
38	Longipinanol	1567	1567	0.35
39	Óxido de Cariofileno	1582	1580	0.93
40	Thujopsan-2- α -ol	1586	1588	2.24
41	Viridiflorol	1592	1591	1.30
42	Cubeban-11-ol	1595	1592	0.72
43	<i>Cis</i> -dihidro-maiurono	1595	1594	0.22
44	Rosifoliol	1600	1598	0.46
45	Cedrol	1600	1600	0.13
46	Ledol	1602	1601	0.25
47	5-epi-7-epi- α -eudesmol	1607	1605	0.41
48	β -Atlantol	1608	1606	0.70
49	1,10-di-epi-cubenol	1618	1619	0.32
50	Isolongifolan-7- α -ol	1619	1620	0.60
51	10-epi- γ -eudesmol	1622	1621	1.06
52	Eremoligenol	1629	1630	0.46
53	Gymnomitrone	1631	1632	1.41

54	Epi- α -cadinol	1638	1635	0.55
	Monoterpenes			18.81
	Sesquiterpenes			79.49
	Total			98.30

^aÍndice de Retenção da literatura Adams (2009). ^bÍndices de Retenção calculados através dos tempos de retenção em relação aqueles da série de n-alcenos em uma coluna capilar apolar Crossbond®.

Frequentemente os compostos derivados de terpenos constituem a maior parte da composição dos óleos essenciais, como monoterpenos e sesquiterpenos (Simões & Spitzer, 1999). Para o gênero *Tetragastris* poucos trabalhos abordam a análise química de óleo essenciais, porém em seu estudo Zoghbi e colaboradores (1998), avaliaram a composição química da resina de *T. panamensis* encontrando como principais constituintes o β -cariofileno, α -pineno, óxido de cariofileno e δ -cadinene, sendo compostos também presentes em *T. catuaba*. O β -cariofileno é um sesquiterpeno comumente presente em óleos essenciais vegetais, e a literatura apresenta diferentes aplicações biológicas descritas, como atividade anestésica, anti-inflamatória, anticâncer, antimicrobiana além de usos em cosméticos e fragrâncias (Dahham et al., 2015; Ghelardini, Galeotti, Cesare, Mazzanti, & Bartolini, 2001; Skölld, Karlberg, Matura, & Börje, 2006; Tambe, Tsujiuchi, Honda, Ikeshiro, & Tanaka, 1996). No Brasil, *Tetragastris catuaba* também conhecida como Catuaba, apresenta aplicações na medicina popular com relatos de propriedade analgésicas, tônica, afrodisíaca e de estímulo ao sistema nervoso central (Daly, 1990). Dessa forma, *Tetragastris catuaba* e seus metabólitos podem ser potencialmente investigados quanto às suas propriedades biológicas.

3.2 Estabilidade das nanoemulsões

A partir da identificação da composição química do óleo de *T. catuaba* foi possível definir a elaboração das nanoemulsões do óleo essencial e do seu composto majoritário, o β -cariofileno. Diferentes concentrações de tensoativos foram testadas a fim de determinar um nível ótimo de suas proporções, sendo a proporção 9:1 (Tween 80: Span 80) a mais estável em suas características macroscópicas. As nanoemulsões formuladas se apresentaram como sistemas transparentes ou levemente turvos (Figura 2), características que definem esse tipo de emulsão dado o tamanho reduzido de suas partículas (McClements, 2011). Dessa forma, depois de avaliadas por 24 h, não havendo sinal de separação de fase ou agregação, a composição final das nanoemulsões foi definida em 2 % de fase oleosa (óleo essencial ou β -

cariofileno), 3 % de tensoativos e 95 % de fase aquosa contendo líquido iônico. O mesmo não foi observado para as misturas MF1 e MF2, havendo quebra da estabilidade após 24 h, como visto na figura 3.



Figura 2: Aparência visual das nanoemulsões preparadas com o óleo essencial de *Tetragastris catuaba* (A) e seu composto majoritário, β -cariofileno (B). Formulação contendo Tween 80, Span 80 e Líquido Iônico.

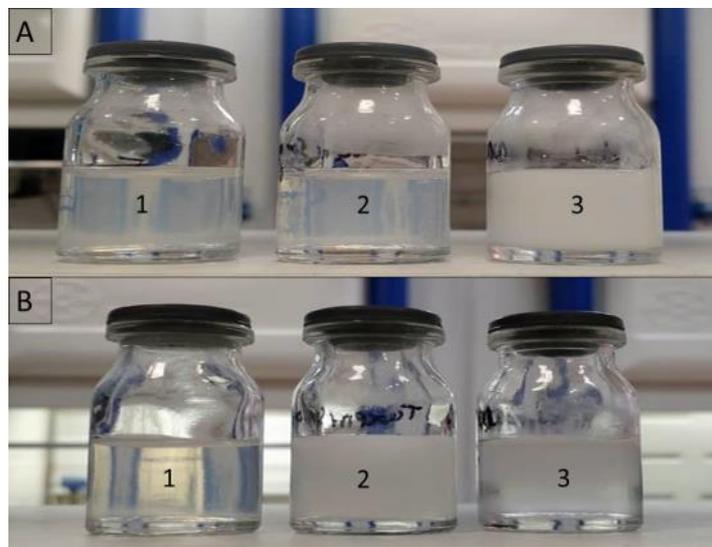


Figura 3: Aspectos visuais das nanoemulsões formuladas com β -cariofileno em 0h (A) e após 24h (B). 1: Nanoemulsão β -cariofileno, 2: Formulação β -cariofileno, Tween 80, Span 80 e água (MF1), 3: Formulação β -cariofileno, água, líquido iônico (MF2).

3.3 Caracterização físico-química das nanomulsões

3.3.1 Análises térmicas

Através das análises de TG e DSC foi possível avaliar estabilidade térmica do óleo essencial de *T. catuaba*, do β -cariofileno e de suas respectivas nanoemulsões. As curvas de TG do óleo essencial e do β -cariofileno livres estão demonstradas na figura 4. O óleo essencial mostrou um evento de degradação acentuada em 200°C com perda de massa de 74,17%, seguido de um platô na curva com degradação da amostra e perda de massa de 16,2% até 600°C. Comportamento semelhante pode ser observado para o β -cariofileno apresentando um pico de perda de massa de 86,36% em 203°C, com consequente degradação de 13,65% até 600°C. Ambos apresentam boa estabilidade térmica entre 40 e 100°C com perda de massa de 1,95% e 0,61%, para o óleo essencial e β -cariofileno, respectivamente. As curvas de DSC apresentam dois picos exotérmicos em 125,5°C e 483,3°C para o óleo essencial e 126,6°C e 472,4°C para o β -cariofileno, podendo ser relacionado à oxidação de componentes da amostra e consequente degradação oxidativa na maior temperatura, corroborando com dados da literatura que afirmam que a decomposição termo-oxidativa é uma reação exotérmica em óleos e gorduras vegetais (Pardaul et al., 2011). O pico endotérmico em 200,8°C para óleo e 207,3°C para o β -cariofileno podem estar relacionados à evaporação dos compostos voláteis com consequente perda de massa, o que pode ser confirmado pela análise de TG com picos de degradação na mesma faixa de temperatura.

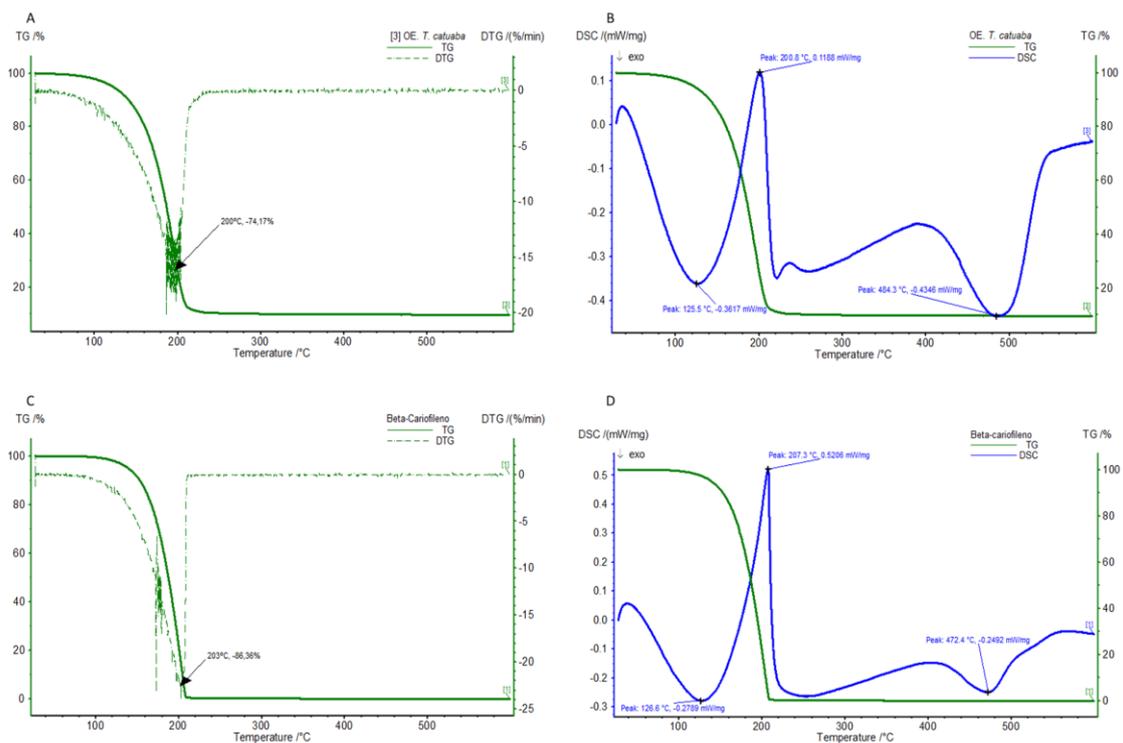


Figura 4: Curvas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras do óleo essencial e *Tetragastris catuaba* e β -cariofileno livres. A e B: TG e DSC do óleo essencial de *T. catuaba*, respectivamente. C e D: TG e DSC do β -cariofileno, respectivamente.

Para as nanoemulsões, as curvas de TG do óleo essencial e β -cariofileno se mostraram bastante semelhantes com picos de degradação em 127°C para ambas as amostras e perda de massa de 86,39% e 86,67% para as nanoemulsões do óleo e β -cariofileno, respectivamente (Figura 5). Comportamento semelhante foi obtido nas curvas de DSC, no qual um pico endotérmico pode ser observado nas duas amostras, em 129,2°C para a nanoemulsão do óleo e 126,6°C para a nanoemulsão do β -cariofileno. Este evento pode estar relacionado à perda de água, uma vez que esta constitui 95% da amostra. O mesmo foi detectado por Zhang e colaboradores (2013) onde formulações contendo mais de 65% de água apresentaram apenas um pico endotérmico, não sendo possível observar os demais componentes devido à grande proporção de água. As diferenças entre as curvas de TG e DSC das amostras de óleo e β -cariofileno livres e suas respectivas formulações, podem confirmar a formação de um sistema nanoemulsionado, com características de uma formulação óleo em água, onde a face externa do sistema é constituída por água.

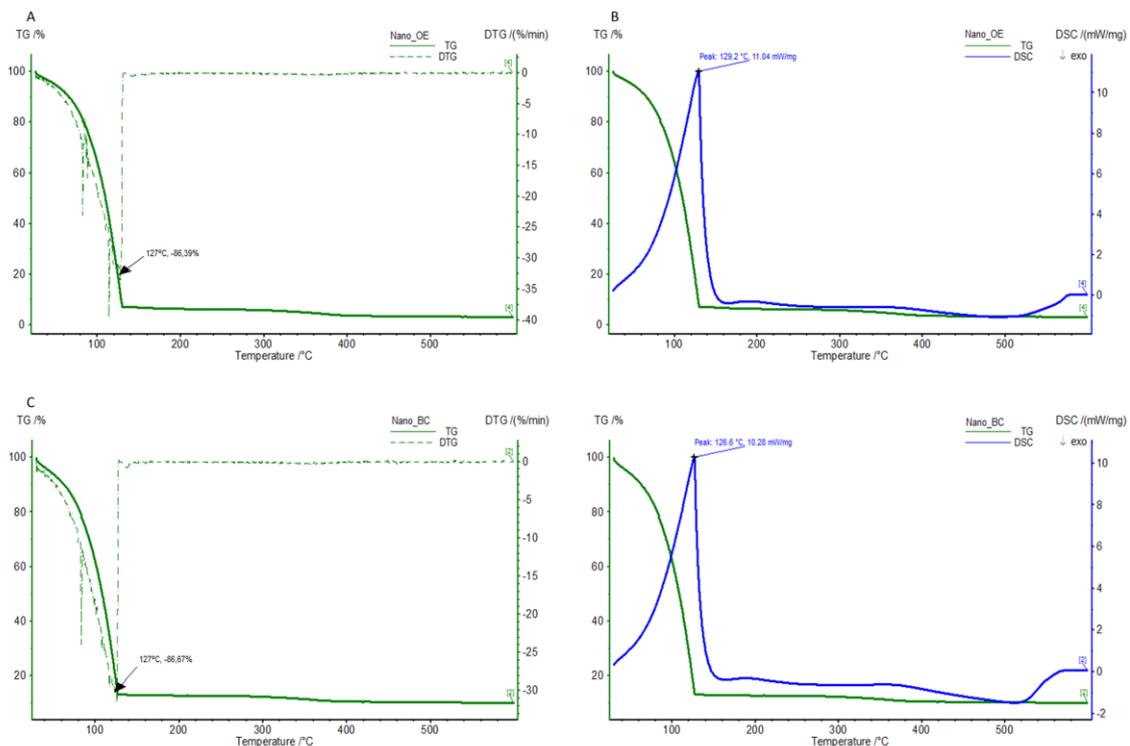


Figura 5: Curvas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras das nanoemulsões do óleo essencial e *Tetragastris catuaba* e do β -cariofileno. A e B: TG e DSC das nanoemulsões do óleo essencial de *T. catuaba*, respectivamente. C e D: TG e DSC das nanoemulsões do β -cariofileno, respectivamente.

3.3.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH

O tamanho de partícula é um importante parâmetro para avaliar a estabilidade das nanoemulsões. Um pequeno tamanho de partícula confere vantagens como boa estabilidade contra a separação gravitacional e agregação, além de permitir uma boa biodisponibilidade da substância encapsulada proporcionando melhor permeabilidade e penetração para diversas aplicações (Oca-Ávalos, Candal, & Herrera, 2017). As nanoemulsões do óleo essencial de *T. catuaba* e β -cariofileno apresentaram tamanho de partícula de $23,7 \pm 0,37$ nm e $31,2 \pm 1,24$ nm, respectivamente, com índices de polidispersividade (PDI) menor que 0,3 para as duas amostras (Tabela 2). O PDI indica a distribuição do tamanho das partículas, índices com valores próximos a 1 indicam um sistemas com uma ampla diversidade de tamanhos de partícula, enquanto que valores menores são característicos de sistemas monodispersos (Valderrama, Robles, & Serena, 2007). Dessa forma, as nanoemulsões formuladas no presente estudo apresentam padrão monomodal, com tamanhos de partícula homogêneos.

O potencial zeta mede o potencial existente entre a superfície da gotícula e do líquido dispersante, e também se apresenta como uma importante referência para avaliar a estabilidade de emulsões (Nor, Woi, & Ng, 2017). Seus valores indicam a existência de forças repulsivas entre as gotículas do sistema, conferindo estabilidade a formulação (Salvia-trujillo, Rojas-graü, Soliva-fortuny, & Martín-belloso, 2014). As nanoemulsões do óleo essencial de *T. catuaba* e β -cariofileno apresentaram potencial zeta de $-14,63 \pm 1,2$ e $-11,04 \pm 1,9$, respectivamente (Tabela 2), sendo suficiente para evitar a fusão das gotículas e manter a estabilidade da formulação.

Tabela 2: Propriedades físicoquímicas nanoemulsões formuladas com o óleo essencial de *Tetragastris catuaba* e β -cariofileno.

Nanoemulsão	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta	pH
Óleo essencial	$23,7 \pm 0,37$	0,186	$-14,63 \pm 1,2$	$7,7 \pm 0,02$
β -cariofileno	$31,2 \pm 1,24$	0,247	$-11,04 \pm 1,9$	$7,2 \pm 0,05$

A determinação do pH das formulações é um importante parâmetro para avaliar a compatibilidade do sistema com as aplicações desejadas. Para emulsões aplicadas em alimentos, por exemplo, o pH geralmente abrange faixas de 2,5 a 7,5 (McClements, 2015). O pH das nanoemulsões formuladas neste estudo, apresentou um caráter neutro a levemente

básico com valores de $7,7 \pm 0,02$ para nanoemulsão do óleo e $7,2 \pm 0,05$ para a nanoemulsão do β -cariofileno, indicando possíveis aplicações em indústrias de alimentos (tabela 2).

3.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das gotículas das nanoemulsões foi investigada através de MET. A figura 6 ilustra as imagens das nanoemulsões formuladas com o óleo essencial e o β -cariofileno, respectivamente. É possível observar pequenas gotículas agregando-se em forma de clusters na nanoemulsão formulada com o óleo essencial, como mostrado pela seta na figura 6A. No entanto, as gotículas formadas pela nanoemulsão do β -cariofileno apresentam-se dispersas, com partículas esféricas (Figura 6B). Essa diferença morfológica entre as duas amostras, pode ser decorrente da complexidade da composição do óleo essencial quando comparado à formulação com um composto puro, o β -cariofileno.

Tais resultados confirmam a capacidade dos tensoativos utilizados reterem a fase oleosa dentro das gotículas, típico de formulações óleo em água. Resultados semelhantes foram descritos por Hussein e colaboradores (2017) ao elaborar nanoemulsões contendo carvacrol, um monoterpeneo comum em óleos essenciais. Em seu estudo também foi possível observar a formação de pequenas gotículas da nanoemulsão envolvidas pelo surfactante tween 80, formando um aglomerado de pequenas partículas envoltas pelo surfactante, semelhante ao encontrado no presente estudo.

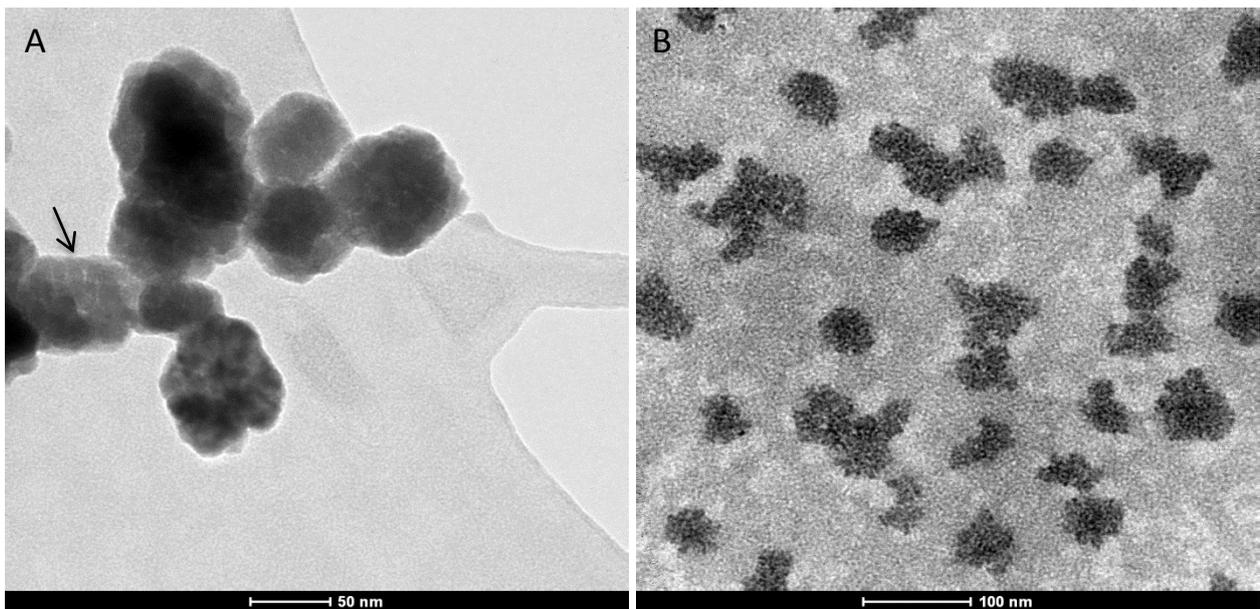


Figura 6. Micrografias obtidas por MET de nanoemulsões contendo o óleo essencial de *T. catuaba* (A) e β -cariofileno (B). Seta: Formação de pequenas gotículas.

3.4 Atividade antimicrobiana e antibiofilme

As atividades antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial e de sua nanoemulsão se mostraram mais pronunciada frente *E. faecalis* e *L. monocytogenes* que a atividade do seu composto isolado, o β -cariofileno (tabela 3). Na presença do óleo essencial, *E. faecalis* apresentou crescimento e biofilmes reduzidos em mais de 50% nas concentrações de 8 a 4 mg/mL, sendo que na menor concentração houve uma inibição de $60\% \pm 1,4$ de bactérias planctônicas e $52\% \pm 2,5$ do biofilme. A nanoemulsão do óleo essencial permitiu uma redução no crescimento microbiano até a concentração 2 mg/mL (inibição de 62,1%), e promoveu uma forte inibição do crescimento bacteriano de $83,9\% \pm 1,2$ e da formação de biofilme em $58,7\% \pm 2,1$ em 6mg/mL. Também foi observado atividade para o β -cariofileno na concentração de 4 mg/mL, demonstrando inibição do crescimento microbiano de $64,5\% \pm 5,1$ e formação de biofilme de $53,98\% \pm 6,4$, e para a nanoemulsão apenas ação antimicrobiana em 2mg/mL ($53,5\% \pm 1,2$).

Para *L. monocytogenes* o óleo essencial foi capaz de inibir a formação de biofilme em mais de 50% para todas as concentrações testadas, porém em 6 mg/mL é possível observar a ação antimicrobiana e antibiofilme simultaneamente, com inibição de crescimento de $49,6\% \pm 0,6$ e biofilme de $65,1\% \pm 2,4$. Para a nanoemulsão a concentração de 8mg/mL impediu o crescimento de $71,6\% \pm 1,8$ e do biofilme de $58,94\% \pm 1,6$. Não houve ação antimicrobiana e antibiofilme constatada nos testes com o β -cariofileno e sua nanoemulsão, como pode ser observado na tabela 3.

Os óleos essenciais são formados por uma mistura complexa de compostos em diferentes proporções, dessa forma é difícil atribuir a ação antimicrobiana a apenas um composto. Compostos em menores concentrações podem ser altamente importantes para definir a atividade biológica do óleo essencial, além de atuarem em sinergismo com os demais componentes da mistura (Ayala-Zavala, González-Aguilar, & Toro-Sánchez, 2009). Possivelmente componentes de menor proporção podem atuar em sinergismo no óleo essencial de *T. catuaba* para promover a ação antimicrobiana e antibiofilme, sendo a causa da ausência de atividade do β -cariofileno frente *L. monocytogenes*. As diferenças químicas entre os componentes do óleo também podem apresentar tempos de liberação diferentes no sistema nanoemulsionado. Abu-Fayyad e colaboradores (2018) observaram que o tempo de liberação de fármacos pode ser diferente dependendo das características lipofílicas dos componentes encapsulados. Nesse contexto, a biodisponibilidade de cada componente do óleo de *T.*

catuaba através das nanoemulsões pode ser diferenciada influenciando no comportamento da atividade antimicrobiana e antibiofilme.

Tabela 3: Atividade biológica de óleo essencial (OE), β -Cariofileno (BC) e suas respectivas nanoemulsões contra a formação de biofilme e crescimento de *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*.

Concentração (mg/ml)	<i>Enterococcus faecalis</i>				<i>Listeria monocytogenes</i>			
	Óleo Essencial		Nanoemulsão OE		Óleo Essencial		Nanoemulsão OE	
	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano
8	46,1 ± 1,4*	28,2 ± 0,6*	34,9 ± 1,2*	8,0 ± 1,5*	38,1 ± 2,7*	50,0 ± 0,9*	41,1 ± 1,6*	28,5 ± 1,9*
6	46,2 ± 1,8*	27,3 ± 1,0*	41,3 ± 2,1*	16,1 ± 1,2*	35,0 ± 2,5*	50,4 ± 0,7*	51,2 ± 2,1*	46,3 ± 1,2*
4	47,7 ± 2,5*	39,9 ± 1,4*	69,5 ± 6,4*	29,3 ± 5,2*	37,7 ± 2,8*	77,8 ± 6,3*	67,3 ± 3,4*	63,5 ± 2,1*
2	59,2 ± 3,1*	47,7 ± 2,0*	83,5 ± 6,1	37,9 ± 3,1*	35,8 ± 2,8*	88,5 ± 6,3	78,7 ± 3,7*	82,7 ± 4,0*
1	66,1 ± 5,6*	60,9 ± 1,7*	77,6 ± 2,7*	53,0 ± 2,1*	29,8 ± 1,7*	80,7 ± 2,8*	67,7 ± 2,3*	93,2 ± 4,5
0,5	86,3 ± 5,8*	61,8 ± 1,1*	102,0 ± 8,2	56,2 ± 2,5*	27,6 ± 1,1*	77,8 ± 3,4*	65,9 ± 2,2*	88,1 ± 2,2
0,25	88,1 ± 5,5	70,5 ± 2,0*	118,5 ± 10,2	69,0 ± 3,5*	28,6 ± 0,8*	75,5 ± 1,4*	61,3 ± 2,4*	90,5 ± 1,1
0,125	80,9 ± 3,9*	81,8 ± 2,2*	101,8 ± 3,5	72,4 ± 3,7*	31,9 ± 2,2*	77,4 ± 2,6*	60,9 ± 2,4*	92,6 ± 1,5
0,6	87,5 ± 1,8*	97,3 ± 2,5	86,6 ± 5,4	81,4 ± 3,5*	39,3 ± 1,7*	78,1 ± 2,1*	62,2 ± 2,1*	91,4 ± 1,2
0,3	79,9 ± 3,8*	98,1 ± 1,7	86,9 ± 3,8	104,1 ± 1,8	40,7 ± 2,4*	91,8 ± 4,6	75,9 ± 3,8*	99,9 ± 1,2
Concentração (mg/ml)	β -Cariofileno		Nanoemulsão BC		β -Cariofileno		Nanoemulsão BC	
	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano
	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano	Formação de biofilme	Crescimento bacteriano
4	46,0 ± 6,4*	35,5 ± 5,2*	88,2 ± 2,6	51,1 ± 2,6*	68,5 ± 1,3*	67,4 ± 2,1*	73,3 ± 3,8*	82,9 ± 1,4*
2	70,1 ± 5,5*	42,7 ± 3,4*	74,7 ± 4,1*	46,6 ± 1,3*	73,0 ± 2,7*	66,7 ± 2,2*	73,8 ± 3,9*	93,1 ± 4,7
1	70,4 ± 3,7*	47,7 ± 4,4*	77,2 ± 3,5*	50,7 ± 2,2*	83,4 ± 2,0*	76,9 ± 5,7*	75,2 ± 3,6*	97,7 ± 5,5
0,5	78,7 ± 5,8*	51,5 ± 4,5*	86,1 ± 4,8*	65,6 ± 4,5*	79,9 ± 1,8*	73,8 ± 5,7*	68,9 ± 4,5*	88,2 ± 7,1
0,25	79,6 ± 7,2*	59,6 ± 3,2*	89,7 ± 6,6	51,7 ± 4,1*	78,5 ± 2,0*	72,4 ± 2,6*	63,3 ± 2,9*	77,2 ± 2,7*
0,125	81,7 ± 1,8*	52,0 ± 4,0*	105,0 ± 1,6	51,4 ± 4,6*	75,5 ± 2,6*	73,5 ± 4,5*	59,9 ± 2,7*	74,2 ± 2,8*
0,6	72,2 ± 8,2*	51,9 ± 3,8*	100,7 ± 2,8	62,7 ± 4,4*	67,9 ± 2,2*	74,9 ± 4,9*	57,5 ± 1,9*	75,8 ± 3,0*
0,3	81,6 ± 4,1*	57,9 ± 2,1*	100,0 ± 2,4	76,6 ± 3,2*	71,6 ± 1,7*	74,6 ± 3,3*	61,4 ± 3,6*	97,5 ± 6,2

*Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

A fim de observar a formação do biofilme entre os diferentes tratamentos, micrografias foram obtidas através de MEV. As imagens mostram a formação de uma camada densa e uniforme dos biofilmes formados por *E. faecalis* e *L. monocytogenes* nas superfícies não submetidas ao tratamento (Fig. 7 A e E). Por outro lado, os biofilmes tratados com os compostos que foram ativos apresentaram uma redução significativa na densidade de bactérias aderidas, formando pequenos agregados espaçados (Fig. 7). Tais resultados corroboram com os dados obtidos pelo ensaio com cristal violeta. Ainda é possível observar que para *E. faecalis* os tratamentos provocaram uma modificação estrutural na célula bacteriana, apresentando células arredondadas e com parede celular deformada (Fig. 7 B, C e D).

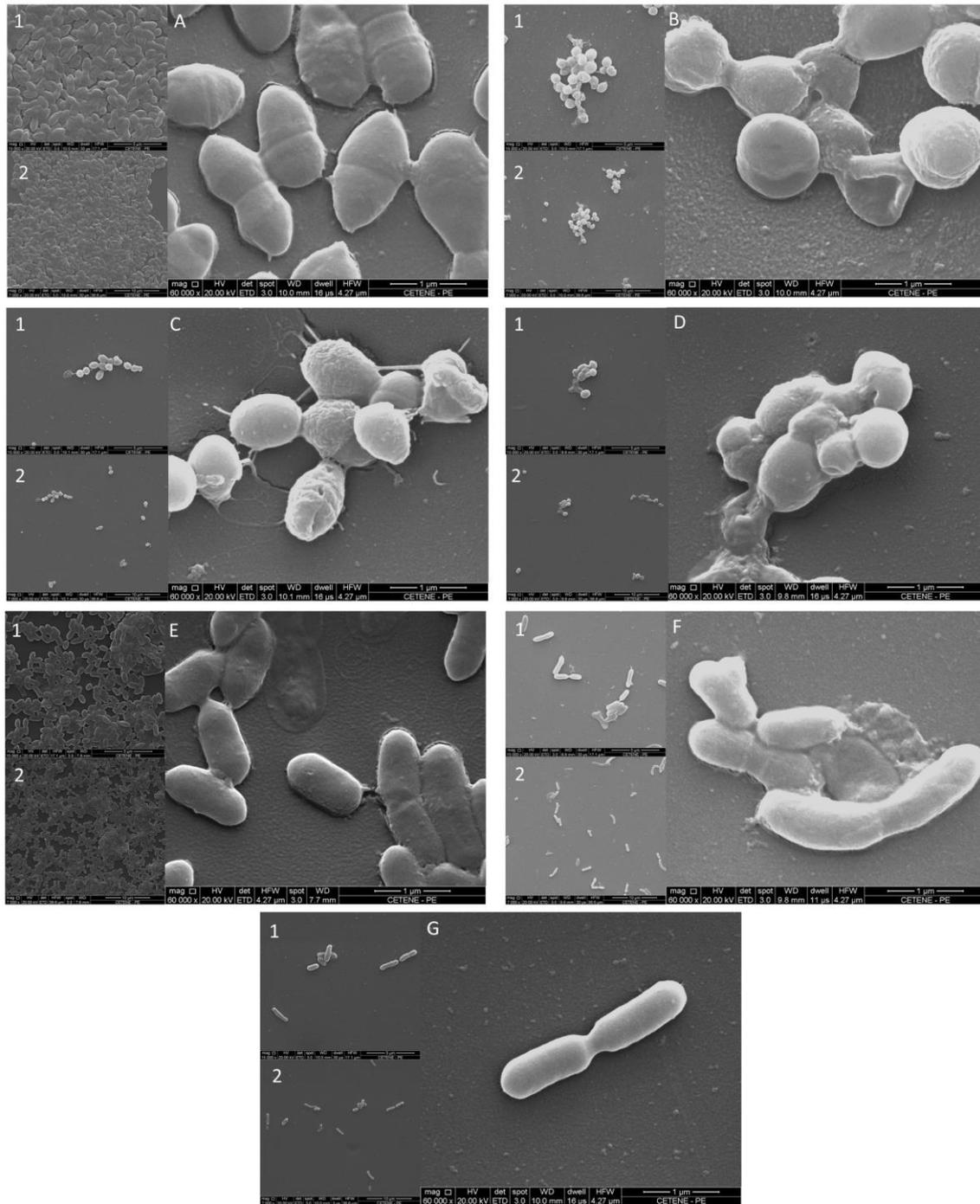


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. (A) Controle *E. faecalis* não tratado. (B, C e D) *E. faecalis* tratado com β -cariofileno 4 mg/ml, óleo essencial 4mg/ml, e nanoemulsão do óleo essencial 6 mg/ml, respectivamente. (E) Controle *L. mnocytogenes* não tratado. (F e G) óleo essencial 6 mg/ml e nanoemulsão óleo essencial 6 mg/ml, respectivamente. Barra de escala: Magnificação de 60.000 X (Nas imagens inseridas: (1) magnificação de 15000 X, (2) magnificação de 7000X).

4. Conclusões

O óleo essencial de *Tetragastris catuaba* se mostrou efetivo no controle de bactérias planctônicas e em biofilme, porém a sua atividade pode estar relacionada a compostos presentes em menor concentração em sua composição, uma vez que o seu composto majoritário, o β -cariofileno, não foi efetivo contra *L. monocytogenes*. As nanoemulsões formuladas se apresentaram estáveis, e se mostraram um ótimo meio de dispersão do óleo essencial para a sua aplicação. Os resultados de quantificação de biofilme por cristal violeta foram corroborados pelos achados por microscopia eletrônica de varredura, sendo observado a redução significativa na densidade dos biofilmes submetidos ao tratamento com o óleo essencial e sua nanoemulsão.

5. Referencias Bibliográficas

- Abu-Fayyad, A., Kamal, M. M., Carroll, J. L., Dragoi, A. M., Cody, R., Cardelli, J., & Nazzal, S. (2018). Development and in-vitro characterization of nanoemulsions loaded with paclitaxel/ γ -tocotrienol lipid conjugates. *International Journal of Pharmaceutics*, 536(1), 146–157.
- Adams, R. P. (2009). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (Fourth). Carol Stream, IL: Allured Publishing Co.
- Arancibia, C., Miranda, M., Matiacevich, S., & Troncoso, E. (2017). Food Hydrocolloids Physical properties and lipid bioavailability of nanoemulsion-based matrices with different thickening agents. *Food Hydrocolloids*, 73, 243–254.
- Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., & Toro-Sánchez, L. (2009). Enhancing Safety and Aroma Appealing of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using the Antimicrobial and Aromatic Power of Essential Oils. *Journal of Food Science*, 74(7), 84–91.
- Bakshi, U., Sarkar, M., Paul, S., & Dutta, C. (2016). Assessment of virulence potential of uncharacterized *Enterococcus faecalis* strains using pan genomic approach - Identification of pathogen-specific and habitat-specific genes. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C.

- (2014). Essential Oils Loaded in Nanosystems : A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–14.
- Callender, S. P., Mathews, J. A., Kobernyk, K., & Wettig, S. D. (2017). Microemulsion utility in pharmaceuticals : Implications for multi-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 526, 425–442.
- Dahham, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B. K., Ezzat, M. O., Majid, A. S. A., & Majid, A. M. S. A. (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 20, 11808–11829.
- Daly, D. C. (1990). and the forests of The genus *Tetragastris* eastern Brazil, 45(1), 179–194.
- Epelboin, L., & Bossi, P. (2011). Listeriosis. *EMC - Tratado de Medicina*, 15(1), 1–8.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1–24.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Cesare, L. Di, Mazzanti, G., & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, 56, 387–389.
- Hussein, J., El-Bana, M., Refaat, E., & El-Naggar, M. E. (2017). Synthesis of carvacrol-based nanoemulsion for treating neurodegenerative disorders in experimental diabetes. *Journal of Functional Foods*, 37, 441–448.
- Malafaia, C. B., Jardelino, A. C. S., Silva, A. G., de Souza, E. B., Macedo, A. J., Correia, M. T. D. S., & Silva, M. V. (2017). Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Ecology*, 1–7.
- Mcclements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions : fabrication , properties , and functional performance. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 2297–2316.
- MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions - principles, practices, and techniques. THIRD EDIT

- ed. [s.l.] CRC Press, 2015.
- Nagawa, C., Böhmendorfer, S., & Rosenau, T. (2015). Chemical composition and anti-termitic activity of essential oil from *Canarium schweinfurthii* Engl. *Industrial Crops & Products*, 71, 75–79.
- Nor, S. B. M., Woi, P. M., & Ng, S. H. (2017). Characterisation of ionic liquids nanoemulsion loaded with piroxicam for drug delivery system. *Journal of Molecular Liquids*, 16, 1–6.
- Oca-Ávalos, J. M. M., Candal, M. L., & Herrera, L. (2017). Nanoemulsions: stability and physical properties. *Current Opinion in Food Science*, 16, 1–6.
- Pardauil, J. J. R., Souza, L. K. C., Molfetta, F. A., Zamian, J. R., Rocha, G. N., & Costa, C. E. F. (2011). Bioresource Technology Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. *Bioresource Technology*, 102(10), 5873–5877.
- Prakash, B., Mishra, P. K., Kedia, A., & Dubey, N. K. (2014). LWT - Food Science and Technology Antifungal , antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its in vivo practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L . fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 240–247.
- Salvia-trujillo, L., Rojas-graü, A., Soliva-fortuny, R., & Martín-belloso, O. (2014). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food- grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43, 547–556.
- Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2010). The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *International Journal of Inflammation*, 2010, 1–12.
- Silva, L. N., Trentin, D. D. S., Zimmer, K. R., Treter, J., Brandelli, C. L. C., Frasson, A. P., ... Macedo, A. J. (2015). Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*, 53(3), 464–468.

- Simões, C. M. O., & Spitzer, V. (1999). Óleos voláteis. In *Farmacognosia da planta ao medicamento* (pp. 467–495). Porto Alegre: UFRGS.
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49.
- Skölld, M., Karlberg, A., Matura, M., & Börje, A. (2006). The fragrance chemical β -caryophyllene — air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology* 44, 44, 538–545.
- Tambe, Y., Tsujiuchi, H., Honda, G., Ikeshiro, Y., & Tanaka, S. (1996). Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, β -Caryophyllene. *Planta Medica*, 62, 469–470.
- Trentin, D. D. S. da S., Giordani, R. B., & Macedo, A. J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. *Revista Liberato*, 14(22), 113–238.
- Trentin, D. D. S., Giordani, R. B., Zimmer, K. R., Da Silva, A. G., Da Silva, M. V., Correia, M. T. D. S., ... MacEdo, A. J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 327–335.
- Valderrama, J. O., Robles, P. A., & Serena, L. (2007). Critical Properties, Normal Boiling Temperatures, and Acentric Factors of Fifty Ionic Liquids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1338–1344.
- Van den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463–471.
- Vu, J., & Carvalho, J. (2011). *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis,

- diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology*, 6(5), 357–366.
- Vuuren, S. F. Van, Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. (2010). Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African Journal of Botany*, 76(4), 686–691.
- Yagi, S., Babiker, R., Tzanova, T., & Schohn, H. (2016). Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(8), 763–770.
- Younoussa, L., Nukenine, E. N., Pierre, S., Danga, Y., & Esimone, C. O. (2016). Repellent activity of the creams formulated from *Annona senegalensis* and *Boswellia dalzielii* leaf fractions and essential oils against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(12), 973–978.
- Zhang, H., Taxipalati, M., Que, F., & Feng, F. (2013). Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques. *FOOD CHEMISTRY*, 141(3), 3050–3055.
- Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, 6, 21.
- Zoghbi, M. G. B., Andrade, E. H. A., Santos, A. S., Luz, A. I. R., & Maia, J. G. . (1998). Volatile Constituents of the Resins from *Protium subserratum* (Engl .) Engl . and *Tetragastris panamensis* (Engl .) Kuntz. *Journal of Essential Oil Research*, 10(May 2013), 325–326.

3.2 ARTIGO 2

Atividade antitumoral de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Tetragastris catuaba* (Burseraceae) em células de câncer cervical humano

Artigo a ser traduzido e submetido à revista *Industrial Crops and Products*

IF: 3.181

Qualis: B1

Atividade citotóxica em células de câncer cervical humano de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Tetragastris catuaba* (Burseraceae)

Rayane Cristine Santos da Silva*¹; Wesley Felix de Oliveira²; Paulo Euzébio de Cabral Filho³; Alexandre Gomes da Silva²; Márcia Vanusa da Silva²; Clarissa Piccinin Frizzo⁴; Maria Tereza dos Santos Correia²; Giovanna Machado*¹.

¹ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Autor para correspondência:

E-mail: rayanecss@yahoo.com.br; giovanna@cetene.gov.br

Tel.: +55 81 3334 7200

Resumo

O presente estudo investigou o potencial anticâncer do óleo essencial de *Tetragastris catuaba*, de seu composto majoritário, o β -cariofileno, e de nanoemulsões formuladas a partir dos mesmos frente células de câncer cervical humano. O óleo essencial foi extraído a partir da técnica de hidrodestilação. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de citotoxicidade pelo método MTT. E a avaliação do mecanismo de morte foi definida através dos marcadores Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo. A morfologia celular foi evidenciada corando-se as células com Azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa e observando-se em microscopia óptica. Os resultados obtidos evidenciaram a atividade citotóxica dos compostos estudados com valores de CC_{50} de 28,68 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial, 43,08 $\mu\text{g/mL}$ para o β -cariofileno, 34,60 $\mu\text{g/mL}$ para a nanoemulsão do óleo e 31,67 $\mu\text{g/mL}$ para a nanoemulsão do β -cariofileno. Os estudos revelaram ação citotóxica via apoptose dos compostos avaliados e

tais resultados foram corroborados pelas imagens obtidas por microscopia óptica. Os resultados sugerem que o óleo essencial e suas formulações derivadas, podem ser potencialmente estudados quanto ao seu uso como agentes terapêuticos no tratamento do câncer cervical.

Palavras Chave: Nanoemulsão, óleo essencial, HeLa, Apoptose, Citotoxicidade.

1. Introdução

O câncer de colo do útero está classificado como o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres no mundo (Bruni et al., 2017). Estima-se que 2.784 milhões de mulheres com idade igual ou superior a 15 anos estejam sob risco de desenvolver a doença, sendo que cerca de 527.24 mulheres são diagnosticadas anualmente com o câncer, e aproximadamente 265.672 chegam a óbito (Bruni et al., 2017). Grande parte dos casos de câncer cervical ocorrem em países menos desenvolvidos (cerca de 85%), sendo o mais comum entre mulheres em países da África Oriental e África Central (Ferlay et al., 2015). O papiloma vírus humano (HPV) é encontrado em 99% dos casos de câncer cervical e é considerado a causa desse tipo de câncer em infecções persistentes pelo vírus (Newton and Mould, 2016). Os subtipos de alto risco 16, 18, 31 e 45 estão associados à inicialização intraepitelial e invasiva do câncer cervical, sendo que os tipos HPV 16 e HPV 18 são encontrados em cerca de 70% dos casos (Mahantshetty et al., 2017; Saranath et al., 2002).

O câncer cervical pode se apresentar de duas formas, como um carcinoma de células escamosas (75%) ou como um adenocarcinoma que surge do tecido intraepitelial glandular (20%) (Newton and Mould, 2016). Esse tipo de câncer pode se espalhar para outros tecidos do organismo, e alguns fatores de risco como grau, tamanho e profundidade de invasão do tumor, podem determinar o risco de metástase (Newton and Mould, 2016). Dependendo do estágio da doença, o tratamento pode ser feito por cirurgia radical e/ou por quimio-radioterapia (Wuertz et al., 2017). Nesse contexto, novas abordagens terapêuticas têm sido investigadas para o tratamento dessa doença e a nanotecnologia tem se apresentado como uma nova plataforma no tratamento do câncer. A nanotecnologia aborda o desenvolvimento de estruturas menores que 100 nm e apresentam vantagens como área superficial elevada, química de superfície variada e possibilidade de combinação com fármacos para entrega controlada, diminuindo a toxicidade sistêmica e efeitos adversos (Sajja et al., 2009). As nanoemulsões são emulsões convencionais de tamanho nanométrico (20 a 100 nm) e assim

como outros sistemas nanoestruturados, apresentam vantagens semelhantes (McClements, 2010). As nanoemulsões são dispersões, normalmente óleo em água, estabilizadas por moléculas de surfactantes que formam um filme interfacial entre as diferentes fases. Diferente das emulsões convencionais, esses sistemas são mais estáveis, transparentes ou translúcidos, e apresentam maior vida útil devido ao reduzido tamanho de partícula (Shafiq et al., 2007). Graças a sua eficácia em solubilizar drogas hidrofóbicas, as nanoemulsões têm sido investigadas como veículos para aplicações farmacêuticas, incluindo a administração parenteral de medicamentos (Ganta et al., 2014). No tratamento do câncer, por exemplo, nanoemulsões formuladas com Clorambucil, medicamento utilizado para o tratamento de diferentes tipos de câncer, apresentaram eficácia terapêutica melhorada sem aumento de toxicidade, sugerindo que esses sistemas podem produzir um perfil farmacocinético otimizado (Ganta et al., 2010).

Compostos produzidos por vegetais podem apresentar um especial potencial antineoplásico e são facilmente encontrados na natureza (Xie et al., 2016). Os óleos essenciais são uma mistura complexa de compostos voláteis produzidos por plantas aromáticas de diferentes espécies. Diversos trabalhos na literatura comprovam os efeitos anticancerígenos dos óleos essenciais através de dados experimentais *in vitro*, *in vivo* e clínicos (Patel and Gogna, 2015). Para o câncer cervical, a atividade citotóxica tem sido relatada para óleos essenciais e para compostos isolados destes (Bardaweel et al., 2014; Sakalar et al., 2013; Santana et al., 2012; Sun et al., 2009).

A família botânica Burseraceae inclui espécies aromáticas produtoras de óleos essenciais de valor econômico (Vuuren et al., 2010). A espécie *Tetragastris catuaba* pertence à família Burseraceae e é uma árvore de médio a grande porte, encontrada nos estados da Bahia e Pernambuco no Brasil, porém estudos sobre o potencial biotecnológico desta espécie é escasso (Daly, 1990). No presente estudo, foi avaliado o potencial citotóxico contra uma linhagem de câncer cervical humano (HeLa), do óleo essencial de *T. catuaba*, de seu composto majoritário (β -carifileno) e de nanoemulsões formuladas com os mesmos. O mecanismo de morte celular também foi avaliado para os compostos com atividade citotóxica significativa.

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção do material vegetal

Amostras *T. catuaba* foram coletadas na Usina São José, município de Goiana, Pernambuco. O material foi identificado e uma excisata de número 96.789 foi depositada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

2.2 Extração do óleo essencial

Para obtenção do óleo essencial (OE) de *T. catuaba* foram utilizados cerca de 500 g de folhas frescas, as quais foram trituradas juntamente com 2,5 L de água destilada. O material foi transferido para um balão volumétrico de fundo redondo de 5 L, e mantido em uma manta aquecedora à temperatura de 160 °C – 170 °C. O balão foi acoplado a um aparato de Clevenger conectado a um condensador durante um período de 4h para o processo de hidrodestilação. O óleo extraído foi coletado, tratado com sulfato de sódio anidro para retirada da água remanescente e mantido sob refrigeração (-24 °C) até o uso nos experimentos.

2.3 Preparo das nanoemulsões

O preparo e a caracterização das nanoemulsões já foi descritos previamente em trabalho produzido pela autora (Silva et al., 2018; Capítulo 1).

2.4 Cultivo de células HeLa

Células de câncer cervical humano HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. Culturas com confluência de 70% ou mais foram tratadas com solução de Tripsina 0,5% - EDTA 0,025% por 5 min a 37 °C, a fim de soltar as células aderidas ao frasco de cultura. Após a incubação, as células desprendidas foram coletadas e meio de cultura suplementado com SFB foi adicionado para inibir a ação proteolítica da Tripsina. A densidade celular foi estimada através da contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para experimentos biológicos foi utilizado uma densidade celular de 1 x 10⁵ células/mL.

2.5 Avaliação da morte celular por MTT

Para avaliação da atividade citotóxica do OE, seu composto majoritário (β -cariofileno), e suas respectivas nanoemulsões foi realizado o ensaio pelo método MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich), que consiste na redução do MTT por meio de redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, formando cristais azuis de formazan.

Para o ensaio, as células foram incubadas em placas de 96 poços durante 24h para promover a adesão celular. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução tampão fosfato salina (PBS). As soluções de teste foram preparadas em diferentes concentrações (60-1,87 $\mu\text{g/mL}$) e diluídas em meio de cultura. As células tratadas e um controle contendo apenas meio de cultura foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 72h. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e 100 μL de meio contendo 10 μL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado. Após 3h de incubação a solução contendo MTT foi removida e os cristais de formazan formados foram solubilizados por agitação durante 15 min com dimetilsulfóxido (DMSO). A viabilidade celular foi medida pela comparação da absorbância ($\lambda=595$ nm) entre os grupos tratados e o controle não tratado.

2.6 Ensaio Anexina V/ Iodeto de Propídeo

A análise de citometria de fluxo foi conduzida com o objetivo de avaliar a via de morte celular. Para o experimento, as células foram incubadas em placas de 24 poços durante 72h conforme descrito no item 2.5. As células foram submetidas ao tratamento com concentrações equivalentes a CC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células). Após 72h de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS para retirada do material remanescente. Posteriormente, as células foram desprendidas com 100 μL de Tripsina e centrifugadas com meio de cultura por 2 min. a 3400 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado com PBS. O material foi centrifugado conforme condições prévias. O pellet obtido foi ressuspensionado em 200 μL do tampão de ligação (100 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) e transferido para um tubo de citômetro devidamente marcado. Anexina V-FITC (Sigma Aldrich) (1:500) e Iodeto de Propídeo (IP - 20 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados e o material foi mantido em temperatura ambiente por 10 min na ausência de luz. As análises foram conduzidas em um Citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6, Becton Dickinson). Um total de 20.000 células foram quantificadas em cada experimento após excitação a 488 nm. A emissão foi detectada com o filtro de

passagem de banda em 530/40 nm para a detecção de Anexina V e também 585/20 nm para iodeto de propídio e os dados coletados foram processados pelo software C6 (Becton-Dickinson). Células em processo apoptótico foram marcadas apenas com Anexina V-FITC. Células necróticas foram marcadas com IP e Anexina V-FITC. Células vivas não foram marcadas com nenhum dos corantes.

2.7 Análise de morfologia celular

A análise da morfologia celular foi conduzida em um microscópio óptico Leica DM500 (Version 2.0.0) acoplado a câmera Leica ICC50 HD. Para o ensaio células foram cultivadas em placas de 24 poços segundo descrito no item 2.5 por 72h. As células foram submetidas ao tratamento com concentrações equivalentes a CC_{50} . Lamínulas de vidro estéreis foram dispostas no fundo da placa como substrato para a adesão celular. Após o período de incubação, as lamínulas foram removidas e lavadas com PBS. As células aderidas foram fixadas com fixador Bouin (75% de ácido pícrico, 20% de formol e 5% de ácido acético) por 5 min. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com água destilada, seguido de uma lavagem com etanol 70%, e uma lavagem com metanol por 2 min. As células foram coradas com Azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck) por 20 min. Após secas, as lamínulas foram fixadas em lâminas de vidro e observadas em microscópio para obtenção das imagens.

2.8 Estatística

A significância estatística da atividade citotóxica das amostras testadas foram analisadas por teste t não pareado e expressas como a média \pm DP, usando o software GraphPad Prism 5. Os experimentos foram conduzidos em no mínimo duplicatas experimentais. Os valores de CC_{50} foram calculados pela curva dose-resposta usando o modelo de regressão modelo Probit no software PASW Statistics 18. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados e Discussão

Em estudo conduzido previamente, reportamos a composição química do óleo essencial e as propriedades físico-químicas das nanoemulsões utilizadas no presente trabalho (Silva et al., 2018, Capítulo 1). A análise desses dados revelaram as seguintes conclusões gerais: a análise química do óleo essencial indicou que o óleo de *T. catuaba* é rico em sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno o composto predominante, representando 25,6% do teor do óleo, seguido do α -

Copaeno (8,3%) e α -himachaleno (7,9%). No total 54 compostos foram descritos. As nanoemulsões formuladas com o óleo essencial e o β -cariofileno apresentaram tamanho de partícula de $23,7\pm 0,37\text{nm}$ e $31,2\pm 1,24\text{nm}$, respectivamente, e um perfil de distribuição de partículas monomodal. Além disso, o potencial zeta revelou uma carga de superfície negativa, sendo o potencial da nanoemulsão do óleo essencial de $-14,63\pm 1,2$ e do β -cariofileno de $-11,04\pm 1,9$. Após a obtenção desses dados o presente estudo foi conduzido.

Na avaliação de citotoxicidade os resultados indicam que após 72h de incubação a atividade citotóxica se apresentou dose-dependente, havendo uma alta taxa de mortalidade nas maiores concentrações frente as células HeLa (Figura 1). Para o óleo essencial e o β -cariofileno livres houve uma taxa de mortalidade de $72,8\pm 3,9\%$ e $65,9\pm 3,6\%$ na concentração de $60\ \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 1A). Para as nanoemulsões a mesma concentração revelou uma mortalidade de $89,8\pm 1,8\%$ para a nanoemulsão do óleo e $95,92\pm 0,4\%$ para a nanoemulsão do β -cariofileno (Figura 1B). Através da análise estatística foi possível prever a concentração capaz de causar um efeito citotóxico em 50% das células (CC_{50}), a qual foi determinada em $28,68\ \mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial, $43,08\ \mu\text{g/mL}$ para o β -cariofileno, $34,60\ \mu\text{g/mL}$ para a nanoemulsão do óleo e $31,67\ \mu\text{g/mL}$ para a nanoemulsão do β -cariofileno.

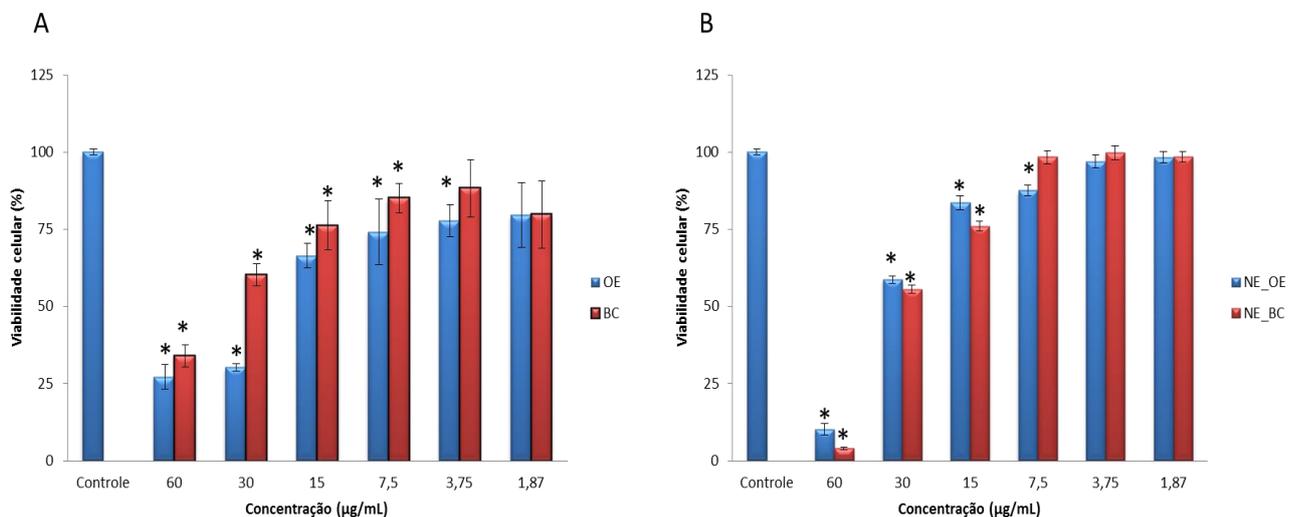


Figura 1. Efeito citotóxico em células HeLa submetidas ao tratamento em diferentes concentrações das amostras após 72h de incubação. OE: óleo essencial; BC: β -cariofileno; NE_OE: Nanoemulsão do óleo essencial; NE_BC: Nanoemulsão do β -cariofileno. * médias significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

A atividade citotóxica dos óleos essenciais tem sido reportada na literatura e devido a sua variada composição, eles tendem a apresentar um efeito anticancerígeno multifacetado (Patel and Gogna, 2015). Em virtude da sua natureza lipofílica, esses óleos são capazes de passar pela membrana citoplasmática rompendo camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos, permeabilizando essas estruturas (Bakkali et al., 2008). Dentro da célula, os óleos essenciais podem atuar na despolarização da membrana mitocondrial afetando canais iônicos e reduzindo o pH, prejudicando a bomba de prótons e o pool de ATP (Bakkali et al., 2008). De forma geral, a citotoxicidade dos óleos essenciais parece estar atribuída a danos na membrana, tornando-as facilmente permeáveis (Bakkali et al., 2008).

As nanoemulsões elaboradas também se apresentaram como excelentes veículos de dispersão desses compostos, havendo diminuição de 11,41 µg/mL na concentração do CC₅₀ para a nanoemulsão do β-cariofileno quando comparado com sua forma livre. Já para a nanoemulsão do óleo houve um pequeno acréscimo de 5,92 µg/mL na concentração do CC₅₀. As nanoemulsões têm sido amplamente investigadas quanto ao seu uso na entrega controlada de fármacos, e graças ao seu tamanho submicron elas são facilmente direcionadas para a área do tumor (Lovelyn and Attama, 2011). Como carreadores de compostos lipofílicos por via venosa, por exemplo, esses sistemas apresentam vantagens como redução da irritação e da toxicidade no tecido não alvo, melhora na solubilidade e estabilidade do fármaco, e entrega direcionada do medicamento (Hippalgaonkar et al., 2010). O direcionamento do nanocarreador para o tecido tumoral pode se dar por via passiva, uma vez que essa região apresenta aumento de angiogênese, tornando-a mais permeável (Koo et al., 2005). Estima-se que tecidos tumorais apresentam poros de diâmetros entre 380 a 780 nm enquanto que tecidos saudáveis de aproximadamente 2 nm, dessa forma, é possível que esses nanosistemas penetrem o tumor e realizem a entrega da droga no tecido alvo (Drummond et al., 1999; Hobbs et al., 1998).

A fim de avaliar o possível mecanismo de morte celular induzida pelo óleo essencial de *T. catuaba*, seu majoritário e suas respectivas nanoemulsões, as análises de citometria de fluxo foram conduzidas como demonstrado na figura 2.

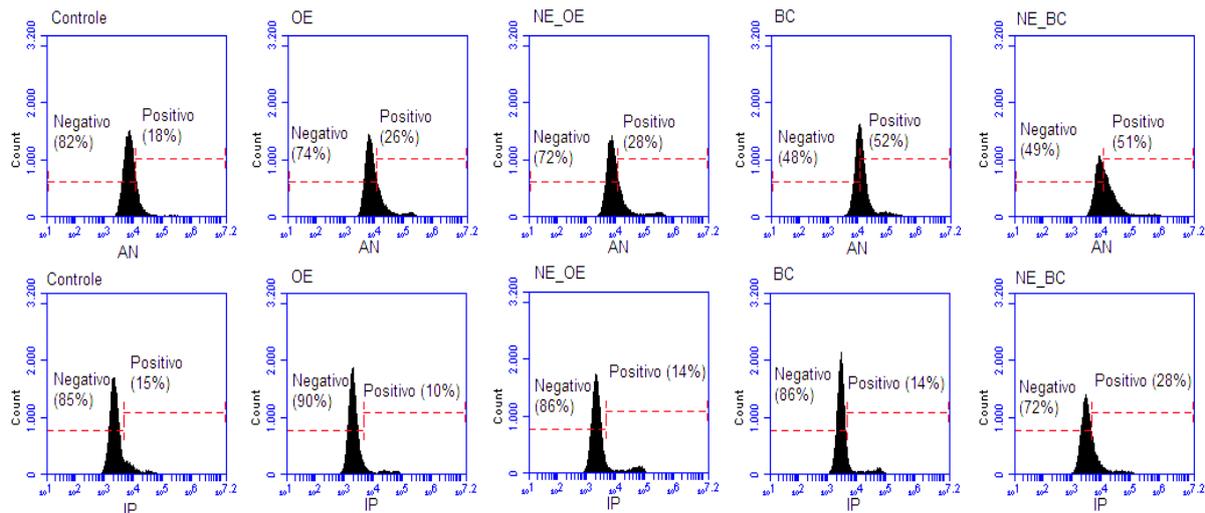


Figura 2. Análise de citometria de fluxo para determinação d mecanismo de morte célula em células de HeLa submetidas a diferentes tratamentos por 72h. OE: óleo essencial; NE_OE: Nanoemulsão do óleo essencial; BC: β -cariofileno; NE_BC: Nanoemulsão do β -cariofileno, AN: Anexina V-FITC; IP: Iodeto de propídeo.

Os histogramas representados na figura 2, expressam as porcentagens de populações celulares de HeLa marcadas com marcadores envolvidos na morte celular por apoptose (Anexina V-FITC) e por necrose (IP), tratadas com concentrações de CC_{50} após 72h de incubação. Os resultados obtidos sugerem que os tratamentos induziram a morte celular por apoptose, uma vez que a porcentagem de células marcadas com anexina foi superior em todos os tratamentos. No entanto, para a nanoemulsão do β -cariofileno é possível observar também um aumento na população de células necróticas, característico de estímulos citotóxicos mais intensos. Assim como foi evidenciado no nosso estudo, o perfil pro-apoptótico em células de linhagem tumoral foi determinado para óleos essenciais de outras espécies, tais como o óleo essencial de *Pamburus missionis* e o β -cariofileno obtido do óleo essencial de *Aquilaria crassna* (Dahham et al., 2015; Pavithra et al., 2017). Diferente da morte celular por necrose, a apoptose se caracteriza por um processo que ocorre na célula individual, onde um programa genético é iniciado culminando na fragmentação do DNA e formação de fragmentos de membrana chamados de corpos apoptóticos, nesse processo, a integridade da membrana plasmática é mantida, impedido o extravasamento do material celular (Kannan and Jain, 2000). Por outro lado, na necrose, ocorre a lise celular, uma vez que a integridade da membrana é seriamente comprometida, podendo haver uma resposta inflamatória do tecido adjacente pela liberação de componentes citoplasmáticos para o espaço extracelular (Kannan

and Jain, 2000).

A avaliação da morfologia celular mostrada na figura 3 revela as alterações celulares sofridas após os tratamentos nas concentrações de CC_{50} . Observa-se na imagem do controle não-tratado (figura 3A) a morfologia poligonal regular da HeLa com algumas projeções normais de sua superfície celular. Após o tratamento com o óleo essencial, o β -cariofileno e as nanoformulações, muitas células HeLa foram encontradas flutuando, característico de morte celular, assim como foi observado por Devrnja et al., (2017) após o tratamento dessas mesmas células com extratos metanólicos de folhas e flores de *Tanacetum vulgare*. É possível observar nas imagens das figuras 3B a 3E a diminuição da densidade celular quando comparado com o controle (figura 3A) e o encolhimento celular de células isoladas, característica típica de apoptose, com citoplasma mais denso e células ovaladas (como mostrado pelas setas na figura 3). Nesse processo, ocorre a picnose, resultado da condensação da cromatina, seguido da fragmentação do núcleo, formando os corpos apoptóticos (Elmore, 2007). Esses corpos ainda possuem membrana plasmática intacta e serão posteriormente fagocitados por macrófagos (Elmore, 2007). Tais resultados corroboram com os achados anteriores pela marcação com Anexina V-FITC sugestivos da ação citotóxica dos compostos estudados pela indução ao processo apoptótico.

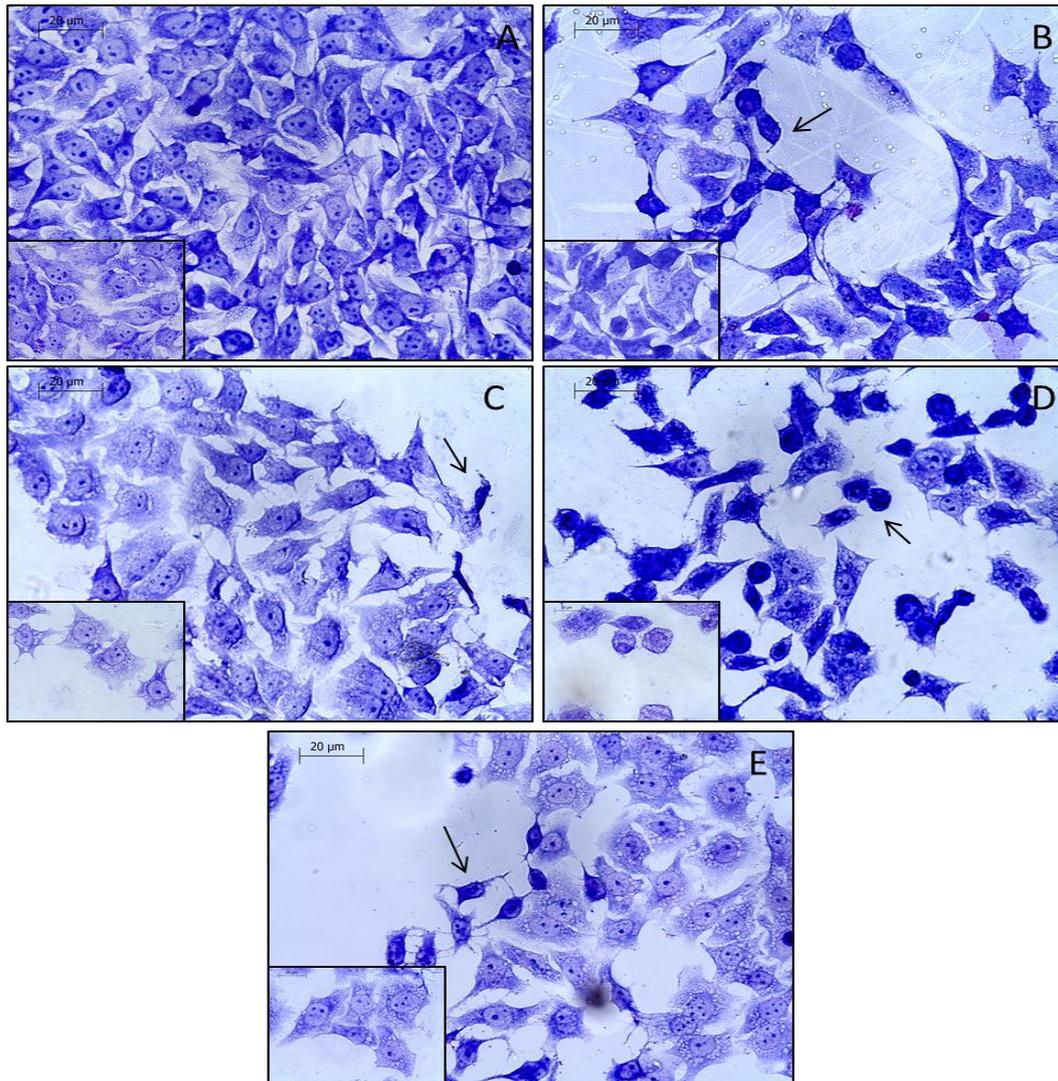


Figura 3. Morfologia celular de HeLa submetidas a diferentes tratamentos após 72h de incubação. A- Controle não tratado; B- Óleo essencial de *T. catuaba*; C- Nanoemulsão do óleo essencial; D- β -cariofileno; E- Nanoemulsão do β -cariofileno. Seta: Corpos apoptóticos.

4. Conclusões

O óleo essencial de *T. catuaba* e seu composto majoritário, o β -cariofileno, apresentaram efeito antiproliferativo contra a linhagem de células tumorais HeLa, contribuindo com informações importantes na busca por novos compostos para o tratamento do câncer em estudos futuros. As nanoemulsões formuladas se apresentaram como excelentes meios de dispersão desses compostos, e graças ao seu reduzido tamanho de partícula podem ser potencialmente exploradas como sistemas de “drug delivery”. Através das análises de citometria de fluxo e características morfológicas celulares observadas por microscopia foi possível inferir que a apoptose é o principal mecanismo de morte envolvido na ação citotóxica

desses compostos. Esse mecanismo apresenta vantagens em relação à necrose por não gerar inflamação do tecido adjacente, uma vez que não há extravasamento do conteúdo celular citoplasmático.

5. Referências bibliográficas

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Bardaweel, S.K., Tawaha, K.A., Hudaib, M.M., 2014. Antioxidant , antimicrobial and antiproliferative activities of *Anthemis palestina* essential oil 1–8.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., 2017. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. URL www.hpvcentre.net (accessed 1.11.18).
- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B.K., Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A., 2015. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20, 11808–11829.
- Daly, D.C., 1990. The Genus *Tetragastris* and the Forests of Eastern Brazil: Studies in Neotropical Burseraceae III. *Kew Bull.* 45, 179–194.
- Devrnja, N., Anđelković, B., Arandelović, S., Radulović, S., Soković, M., Krstić-Milošević, D., Ristić, M., Čalić, D., 2017. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. *South African J. Bot.* 111, 212–221.
- Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D.B., Papahadjopoulos, D., 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* 51, 691–743. <https://doi.org/VL> - 51
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.

- Ganta, S., Sharma, P., Paxton, J.W., Baguley, B.C., Garg, S., 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in long-circulating nanoemulsion. *J. Drug Target.* 18, 125–133.
- Ganta, S., Talekar, M., Singh, A., Coleman, T.P., Amiji, M.M., 2014. Nanoemulsions in Translational Research—Opportunities and Challenges in Targeted Cancer Therapy. *AAPS PharmSciTech* 15, 694–708.
- Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V., 2010. Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS PharmSciTech* 11, 1526–1540.
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4607–4612.
- Kannan, K., Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153–163.
- Koo, O.M., Rubinstein, I., Onyuksel, H., 2005. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 1, 193–212.
- Lovelyn, C., Attama, A.A., 2011. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2, 626–639.
- Mahantshetty, U., Teni, T., Naga, P., Hotwani, C., Umesh, S., Kannan, S., Hande, V., Pawar, S., Engineer, R., Chopra, S., Deodhar, K., Maheshwari, A., Gurram, L., Gupta, S., Shrivastava, S.K., 2017. Impact of HPV 16/18 infection on clinical outcomes in locally advanced cervical cancers treated with radical radio (chemo) therapy - A prospective observational study. *Gynecol. Oncol.*
- McClements, D.J., 2010. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 241–269.
- Newton, C.L., Mould, T.A., 2016. Invasive cervical cancer. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 27, 7–13.
- Patel, S., Gogna, P., 2015. Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. *Ind. Crops Prod.* 76, 1148–1163.

- Pavithra, P.S., Mehta, A., Verma, R.S., 2017. Induction of apoptosis by essential oil from *P. missionis* in skin epidermoid cancer cells. *Phytomedicine*.
- Sajja, H.K., East, M.P., Mao, H., Wang, Y.A., Nie, S., Yang, L., 2009. Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug delivery and noninvasive imaging of therapeutic effect. *Curr. Drug Discov. Technol.* 6, 43–51.
- Sakalar, C., Yuruk, M., Kaya, T., Aytakin, M., Kuk, S., Canatan, H., 2013. Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Mol. Cell. Biochem.* 383, 243–251.
- Santana, J.S., Sartorelli, P., Guadagnin, R.C., Matsuo, A.L., Carlos, R., Soares, M.G., Silva, A.M., Lago, J.H.G., 2012. Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves – chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation 50, 1248–1253.
- Saranath, D., Khan, Z., Tandle, A.T., Dedhia, P., Sharma, B., Contractor, R., Shrivastava, S., Dinshaw, K., 2002. HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecol. Oncol.* 86, 157–162.
- Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Ali, M., 2007. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 227–243.
- Sun, X., Zheng, Y., Lin, D., Zhang, H., Zhao, F., Yuan, C., 2009. Potential Anti-Cancer Activities of Furanodiene, A Sesquiterpene from *Curcuma wenyujin* 37, 589–596.
- Vuuren, S.F. Van, Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., 2010. Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African J. Bot.* 76, 686–691.
- Wuertz, B.R., Darrah, L., Wudel, J., Ondrey, F.G., 2017. Thiazolidinediones abrogate cervical cancer growth. *Exp. Cell Res.* 353, 63–71.
- Xie, J., Yang, Z., Zhou, C., Zhu, J., Lee, R.J., Teng, L., 2016. Nanotechnology for the delivery of phytochemicals in cancer therapy. *Biotechnol. Adv.* 34, 343–353.

4 CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *T. catuaba* apresenta 54 compostos sendo o β -cariofileno o composto presente em maior proporção;
- As nanoemulsões formuladas se apresentaram estáveis e uma alternativa eficaz para veiculação do óleo essencial e do seu composto majoritário, o β -cariofileno;
- O óleo essencial, o β -cariofileno, e suas respectivas nanoemulsões foram capazes de atuar no controle de crescimento e biofilme de *E. faecalis*;
- Apenas o óleo essencial atuou no controle de *L. monocytogenes*, não havendo atividade evidenciada para o β -cariofileno, podendo indicar que a atividade antimicrobiana do óleo essencial está ligada a ação sinérgica dos seus constituintes ou de compostos em menor proporção;
- O óleo essencial, o β -cariofileno, e suas respectivas nanoemulsões induziram a morte celular de linhagem de câncer cervical e seu principal mecanismo de morte é via apoptose.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. et al. Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4127–4129, 2002.
- ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, p. 403–412, 2005.
- AGUILAR, C. et al. Cell – Cell Communication in Biofilms of Gram-Negative Bacteria. **Bacterial Signalling**, p. 23–40, 2010.
- AL-SABAGH, A. M. The relevance HLB of surfactants on the stability of asphalt emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 204, n. 1–3, p. 73–83, 2002.
- ALMEIDA, R. N. DE; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos Essenciais Com Propriedades Anticonvulsivantes. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 2, n. 1, p. 3–6, 2003.
- ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220–243, 2015.
- AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; TORO-SÁNCHEZ, L. Enhancing Safety and Aroma Appealing of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using the Antimicrobial and Aromatic Power of Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. 84–91, 2009.
- BALANDRIN, M. et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p. 1154–1160, 1985.
- BANG, J. et al. Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 129–134, 2014.
- BASU, P. et al. Secondary prevention of cervical cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 2017.
- BERRANG, M. E. et al. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p. 980–985, 2005.
- BINIECKA, M.; CAROLI, S. Analytical methods for the quantification of volatile aromatic compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1756–1770, 2011.
- BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of melaleuca alternifolia (Maiden amp; Betche) cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 641–644, 1995.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 244–265, 2002.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites : A historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. October, p. 839–851, 2001.
- BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1–14, 2010.
- CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals : Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, p. 425–442, 2017.
- CHARLEBOIS, A. et al. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. **Food Microbiology**, v. 62, p. 32–38, 2017.
- CHMIELEWSKI, R. A N.; FRANK, J. F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 22–32, 2003.
- CIRIMINNA, R. et al. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. **Chem. Commun.**, v. 50, n. 97, p. 15288–15296, 2014.
- CLAESSEN, D. et al. Bacterial solutions to multicellularity: A tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 115–124, 2014.
- COSTERTON, J. W. et al. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 12, p. 2803–2809, 1994.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.
- CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Ceará: Edições UFC, 1981.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais de química fina. **Química Nova.**, v. 16, p. 224–228, 1993.
- CRUZ, M. et al. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 4, p. 669–682, 2009.
- DA SILVA, E. R. et al. Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: Is there a difference between black and white Breu? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, p. 647–656, 2016.
- DA SILVA, R. C. S. et al. (E)-Caryophyllene and α -humulene: *Aedes aegypti* oviposition deterrents elucidated by gas chromatography-electrophysiological assay of commiphora leptophloeos leaf oil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.
- DALY, D. C. The Genus *Tetragastris* and the Forests of Eastern Brazil: Studies in

Neotropical Burseraceae III. **Kew Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 179–194, 1990.

DATTA, A. R.; BURALL, L. S. Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. **Food Microbiology**, 2017.

DE LA CRUZ-CAÑIZARES, J. et al. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p. 177–194, 2005.

DI BONAVENTURA, G. et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1552–1561, 2008.

DJIHANE, B. et al. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 5, p. 780–787, 2017.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016.

DRAGOŠ, A.; KOVÁCS, Á. T. The Peculiar Functions of the Bacterial Extracellular Matrix. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 257–266, 2017.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 500–514, 2014.

EPELBOIN, L.; BOSSI, P. Listeriosis. **EMC - Tratado de Medicina**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2011.

FAILLE, C. et al. Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with respect to environmental concerns. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218–227, 2003.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749–1757, 2009.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945–7947, 2007.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci in foods - A conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 105–122, 2003.

GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Influence of Environmental Factors on Bacterial Biofilm Formation in the Food Industry: A Review. **Postdoc Journal**, v. 3, n. 6, 2015.

GARNATJE, T.; PEÑUELAS, J.; VALLÈS, J. Ethnobotany, Phylogeny, and “Omics” for Human Health and Food Security. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 187–191, 2017.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163–171, 2002.

GKANA, E. N. et al. Biofilm formation by Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. **Food Control**, v. 73, p. 838–846, 2017.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311–326, 1949.

GUENTHER, E. **The essential oils Vol I: Origin in Plants – Production – Analysis**. New York: D. Van Nostrad Company, 1948.

HAN, N. et al. Biofilm formation by Vibrio parahaemolyticus on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. **Food Control**, v. 70, p. 161–166, 2016.

HU, Y.-T. et al. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 16–26, 2017.

IRIE, Y. et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20632–20636, 2012.

JAFARI, S. M. et al. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1191–1202, 2008.

JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by Salmonella spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367–372, 2001.

KAFIL, H. S. et al. Gentamicin induces efaA expression and biofilm formation in Enterococcus faecalis. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 30–35, 2016.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by Listeria monocytogenes in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 47–57, 2017.

KOROLEVA, M. Y. et al. Nano- and microcapsules as drug-delivery systems. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, n. 4, p. 233–239, 2016.

KUMAR, A. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481–489, 2017.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. . Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 9–27, 1998.

LEPAGE, E. et al. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: Identification of genes absent from food strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 19, p. 6858–6868, 2006.

LI, J. et al. Formation of multiple water-in-ionic liquid-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 368, n. 1, p. 395–399, 2012.

LI, R.; KUDA, T.; YANO, T. Effect of food residues on efficiency of surfactant disinfectants against food related pathogens adhered on polystyrene and ceramic surfaces. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 200–206, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. [s.l.] Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MAJOR, I.; MCCONVILLE, C. Vaginal drug delivery for the localised treatment of cervical cancer. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 6, p. 817–828, 2017.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 241–269, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions : fabrication , properties , and functional performance. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 2297–2316, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions - principles, practices, and techniques**. THIRD EDIT ed. [s.l.] CRC Press, 2015.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. 109–124, 2007.
MCLAUCHLIN, J.; I, R. F. Epidemiology of Listeriosis in Humans. **Journal Applied Bacteriology**, v. 63, p. 1–11, 1987.

MEDINA-ALARCÓN, K. P. et al. Highlights in nanocarriers for the treatment against cervical cancer. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 748–759, 2017.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 249–253, 2003.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 576–582, 1999.

OLIVEIRA, M. M. M. DE; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão. **Revista do instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

OMONJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, 2017.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. SUPPL. 2, 2007.

PAN, Y.; BREIDT, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7711–7717, 2006.

PATEL, S.; GOGNA, P. Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1148–1163, 2015.

PEREIRA, C. B. et al. Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 214–221, 2017.

PHILLIPS, C. A. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 1731–1743, 2016.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 439–445, 2000.

PICOLI, T. et al. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 57–62, 2017.

PRAKASH, O. et al. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 104–115, 2013.

RABIN, N. et al. Medicinal Chemistry. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.

RENIER, S.; HÉBRAUD, M.; DESVAUX, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 835–850, 2011.

ROBBINS, M. **Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology**. terceira ed. [s.l.] Annual Plant Reviews, 2000.

ROSAS, M. S. L. et al. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243–265, 2013.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The chemistry and pharmacology of

the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 93–104, 2007.

RUMJANEK, N. G. et al. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, v. 33, p. 35–50, 2004.

SAKALAR, C. et al. Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 383, n. 1–2, p. 243–251, 2013.

SANDHOLM, T. M.; WIRTANEN, G. Biofilm formation in the industry : A review. **Food Reviews International**, v. 8, n. 4, p. 573–603, 1992.

SCHIMIDT, B. M.; CHENG, D. M. K. **Ethnobotany: A Phytochemical Perspective**. First Edit ed. [s.l.] John Wily & Sons Ltd, 2017.

SCHODER, D. *Listeria*: Listeriosis. In: **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 561–566.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 407–413, 2009.

SILVA, E. R.; OLIVEIRA, D. R.; MELO, M. F. F. Report on the Malungo expedition t the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p.647-656, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 467–495.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573–583, 2010.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439–447, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Segunda Ed ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. DO. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação : Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 2006.

SUH, J. D.; RAMAKRISHNAN, V.; PALMER, J. N. Biofilms. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 521–530, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Terceira e ed. Porto Alegre: Artmed., 2004.

TURTURA, G. C.; LORENZELLI, P. Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. **Microbiological Research**, v. 149, n. 2, p. 203–213, 1994.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

WEEKS, A.; DALY, D. C.; SIMPSON, B. B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 1, p. 85–101, 2005.

WHITEHEAD, K. A.; VERRAN, J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 84–91, 2015.

WHO. **Food safety**. Disponível em: <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 13 out. 2017a.

WHO. **Cancer Cervical**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>>. Acesso em: 6 nov. 2017b.

WILDE, P. J. Interfaces: Their role in foam and emulsion behaviour. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, p. 176–181, 2000.

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

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF HOSPITAL INFECTIONS

ARTICLE IN PRESS

Journal of Hospital Infection xxx (2017) 1–7



Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Hospital Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhin



Review

Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants

W.F. Oliveira^a, P.M.S. Silva^a, R.C.S. Silva^b, G.M.M. Silva^b, G. Machado^b,
L.C.B.B. Coelho^a, M.T.S. Correia^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^bLaboratório de Nanotecnologia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2017

Accepted 15 November 2017

Available online xxx

Keywords:

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Biofilm

Implants

SUMMARY

Infections are one of the main reasons for removal of implants from patients, and usually need difficult and expensive treatments. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are the most frequently detected pathogens. We reviewed the epidemiology and pathogenesis of implant-related infections. Relevant studies were identified by electronic searching of the following databases: PubMed, ScienceDirect, Academic Google, and CAPES Journal Portal. This review reports epidemiological studies of implant infections caused by *S. aureus* and *S. epidermidis*. We discuss some methodologies used in the search for new compounds with antibiofilm activity and the main strategies for biomaterial surface modifications to avoid bacterial plaque formation and consequent infection. *S. aureus* and *S. epidermidis* are frequently involved in infections in catheters and orthopaedic/breast implants. Different methodologies have been used to test the potential antibiofilm properties of compounds; for example, crystal violet dye is widely used for in-vitro biofilm quantification due to its low cost and good reproducibility. Changes in the surface biomaterials are necessary to prevent biofilm formation. Some studies have investigated the immobilization of antibiotics on the surfaces of materials used in implants. Other approaches have been used as a way to avoid the spread of bacterial resistance to antimicrobials, such as the functionalization of these surfaces with silver and natural compounds, as well as the electrical treatment of these substrates.

© 2017 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Biomaterials are natural or synthetic materials, including polymers and metals, used to replace any living tissue that has undergone some accidental damage or destruction due to some pathology or even plastic surgery repair [1]. Researches and

technological advances in the development of biomaterials have shown rapid growth in order to maintain a demand at the population level; the biomaterials can replace or restore the shape and function of a compromised tissue, improving people's quality of life and longevity [2].

Cytocompatibility and preservation of the differentiated phenotype of the cells surrounding the implants are fundamental properties of the biomaterials designed to be integrated to tissues, such as orthopedic implants, whose main objective is the osseointegration [3]. Despite the benefits that implants can offer, they are susceptible to several problems such as lack of integration, inflammatory process, total

* Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-910, Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 21268540.

E-mail address: mtscorreia@gmail.com (M.T.S. Correia).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>

0195-6701/© 2017 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Oliveira WF, et al., *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants, Journal of Hospital Infection (2017), <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>

rejection by the receiving individual, and bacterial infection, which is the main cause of implant loss [4]. Bacteria may adhere to form biofilms in foreign bodies placed in patients, such as central and peripheral venous catheters, and in breast/orthopaedic implants, thus establishing infection [5]. In addition, bacteria embedded in biofilms may exhibit greater resistance to environmental conditions as result of the high degree of horizontal gene transfer among them, including antibiotic resistance genes, favouring the infection [6].

Implant infections are most usually caused by staphylococci (about four cases in five). Two species, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, account for around two-thirds of infections [7]. A strategy to eradicate implant infections is prolonged treatment with high doses of antibiotics, often using antimicrobials that act through different mechanisms [8]. However, in clinical practice, infected implants usually require their surgical removal in addition to long-term antibiotic therapy. These problems have stimulated advances in implant surface engineering research, in order to produce implants more resistant to bacterial colonization [9]. One of the most widely adopted strategies is the coating of surfaces with antibiotics; however, this is potentially a hazardous approach due to the risk of selection of drug-resistant micro-organisms, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) [10].

This review aims to clarify mechanisms of *S. aureus* and *S. epidermidis* pathogenicity in implant infections, and to highlight some alternative approaches to preventing infections related to modifications on implant surfaces that could be used in the manufacture of biomaterials.

Methods

Studies were searched in electronic databases according to article titles, abstract contents, and relevance in the field of staphylococcal implant infections. The databases used in this research were PubMed, ScienceDirect, Academic Google and CAPES Journal Portal. The main terms applied were *S. aureus*, *S. epidermidis*, catheter, orthopaedic implant, breast implant, infection, biofilm, antibiofilm activity and antibacterial implant surfaces. Articles were sought that provided new knowledge about the epidemiology of implant infections, the pathogenicity of *S. aureus* and *S. epidermidis* in these infections, and approaches to the prevention of implant-related infections. Each publication identified in the electronic searches was evaluated against these criteria by four authors (W.F.O., P.M.S.S., R.C.S.S. and G.M.M.S.); the selected articles were finally verified and approved by the other authors (G.M., L.C.B.B.C., and M.T.S.C.).

Microbial epidemiology of infections in intravascular catheter and orthopaedic/breast implants

The incidence of local or bloodstream infections associated with intravascular catheters is generally low. However, infections are important, because they are inconvenient to treat, and because serious infectious complications may occur, including sepsis and septic shock, infective endocarditis, and other metastatic infections [11].

Santarpia *et al.* studied 172 patients who had a total of 238 central venous catheters (CVC) used for home parenteral nutrition. Ninety-four of the catheters were associated with

catheter-related bloodstream infection (CRBSI). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) were the most frequent causative agents (52.8%); Gram-negative bacteria accounted for 18.6% of infections; 7.1% were caused by fungi, and 15% were by polymicrobial infections [12]. In another study of 85 patients receiving parenteral nutrition, 19% developed CRBSI. Again, *Staphylococcus* spp. (44%) were the most frequent species, followed by *Candida* spp. (25%) [13]. In a recent study by Wu *et al.*, 8% of patients with CVC following gastrointestinal surgery developed CRBSI, and once again CoNS were the most frequent cause of infection [14].

The main micro-organisms that cause infections in orthopaedic implants are Gram-positive bacteria such as *S. aureus*, *S. epidermidis*, and less frequently, *Propionibacterium acnes*; streptococci and enterococci tend to occur in later infections, and Gram-negative bacteria are seen far less frequently [15]. Montanaro *et al.* studied the microbial aetiologies of infections in 242 orthopaedic patients with infections, to investigate their aetiology. Overall, staphylococci accounted for ~75% of all isolates. *S. epidermidis* was the main pathogen in patients with knee and hip arthro-prostheses, whereas *S. aureus* was the main pathogen in patients with infections associated with internal and external fixation systems and in patients without implants [16]. A study of 163 patients aged 19–94 years with infected implants in the main joints or long bones of the lower limbs showed a predominance of *S. epidermidis* (51.5%), with 43.6% caused by *S. aureus* (43.6%), and both pathogens isolated from 4.9%. Older patients had a higher mortality rate and higher frequency of infection with methicillin- or multidrug-resistant bacteria [17]. In another study of 115 patients with *S. aureus* orthopaedic implant infections, those who had implants for bone fixation had a lower rate of MRSA infection than those who had arthroplasties. Other risk factors for MRSA were having an open fracture, nursing home residence, renal failure and hospitalization in an intensive care unit. This research raised the possibility of adapting antimicrobial prophylaxis for these higher-risk groups of patients [18].

The majority of isolates from breast-implant infection cases are *Staphylococcus* spp., particularly *S. aureus* and *S. epidermidis* [19,20]. A study with 37 cases of breast implant infection (81% silicone implants and 19% saline implants) showed that the most frequent aetiological agent was *S. aureus* (18 cases) [21]. However, Darragh *et al.* performed two retrospective audits: one with 86 patients undergoing 106 implant-based reconstructions, and another with 89 patients who underwent 105 implant-based reconstructions. In the first audit, bacteria were isolated in three cases, all of which were Gram negative (*Escherichia coli*, two cases; *Pseudomonas aeruginosa*, one case). In the second audit there were five infections, three caused by Gram-negative bacteria and one each caused by *S. aureus* and *S. epidermidis* [22].

Adhesion and biofilm formation: pathogenicity in medical devices

Multidrug-resistant nosocomial pathogens are the most common micro-organisms in medical device infections. They colonize the external and internal region of the catheters and proliferate at a rate of 0.5 cm of surface area per hour, being able to form a thick biofilm in 24 h on the surface of these

plastic devices, from an inoculum with a small number of bacteria [23].

CoNS are important endogenous pathogens of intravascular catheters. Infections tend to be subacute or chronic, whereas infections with *S. aureus* are more likely to be acute due to its ability to stimulate an acute immune response in the host [24]. Figure 1 shows the routes of infection via CVCs, and the mechanism of biofilm formation. The most usual route of infection in short-duration catheters is by migration of micro-organisms from the skin at the insertion site to reach the catheter tip [25]. Catheter hub contamination by contact with contaminated hands, fluids or devices may also lead to an intraluminal colonization of the device [25,26]. More rarely the catheter may be contaminated via the haematogenous route; occasionally, contaminated infusate may introduce micro-organisms into the catheter lumen [26].

Biofilm growth occurs through a series of physical, chemical, and biological processes [27]. The ability of *S. aureus* to adhere to eukaryotic cells and abiotic surfaces through the proteins of its cell wall with subsequent biofilm formation are characterized as important virulence factors in infections associated with implanted biomaterials. The cell-to-cell attachment in the biofilm is known as cohesion [27,28]. Biofilm formation is divided into three steps (Figure 1): initial adhesion to a surface, microcolony formation and biofilm maturation with detachment of bacterial cells. The initial micro-organism adhesion to

surfaces in which the planktonic cells become sessile (Figure 1a) strongly depends on the conditioning layer formed by the adsorption of (macro)molecules on the substrate. The composition of this biofilm favours bacterial adhesion and varies according to the environment to which those surfaces are exposed [29,30]. *S. aureus* and *S. epidermidis* express several microbial surface components that recognize and bind to extracellular matrix molecules, such as fibrinogen and fibronectin proteins, acting in the first stage of biofilm formation in the human body. The matrix proteins are also adsorbed on the surface of medical devices after implantation and may be targets for specific binding to the surface components of staphylococci [31,32]. The initial bacterial adhesion to surfaces is mediated by reversible interactions whose associated physical forces are van der Waals forces and steric–electrostatic interactions [24,27]. Subsequently the bacterial cells adhere irreversibly to the substrates through hydrogen bonds, ionic bonding, and dipole–hydrophobic interactions. Bacterial cell surface structures such as lipopolysaccharides (LPS) and exopolysaccharides also participate in these irreversible interactions [24]. For example, the production of slime exopolysaccharide by *S. epidermidis* is indispensable for its direct adhesion on implants [33].

The secretion of an extracellular polymeric substance (EPS) consisting of extracellular DNA, proteins, lipids and mainly polysaccharides (homo- and heteropolysaccharides) facilitates

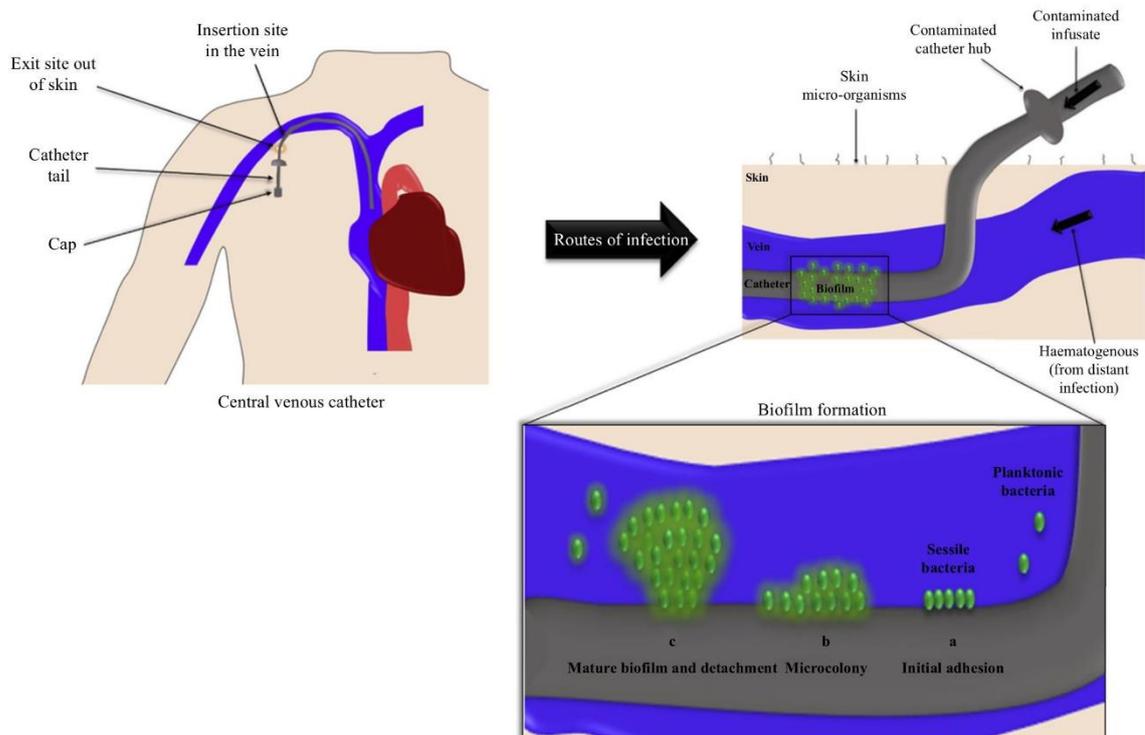


Figure 1. Schematic illustration of central venous catheter infection, showing the main access routes of micro-organisms to cause infection and biofilm formation.

the adhesion between cells and surfaces [24,30]. Bacteria adsorbed on surfaces grow in microcolonies (Figure 1b) and secrete EPS, becoming encapsulated in a hydrogel layer that forms a physical barrier between the microbial community and the extracellular environment [30]. In biofilm development, microcolonies increase progressively and when several layers of cells accumulate on the surface the third stage of formation is reached, indicated by the presence of a mature biofilm (Figure 1c) which is characterized by the presence of macrocolonies surrounded by channels that help to distribute nutrients and signalling molecules. Finally, in order to survive when there is a limitation of nutrients or to spread and colonize other niches, some cells detach from the biofilm individually or in agglomerates [24]. EPS from staphylococci biofilms are composed of extracellular DNA, proteins, amyloid fibrils and polysaccharides such as the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) known as poly- β (1–6)-*N*-acetylglucosamine (PNAG), which is the main component responsible by intercellular adhesion in staphylococci. PIA is the primary polysaccharide involved in the formation of *S. aureus* and *S. epidermidis* biofilms, contributing significantly to infections in medical devices and to the evasion of host immune responses [31,34,35]. PIA is synthesized by enzymes encoded by the *icaADBC* locus consisting of four genes, the first and the second being *icaA* and *icaD*, respectively, which together synthesize a transmembrane enzyme with *N*-acetylglucosaminyl transferase activity, since this enzyme is only catalytically active with the junction of the products of these two genes. The *icaC* product appears to translocate PIA to the bacterial surface and the *icaB* product promotes deacetylation of the molecule. Another gene, *icaR*, known as the intercellular adhesin locus regulator, encodes a product that regulates negatively the *icaADBC* locus [35]. The deacetylation of the *N*-acetylglucosamine residues in PIA is of great biological importance, since its free amine group confers positive charge to the molecule. This is then electrostatically attracted to the negative charge on the bacterial cell surface, mainly due to the presence of teichoic acids, contributing to the staphylococci adhesion in biofilms on certain surfaces [31]. The auto-inducing molecule called AI-2, which is a product of the *LuxS* gene and belongs to the *LuxS* quorum sensing system, regulates negatively the expression of the *ica* gene at the transcriptional level in *S. epidermidis* [36]. In *S. aureus* the *Spx* protein (global regulator of stress response genes) induces *icaR* gene expression, which promotes down-regulation of *icaADBC* expression, whereas the protein Rbf (protein regulator of biofilm formation) inhibits the expression of *icaR*, leading to an upregulation of *icaADBC* [37]. Bacteria in the biofilm may be 500–5000 times more antimicrobial resistant than planktonic bacteria. Though biofilm initiates the antigenic response in the host by stimulating the production of antibodies, these communities are not yet affected by the host immunogenic response [38,39]. Several mechanisms contribute to biofilm resistance to antimicrobials, such as low penetration of the antimicrobial agent due to biofilm matrix barrier function, presence of persistent dormant cells, and small, highly resistant variant colonies. Reduction of antibiotic susceptibility also occurs: stress-adaptative responses of the bacterial cells in the biofilm may lead to delayed drug penetration or slow cell growth, to changes in the chemical micro-environment within the biofilm, and to upregulation of several biofilm-specific resistance genes [40–42].

Assays applied in the investigation of biofilm formation

Several methods are used to evaluate biofilm formation by bacteria and therefore may be applied to evaluate new compounds with antibiofilm action which may have potential value in implant functionalizations. Among these methods we highlight the tissue culture plate (TCP), tube method (TM), Congo Red agar method (CRA), bioluminescence assay, and fluorescent microscopic examination [43]. Christensen *et al.* were pioneers in investigating the formation of *S. epidermidis* biofilms on smooth surfaces as plastic tubes (by the TM method) and 96-well tissue culture plates (by the TCP method) [44,45]. The TCP method using microtitre plates is one of the most used to evaluate the formation of bacterial biofilms [46]. Knobloch *et al.* carried out a comparative study to evaluate the biofilm formation by *S. aureus* using the TCP, TM, and CRA methods. They verified that among 128 strains analysed, around 57% showed biofilm formation by the TCP method, and the addition of glucose and/or sucrose to the media (brain–heart infusion and tripticase soy broth) strongly influenced biofilm production among the strains. This study also showed that the CRA method is not indicated to evaluate the biofilm formation by *S. aureus*, and the TM method yielded a good correlation with the TCP test, but the classification by TCP test was difficult for biofilm-forming weak strains [47].

Biofilm formation may be quantified by different methods, including the use of dyes such as crystal violet. Dyes are often employed due to the low cost and good reproducibility. Crystal violet binds to negative charges, revealing the total biofilm biomass by the affinity to the bacteria and the EPS [48]. In addition to the total biomass quantification methods, there are assays that quantify the total number of bacterial cells, the number of viable cells, the amount of proteins and polysaccharides, presenting advantages and disadvantages that vary between cost and detection efficiency [48]. It is also possible to analyse the patterns of biofilm formation and to evaluate the activity of bioactive compounds through microscopy. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) enables observation of whether the adhered cells forming the biofilm are alive or dead, using dyes such as SYTO-9, which is a fluorescent green dye that binds to nucleic acids and stains live and dead cells. Propidium iodide, which is a fluorescent red dye that penetrates damaged cells, stains dead cells [49].

Trentin *et al.* tested the antibiofilm activity of different plant extracts against *S. epidermidis* at concentrations of 4 and 0.4 mg/mL and evaluated the minimum inhibitory concentration (MIC) that kills 100% of the bacteria [50]. It was observed that the extracts actively inhibited the biofilm formation and that for the *Commiphora leptophloeos* extract the highest concentration tested was also bactericidal, suggesting that the biofilm inhibition at this concentration was due to the death of bacteria [50]. It is important to analyse the effect of the active agent on planktonic bacteria concomitantly to determine whether the compound acts to impede bacterial adhesion and/or biofilm destruction, or whether it kills bacteria, thereby reducing biofilm production. The nematode *Caenorhabditis elegans* is often used as an experimental model for in-vivo assay. Bakkiyaraj and Pandian tested the in-vivo and in-vitro antibiofilm activity of a coral-associated actinobacteria (extract CAA-3) against *S. aureus* [51]. In their study, *C. elegans* was infected

with different strains of *S. aureus* and submitted to the treatment with CAA-3. Intestinal colonization of *C. elegans* was observed by CLSM and measured by Z-stack analysis. The conclusion was that intestinal colonization by *S. aureus* was reduced to ~70% when compared with the control.

The functionalization of nanostructured surfaces with bioactive compounds has attracted considerable interest for several applications. In a study by Qi *et al.*, multiple-wall carbon nanotube surfaces (MWNTs) were covered with a peptide with antimicrobial potential known as nisin, in order to observe *S. aureus* biofilm formation. A decrease of up to 95% in *S. aureus* biofilm formation was observed, compared with a reduction of only 37% for MWNTs alone. In this context, the surface modification used in implants, as functionalization with compounds that have antibiofilm activity, may be an effective alternative in the prevention of post-surgical infections [52].

Strategies for prevention of staphylococcal infections: catheter and implants

Some implant coatings have been used together with antibiotics in preoperative patients to prevent staphylococcal infections [53]. However, studies have also been carried out in order to add antibiotics or other biomolecules to the implants as a preventive action of possible postoperative infections [54]. The surface of implants may be functionalized with compounds having antibiofilm activity to promote a local effect of preventing bacterial adhesion and biofilm formation (Figure 2). This modification of surfaces in biomaterials has been an innovative strategy to be applied in the manufacture of implants.

A film composed of chitosan and gentamicin on titanium (Ti) nanotubes was studied by Feng *et al.* to evaluate the antibiotic effect against *S. aureus* [55]. Antibacterial effect was not observed with the Ti nanotubes without the coating on the bacterial colony. The results indicated that nanotubes coated with gentamicin and chitosan have high resistance to adherence of *S. aureus*, showing an antibacterial activity close to 100%. The coating of chitosan and gentamicin showed excellent antibacterial activity and may be applied to implants [55].

The use of synthetic and natural compounds as an alternative to antibiotics on biomaterial surfaces has also been investigated. Kuehl *et al.* examined the preventive effect on

biofilm production of an implant using a silver-coated titanium–aluminium–niobium metal alloy. The in-vivo tests showed that the compound formed by the Ag-coated alloy was effective in the prevention of postoperative infection by *S. epidermidis*, especially in conjunction with perioperative antibiotic prophylaxis. On the other hand, such silver-coated implants showed only limited effect in the prevention of *S. aureus* infections [9]. Ti alloys are suitable for various requirements of implants [2]. Silver has bactericidal and bacteriostatic properties, and then its controlled release can be obtained with the use of silver nanoparticles. These nanoparticles have been immobilized on medical implant surfaces such as Ti and diamond-like carbon, enabling the prevention of *S. aureus* and *S. epidermidis* biofilm formation, including at the transcriptional level [56,57].

The biomolecules polymethyl methacrylate and polystyrene are widely used in the composition of biomaterials. When these materials were coated with the essential oil from the plant *Ocimum tenuiflorum*, the prevention of bacterial adhesion and *S. aureus* biofilms formation on these substrates was observed [58]. The enzyme deoxyribonuclease I (DNase I), capable of degrading extracellular DNA, was immobilized on Ti surfaces and showed a preventive role for *S. aureus* adhesion and its consequent biofilm formation [59].

Venous catheters can be treated with electrical conduction in order to prevent *S. aureus* biofilm formation, but there are no in-vivo assays due to the lack of patients willing to perform the tests. The applied electrical parameters are safe, avoiding the emergence of arrhythmias. Catheters were submitted to an electric current in units ranging from 4 to 8 μ A and a reduction of 90% of viable bacteria was observed when the current was 4 μ A for a 24 h period. However, the application of a current of 8 μ A did not show a reduction proportional to the current increase [60]. The results appeared encouraging for developing solutions that avoid the contamination of catheters.

Conclusion

Staphylococcus aureus and *S. epidermidis* are frequently involved in infections in catheters and orthopaedic/breast implants. Planktonic bacteria become sessile cells capable of forming microcolonies after adhering to surfaces, secreting biomolecules that make up the EPS where they are embedded.

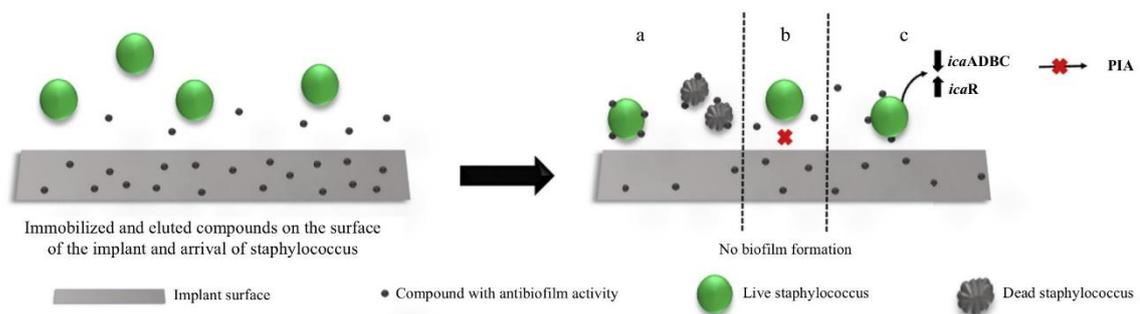


Figure 2. Compounds with antibiofilm activity can be immobilized on the surface of implants. The composites prevent the formation of biofilm, (a) stopping the growth or causing the death of the bacterium; (b) inhibiting the bacterial adhesion on the surface without exerting bacteriostatic/bactericidal effect; (c) and repressing the expression of the genes located in the *icaADBC* locus and stimulating the expression of *icaR* genes which consequently does not promote the production of polysaccharide intercellular adhesion (PIA).

S. aureus and *S. epidermidis* synthesize PIA by the expression of genes located in the *icaADR* locus, and the deacetylation of this adhesin promotes the adhesion of these bacteria to the biomaterial surfaces and the consequent infection. In the mature biofilm, bacteria can establish communication with one another, receive nutrients and water through channels, contributing to their survival on the biomaterial surfaces until they detached and become free-living cells capable of contaminating other locations. Bacteria in biofilm achieve greater resistance to antibiotics and to the immune system of the infected host. Due to the difficulty in treating implant infections, different methodologies have been used to test the potential antibiofilm of compounds; for example, crystal violet dye for in-vitro biofilm quantification offers low cost and good reproducibility. Changes in the surface biomaterials are necessary to prevent biofilm formation. Some studies have investigated the immobilization of antibiotics on the surfaces of materials used in implants. Other approaches have also been used as a way to avoid the spread of bacterial resistance to antimicrobials, such as the functionalization of these surfaces with silver and natural compounds, as well as the electrical treatment of these substrates.

Conflict of interest statement
None declared.

Funding sources

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants 402733/2013-4) fellowships (G.M., L.C.B.B.C. and M.T.S.C.) and grants; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE grants APQ-0852-2.08/12).

References

- [1] Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomater* 2013;33:1–12.
- [2] Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – a review. *Prog Mater Sci* 2009;54:397–425.
- [3] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 2013;34:8533–54.
- [4] Kumeria T, Mon H, Aw MS, Gulati K, Santos A, Griesser HJ, et al. Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties. *Colloids Surfaces B Bio-interfaces* 2015;130:255–63.
- [5] Song Z, Borgwardt L, Hoiby N, Wu H, Sørensen TS, Borgwardt A. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. *Orthop Rev* 2013;5:67–71.
- [6] Yoda I, Koseki H, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, et al. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol* 2014;14:234.
- [7] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006;27:2331–9.
- [8] Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* 2014;7:1–7.
- [9] Kuehl R, Brunetto PS, Woischnig AK, Varisco M, Rajacic Z, Vosbeck J, et al. Preventing implant-associated infections by silver coating. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2467–75.
- [10] Wang J, Li J, Guo G, Wang Q, Tang J, Zhao Y, et al. Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to *Staphylococcus*: new insight into the antimicrobial action of silver. *Sci Rep* 2016;6:32699.
- [11] Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2014;4:162–7.
- [12] Santarpia L, Buonomo A, Pagano MC, Alfonsi L, Foggia M, Mottola M, et al. Central venous catheter related bloodstream infections in adult patients on home parenteral nutrition: prevalence, predictive factors, therapeutic outcome. *Clin Nutr* 2016;35:1394–8.
- [13] Parra-Flores M, Souza-Gallardo LM, García-Correa GA, Centellas-Hinojosa S. Incidence of catheter-related infection incidence and risk factors in patients on total parenteral nutrition in a third level hospital. *Cir Cir* 2017;85:104–8.
- [14] Wu S, Ren S, Zhao H, Jin H, Xv L, Qian S, et al. Risk factors for central venous catheter-related bloodstream infections after gastrointestinal surgery. *Am J Infect Control* 2017;45:549–50.
- [15] Potapova I. Functional imaging in diagnostic of orthopedic implant-associated infections. *Diagnostics* 2013;3:356–71.
- [16] Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol* 2011;6:1329–49.
- [17] Morgenstern M, Erichsen C, von Rüden C, Metsemakers WJ, Kates S, Moriarty TF, et al. Staphylococcal orthopaedic device-related infections in older patients. *Injury* 2016;47:1427–34.
- [18] Deny A, Loiez C, Deken V, Putman S, Duhamel A, Girard J, et al. Epidemiology of patients with MSSA versus MRSA infections of orthopedic implants: retrospective study of 115 patients. *Orthop Traumatol Surg Res* 2016;102:919–23.
- [19] Thomas M, Silva JAD, Borole AJ, Chilgar RM. Periprosthetic atypical mycobacterial infection in breast implants: a new kid on the block! *J Plast Surg* 2013;66:e16–19.
- [20] Feldman EM, Kontoyannis DP, Sharabi SE, Lee E, Kaufman Y, Heller L. Breast implant infections: is cefazolin enough? *Plast Reconstr Surg* 2010;126:779–85.
- [21] Seng P, Bayle S, Alliez A, Romain F, Casanova D, Stein A. The microbial epidemiology of breast implant infections in a regional referral centre for plastic and reconstructive surgery in the south of France. *Int J Infect Dis* 2015;35:62–6.
- [22] Darragh L, Robb A, Hardie CM, McDonald S, Valand P, O'Donogue JM. Reducing implant loss rates in immediate breast reconstructions. *Breast* 2017;31:208–13.
- [23] Guggenbichler JP, Assadian O, Boeswald M, Kramer A. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials – catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhyg Interdisz* 2011;6:1–19.
- [24] Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Top* 2012;22:2–16.
- [25] Miller DL, O'Grady NP. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections: recommendations relevant to interventional radiology for venous catheter placement and maintenance. *J Vasc Interv Radiol* 2012;23:997–1007.
- [26] Wassil SK, Crill CM, Phelps SJ. Antimicrobial impregnated catheters in the prevention of catheter-related bloodstream infection in hospitalized patients. *J Pediatric Pharmacol Ther* 2007;12:77–90.
- [27] Garret TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progr Natural Sci* 2008;18:1049–56.
- [28] Artini M, Scoarugli GL, Papa R, Cellini A, Carpentieri A, Pucci P, et al. A new anti-infective strategy to reduce adhesion-mediated virulence in *Staphylococcus aureus* affecting surface proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24:661–72.
- [29] Lorite GS, Rodrigues CM, Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. The role of conditioning film formation and surface

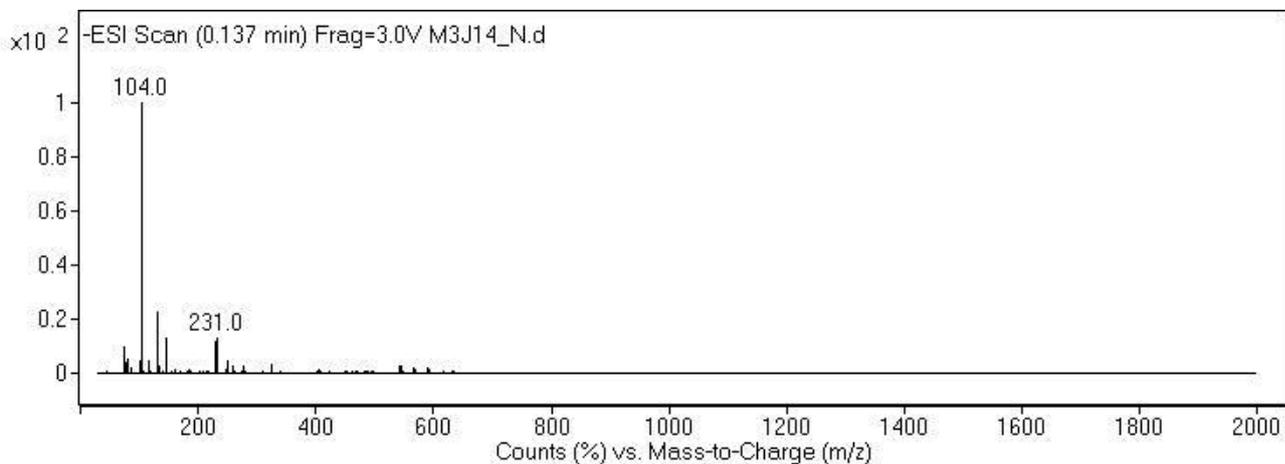
- chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci* 2011;359:289–95.
- [30] Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 2011;36:347–55.
- [31] Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:207–28.
- [32] Xu L, Bauer J, Siedlecki CA. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;124:49–68.
- [33] Nayak N, Satpathy G, Nag HL, Venkatesh P, Ramakrishnan S, Nag TC, et al. Slime production is essential for the adherence of *Staphylococcus epidermidis* in implant-related infections. *J Hosp Infect* 2011;77:153–6.
- [34] Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr* 2015;3:1–30.
- [35] Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:1–10.
- [36] Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2006;74:488–96.
- [37] Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2011;2:445–59.
- [38] Nandakumar V, Chittaranjan S, Kurian VM, Doble M. Characteristics of bacterial biofilm associated with implant material in clinical practice. *Polym J* 2012;45:137–52.
- [39] Ehrensberger MT, Tobias ME, Nodzo SR, Hansen LA, Luke-Marshall NR, Cole RF, et al. Biomaterials cathodic voltage-controlled electrical stimulation of titanium implants as treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic infections. *Biomaterials* 2015;41:97–105.
- [40] Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002;292:107–13.
- [41] Tuson HH, Weibel DB. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter* 2013;9:4368–80.
- [42] Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S. Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol* 2016;7:56–66.
- [43] Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011;15:305–11.
- [44] Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982;37:318–26.
- [45] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996–1006.
- [46] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;115:891–9.
- [47] Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohed H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002;191:101–6.
- [48] Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:4135–45.
- [49] Hamed S, Shojaosadati SA, Mohammadi A. Evaluation of the catalytic, antibacterial and anti-biofilm activities of the *Convolvulus arvensis* extract functionalized silver nanoparticles. *J Photochem Photobiol B Biol* 2016;167:36–44.
- [50] Trentin DS, Giordani RB, Zimmer KR, Silva AG, Silva MV, Correia MTS, et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* 2011;137:327–35.
- [51] Bakkiyaraj D, Pandian STK. In vitro and in vivo antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofouling* 2010;26:711–7.
- [52] Qi X, Poernomo G, Wang K, Chen Y, Chan-Park MB, Xu R, et al. Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: superior antimicrobial and anti-biofilm properties. *Nanoscale* 2011;3:1874–80.
- [53] Escobar AM, Fuentes R, Cantin M. Uso de antibióticos en cirugía de implantes: una revisión sistemática. *Int J Odontostomat* 2013;7:59–67.
- [54] Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial–material interactions. *Biomater* 2012;2:176–94.
- [55] Feng W, Geng Z, Li Z, Cui Z, Zhu S, Liang Y, et al. Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes. *Mater Sci Eng C* 2016;62:105–12.
- [56] Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials* 2014;35:9114–25.
- [57] Gorzelanny C, Kmeth R, Obermeier A, Bauer AT, Halter N, Kümpel K, et al. Silver nanoparticle-enriched diamond-like carbon implant modification as a mammalian cell compatible surface with antimicrobial properties. *Sci Rep* 2016;6:22849.
- [58] Rajaraman S, Subbiahdoss G, Dhakshinamoorthy G, Rajakannu S. *Ocimum sanctum* extract coating on biomaterial surfaces to prevent bacterial adhesion and biofilm growth. *Asian J Pharm Clin Res* 2015;8:229–33.
- [59] Ye J, Shao C, Zhang X, Guo X, Gao P, Cen Y, et al. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation. *Mater Sci Eng C* 2017;78:738–47.
- [60] Amalou H, Negussie AH, Ranjan A, Chow L, Xu S, Kroeger C, et al. Electrically conductive catheter inhibits bacterial colonization. *J Vasc Interv Radiol* 2014;25:797–802.

APÊNDICIDE B - DADOS DE RMN DE ¹H DO LÍQUIDO IÔNICO

RMN de ¹H são: 9.4 (s, 2H), 7.8 (s, 2H), 7.75 (s, 2H), 4.18 (t, 4H, 2CH₂), 3.86 (6H, 2Me), 3.46 (6H, 2CH₂ + 2H, serina), 1.76 (m, 4H), 1.23 (m, 14H).

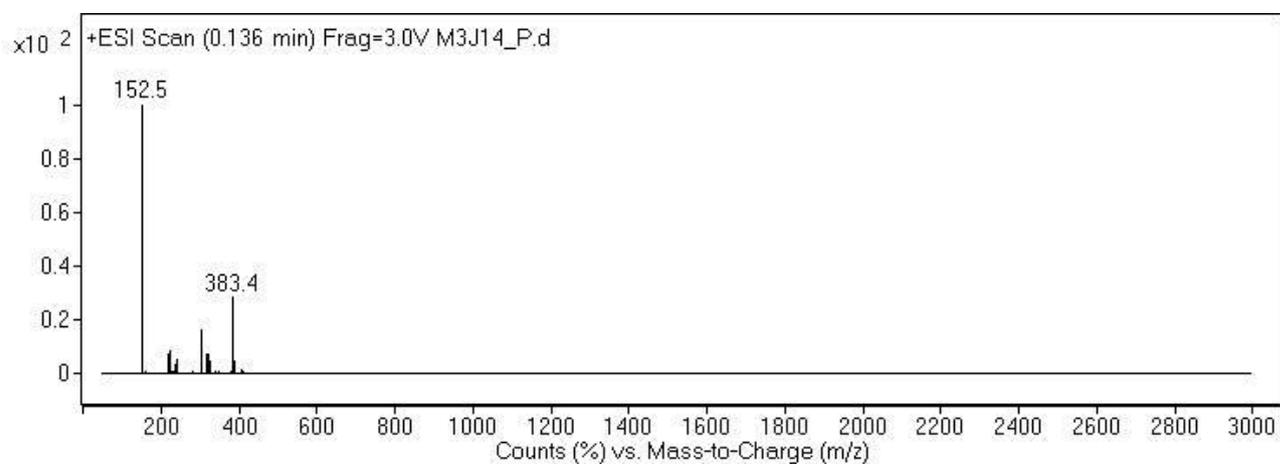
APÊNDICIDE C - ESPECTROS DE MASSA DO LÍQUIDO IÔNICO

Figura 1. Espectro de massas do Líquido iônico derivado da serina. Modo negativo.



Fonte: O Autor, 2018.

Figura 2. Espectro de massas do Líquido iônico derivado da serina. Modo positivo.



Fonte: O Autor, 2018.

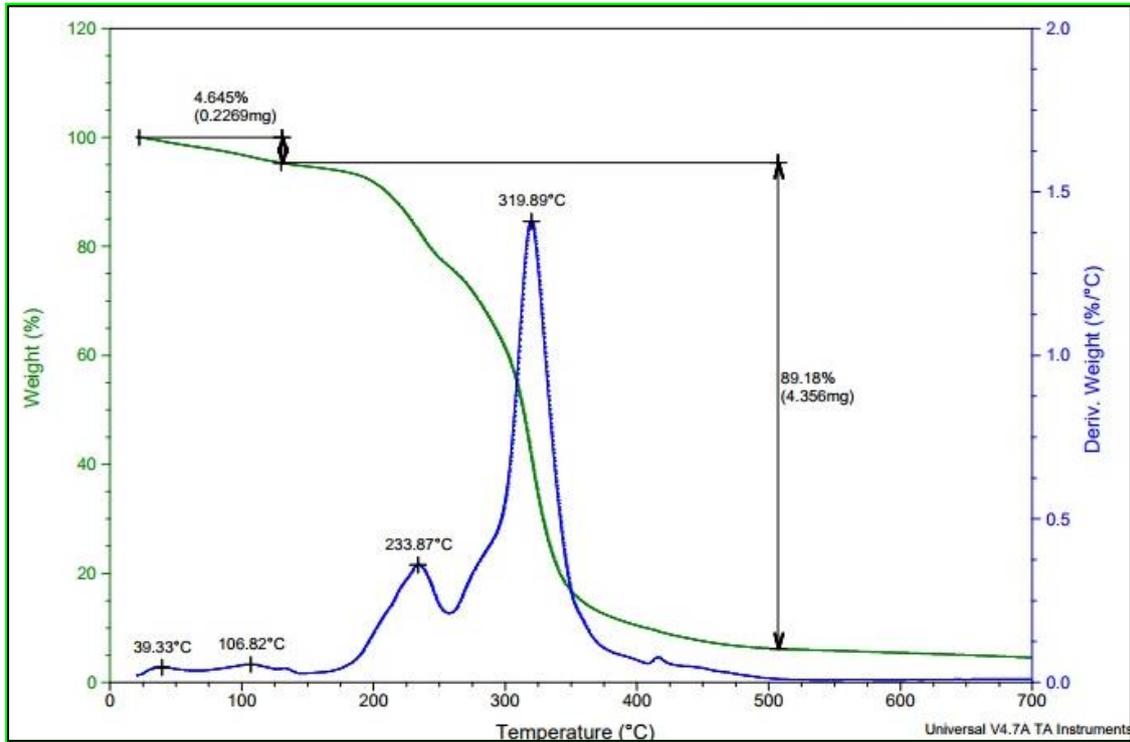
Fragmentos:

Modo negativo: 104 (ânion); 616 (um cátion e três ânions); 326 (um cátion sem imidazol e dois ânions).

Modo positivo: 221 (cátion sem imidazol); 408 (cátion e um ânion); 386 (cátion e um imidazol).

APÊNDICE D - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO LÍQUIDO IÔNICO

Figura 3. Análise termogravimétrica do Líquido iônico derivado da serina.

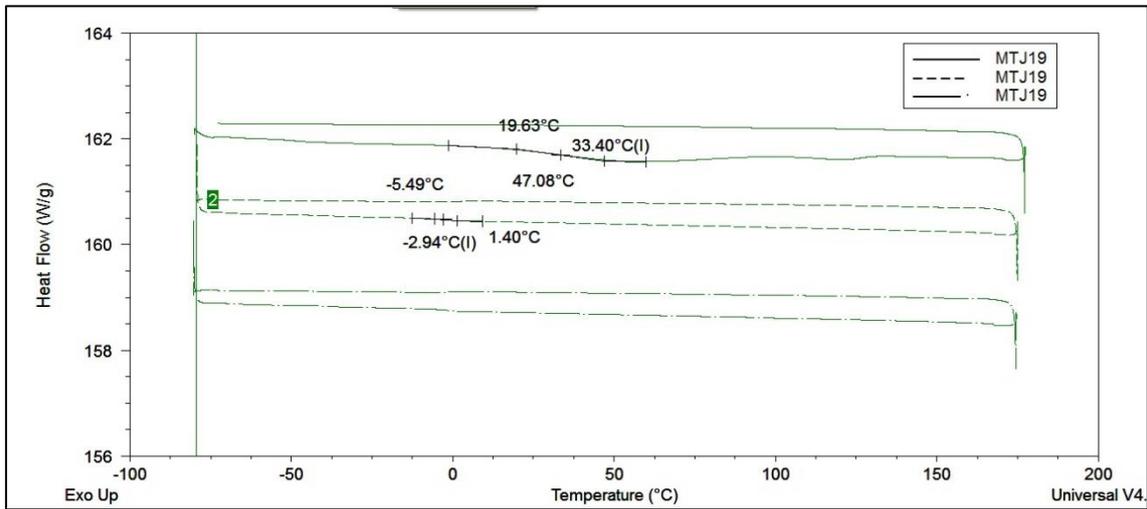


Fonte: O Autor, 2018.

Temperatura de decomposição: 233°C

APÊNDICIDE E - CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DO LÍQUIDO IÔNICO

Figura 5. Análise exploratória diferencial do Líquido iônico derivado da serina.



Fonte: O Autor, 2018.

Temperatura de fusão ou transição vítrea: -2,94°C