



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA VIEIRA DE BARROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME *in vitro* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES SOBRE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS

NATAL, RN
SETEMBRO de 2021

AMANDA VIEIRA DE BARROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME *in vitro* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES SOBRE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Renato Motta Neto

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo

NATAL, RN
SETEMBRO de 2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - Centro de Biociências - CB

Barros, Amanda Vieira de.

Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme in vitro de óleos essenciais de plantas condimentares sobre bactérias potencialmente patogênicas / Amanda Vieira de Barros. - 2021. 80 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Natal, RN, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Renato Motta Neto.

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo.

1. Compostos fitoquímicos - Dissertação. 2. Conservação de alimentos - Dissertação. 3. Biofilmes - Dissertação. 4. Z. officinale - Dissertação. 5. A. sativum - Dissertação. I. Motta Neto, Renato. II. Araújo, Renata Mendonça. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 547

AMANDA VIEIRA DE BARROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME *in vitro*
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES SOBRE
BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Norte como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21/09/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Renato Motta Neto
Orientador

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/ UFRN



Profª. Drª. Renata Mendonça Araújo
Coorientadora
Instituto de Química/ UFRN



Drª. Manoela Torres do Rêgo
Membro interno



Profª. Drª. Tatiana Paschoalette Rodrigues Bachur
Membro externo
Curso de Medicina/ UECE

“Aquele que trabalha duro pode superar um gênio, mas, de nada adianta trabalhar duro se você não confia em você mesmo...”

Uzumaki, Naruto

Dedico essa dissertação a minha irmã mais nova, Aline, para que possa inspirá-la a ser o que quiser e correr atrás dos seus sonhos.

Aos meus pais, pela educação e todo o amor dado.

E ao meu namorado, por ser a grande inspiração desse trabalho, pela parceria e apoio durante todos esses anos.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado forças, saúde e determinação para que eu conseguisse desenvolver essa pesquisa.

Agradeço a minha mãe, Liduina, por todo o investimento e incentivo para que eu sempre estudasse. Ao meu pai Fábio, por sempre estar por mim e a minha irmã Aline, por todo o amor.

Ao meu namorado, Patryck, por todo o amor dado nos piores e melhores dias, por sempre me ajudar em tudo e ser minha inspiração para me tornar uma pesquisadora melhor a cada dia.

Amigos que deixei no Cabo de Santo Agostinho/PE e Serra Talhada/PE, mas principalmente a Isabel, Rayanne, Vitória e Shirlene, que fazem parte da minha jornada e do meu crescimento, sou eternamente grata por todos os momentos.

As novas amizades que fiz na UFRN, em especial a Nadja e Brena, pelos finais de tarde em Ponta Negra, os drinks no meio da semana e vários momentos incríveis que já me fazem sentir um aperto no peito de saudade. E a Karielly, mesmo voltando cedo demais para o Piauí, guardo todos os nossos momentos com muito carinho, com exceção do dia em que fomos assaltadas.

Ao Prof. Dr. Renato Motta, por ter sido meu orientado e por abrir diversas portas para mim na UFRN, sempre me incentivando e compartilhando conhecimento, o que me fizeram me apaixonar mais pela bacteriologia.

A Isabela, por me receber na UFRN de braços abertos quando eu não conhecia ninguém, por todos os ensinamentos e conversas, que me ajudaram de uma forma imensurável.

Ao Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos Orgânicos (LISCO/UFRN) pela parceria, em especial a Prof. Dr. Renata Mendonça e Luan, que tiveram um grande papel nesse trabalho, me auxiliando sempre que eu precisava.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL/UFRN) pela parceria nas análises.

Agradeço ao Prof. Dr. Umberto pelos ensinamentos e ao suporte no pouco tempo que lhe coube. Agradeço também ao pessoal da Biofísica, Katy, Sabrynnna, Aline, Washington e Xavier, por todo o auxílio

A esta universidade, ao PPGCB e seu corpo docente que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Na busca por novas alternativas para o controle bacteriano, pesquisas utilizando plantas condimentares estão ganhando cada vez mais destaque. Perante do seu valor nutricional e potencial antibacteriano, as plantas condimentares estão sendo utilizadas em metodologias alternativas. Com isso, antimicrobianos de origem natural poderiam ser uma alternativa eficaz e viável economicamente para a conservação de alimentos, substituindo o uso de substâncias sintéticas. Com base nestas pesquisas, o objetivo principal de estudo foi avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme de óleos essenciais de plantas condimentares frente as cepas de interesse alimentar *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (CCBH 5698) e *Salmonella Typhimurium*. As plantas *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Allium sativum* (Alho) foram obtidas comercialmente, e seus óleos extraídos por hidrodestilação acoplada ao Clevenger. Seus perfis químicos foram avaliados pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima e, posteriormente, a Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais. As concentrações subinibitórias de CIM, 2xCIM e 4xCIM foram utilizadas para analisar o efeito dos óleos na inibição dos biofilmes, sendo avaliados pelos testes de captação do cristal violeta e leitura da densidade óptica a 595 nm, e os resultados comparados com o efeito do antibiótico Amoxicilina nas mesmas concentrações. Na avaliação do perfil químico dos óleos essenciais, observou-se maior concentração de monoterpenos e sesquiterpenos em *R. officinalis* e *Z. officinale*, enquanto o óleo de *A. sativum* era composto majoritariamente de substâncias organossulfuradas. Os óleos essenciais demonstraram atividade contra as cepas testadas, em especial frente a *P. aeruginosa* (CIM 1,33-5,33 µg/mL e CBM 0,83-1 µg/mL). O melhor resultado do óleo de *R. officinalis* foi observado contra a cepa *S. aureus* (CIM 8 µg/mL e CBM 3,33 µg/mL), já *Z. officinale* conseguiu melhor efeito frente a *E. coli* (CIM 4 µg/mL e CBM 5,33 µg/mL), enquanto o óleo de *A. sativum* teve o melhor desempenho frente a *K. pneumoniae* (CIM 4 µg/mL e CBM 5,33 µg/mL). Avaliando o efeito dos óleos na inibição do biofilme, *R. officinalis* conseguiu inibir apenas a formação *S. aureus* ($\geq 57,33\%$) nas concentrações de 2xCIM e 4xCIM, não apresentando efeito frente aos demais biofilmes. Os melhores efeitos antibiofilme foram observados para *Z.*

officinale e *A. sativum*, no qual, conseguiram inibir a formação de quase todos os biofilmes testados com taxa de inibição maiores que 70%, obtendo melhor desempenho do que o antibiótico Amoxicilina nas mesmas concentrações. Conclui-se que, devido a concentração de terpenos e organossulfurados, os óleos essenciais de *Z. officinale* e *A. sativum*, respectivamente, apresentaram melhor atividade antibacteriana, inibindo a formação de biofilmes e configurando-se como alternativas promissoras para a conservação de alimentos e combate de microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: Compostos Fitoquímicos; Conservação de Alimentos; Biofilmes; *Z. officinale*; *A. sativum*.

ABSTRACT

In the search for new alternatives for bacterial control, research using spice plants is gaining more and more prominence. Given their nutritional value and antibacterial potential, spice plants are being used in alternative methodologies. Thus, antimicrobials of natural origin could be an effective and economically viable alternative for food preservation, replacing the use of synthetic substances. Based on these researches, the main objective of the study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm potential of essential oils from spice plants against strains of food interest *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (CCBH 5698) and *Salmonella* Typhimurium. The plants *Rosmarinus officinalis* (Rosecrim), *Zingiber officinale* (Ginger), and *Allium sativum* (Garlic) were commercially obtained, and their oils were extracted by hydrodistillation coupled with Clevenger. Their chemical profiles were evaluated by the Gas Chromatography technique coupled with Mass Spectrometry. To evaluate the antimicrobial activity, the Minimum Inhibitory Concentration and, subsequently, the Minimum Bactericidal Concentration of essential oils were determined. The subinhibitory concentrations of MIC, 2xMIC, and 4xMIC were used to analyze the effect of oils in inhibiting biofilms, being evaluated by crystal violet uptake tests and optical density reading at 595 nm, and the results compared with the effect of the antibiotic Amoxicillin at the same concentrations. In evaluating the chemical profile of essential oils, a higher concentration of monoterpenes and sesquiterpenes was observed in *R. officinalis* and *Z. officinale*, while the oil of *A. sativum* was mainly composed of organosulfur substances. The essential oils showed activity against the strains tested, especially against *P. aeruginosa* (MIC 1.33-5.33 µg/mL and CBM 0.83-1 µg/mL). The best result of the oil of *R. officinalis* was observed against the *S. aureus* strain (MIC 8 µg/mL and MBC 3.33 µg/mL), whereas *Z. officinale* achieved a better effect against *E. coli* (MIC 4 µg/mL and MBC 5.33 µg/mL), while *A. sativum* oil had the best performance against *K. pneumoniae* (MIC 4 µg/mL and MBC 5.33 µg/mL). Assessing the effect of oils on biofilm inhibition, *R. officinalis* was able to inhibit only the *S. aureus* formation ($\geq 57.33\%$) at the concentrations of 2xMIC and 4xMIC, with no effect on other biofilms. The best antibiofilm effects were observed for *Z. officinale* and *A. sativum*, in which they managed to inhibit the formation of almost all tested biofilms with an inhibition rate greater than 70%, achieving better performance than the antibiotic Amoxicillin at the same concentrations. It is concluded that, due to the concentration of terpenes and organosulfur, the essential oils of *Z. officinale* and *A. sativum*, respectively, showed better antibacterial activity, inhibiting the formation of biofilms and becoming promising alternatives for the preservation of food and combating pathogenic microorganisms.

Keywords: Phytochemicals; Food Preservation; Biofilms; Ginger; Garlic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do modelo dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano (1) Adesão reversível; (2) Adesão irreversível; (3) Início do processo de maturação do biofilme; (4) Biofilme totalmente maduro com arquitetura complexa; (5) Rompimento	26
Figura 2. Relações biossintéticas entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário das plantas.	34
Figura 3. <i>Rosmariuns officinalis</i> L. in natura.....	46
Figura 4. <i>Zingiber officinale</i> Roscoe in natura.	48
Figura 5. <i>Allium sativum</i> L. in natura.	50
Figura 6. Procedimento para a extração do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> (1) Pesagem do material vegetal (2) extração do óleo essencial pela técnica de hidrodestilação (3) Aparelho de Clevenger acoplado ao balão volumétrico.	54
Figura 7. Teste de microdiluição em placa para a determinação da concentração mínima dos óleos essenciais.....	57
Figura 8. Perfil cromatográfico de folhas frescas de <i>Rosmarimus officinalis</i> ... 60	
Figura 9. Espectros de massas de <i>R. officinalis</i> com fragmentos MS dos compostos identificados de 1-18 e suas respectivas estruturas.....	60
Figura 10. Perfil cromatográfico de rizomas frescos de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	65
Figura 11. Espectros de massas de <i>Z. officinale</i> com fragmentos MS dos compostos identificados de 1-19 e suas respectivas estruturas.....	65
Figura 12. Perfil cromatográfico de bulbos frescos de <i>Allium sativum</i> L.	70
Figura 13. Espectros de massas de <i>A. sativum</i> com fragmentos MS dos compostos identificados de 1-6 e suas respectivas estruturas.....	70
Figura 14. Análise para determinar a Concentração Bactericida Mínima do óleo de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a <i>E. coli</i>	73
Figura 15. Análise para determinar a Concentração Inibitória Mínima do óleo de <i>Zingiber officinale</i> frente a <i>P. aeruginosa</i>	74
Figura 16. Análise para determinar a Concentração Bactericida Mínima do óleo de <i>Zingiber officinale</i> frente a <i>K. pneumoniae</i>	74
Figura 17. Efeito do OERO na formação do biofilme de <i>S. aureus</i> . Estão indicados quais análises obtiveram inibição de 50% na formação do biofilme e diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e os controles (positivo e/ou	

negativo). As barras indicadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. 77

Figura 18. Efeito do OEZO na formação dos biofilmes. Estão indicados quais análises obtiveram inibição de 50% na formação do biofilme e diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e os controles (positivo e/ou negativo). As barras indicadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey..... 77

Figura 19. Teste de captação do cristal violeta submetido aos biofilmes bacterianos frente ao OEZO (1) *P. aeruginosa* (2) *S. aureus*..... 79

Figura 20. Efeito do OEAS na formação do biofilme bacteriano. Estão indicados quais análises obtiveram inibição de 50% na formação do biofilme e diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e os controles (positivo e/ou negativo). As barras indicadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise cromatográfica do óleo de <i>R. officinalis</i>	64
Tabela 2. Análise cromatográfica do óleo de <i>Z. officinale</i>	69
Tabela 3. Análise cromatográfica do óleo de <i>Allium sativum</i>	72
Tabela 4. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a diferentes bactérias patogênicas humanas (µg/mL)	72
Tabela 5. Porcentagem de inibição da formação de biofilme	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais classes de antibióticos utilizados, seus espectros de ação, mecanismos de ação e estrutura química. 20

Quadro 2. Principais classes de compostos antimicrobianos de plantas e seus possíveis mecanismos de ação..... 41

LISTA DE SIGLAS

AN	Ágar Nutriente
BHI	Caldo <i>Brain Heart Infusion</i>
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EPS	Exopolissacarídeos
LABIMIC	Laboratório de Micobactérias
CBM	Concentração Bactericida Mínima
MDR	Multidroga Resistente
MH	Caldo Mueller-Hinton
MHA	Ágar Mueller-Hinton
CIM	Concentração Inibitória Mínima
OE	Óleos Essenciais
OEAS	Óleo Essencial de <i>Allium sativum</i>
OERO	Óleo Essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>
OEZO	Óleo Essencial de <i>Zingiber officinale</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Resistência bacteriana	19
2.1.1 Da era de ouro a era pós-antibiótica.....	19
2.1.2 Mecanismos de Resistência Bacteriana	23
2.1.2.1 Biofilmes.....	25
2.1.3 Doenças transmitidas por alimentos.....	28
2.2 Plantas e Seus Compostos Bioativos	30
2.2.1 Histórico do uso	30
2.2.2 Metabolismo vegetal e os compostos secundários.....	33
2.2.3 Óleos Essenciais	37
2.2.4 Plantas Condimentares	44
2.2.4.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	45
2.2.4.2 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	47
2.2.4.3 <i>Allium sativum</i> L.	49
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1 Óleos Essenciais.....	54
4.1.1 Material vegetal e Extração do óleo.....	54
4.1.2 Caracterização química	55
4.2 Atividade Antibacteriana	55
4.2.1 Microrganismos utilizados e condições de cultivo	55
4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	56
4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima.....	57
4.3 Atividade inibitória do crescimento de biofilmes.....	57
4.3.1 Avaliação da produção de biofilme como parâmetro	57
4.3.2 Efeitos dos óleos essenciais e misturas sobre o biofilme	58
4.4 Análise estatística.....	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Composição química dos óleos essenciais	60
5.2 Atividade Antimicrobiana	72
5.3 Atividade Antibiofilme	75

6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÃO.....	95
8	PERPECTIVAS FUTURAS	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, plantas e animais desenvolveram estratégias semelhantes de defesa para combater patógenos bacterianos. E como resultado, as plantas contêm compostos seguros e eficazes com ação antibacteriana (NAKAGAWA et al., 2020). Newman & Cragg (2016) descrevem que, os produtos naturais desempenham um papel único na indústria farmacêutica e alimentícia. De fato, a existência de uma variedade de moléculas derivadas é um diferencial. E por muitas vezes tais moléculas não podem ser obtidas por via sintética, já que os produtos naturais abrangem estruturas complexas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Determinadas características tornam os produtos naturais, principalmente os óleos essenciais, uma alternativa viável para o tratamento de infecções e aplicação como sanitizantes e/ou conservante de alimentos. Com a existência de diferentes mecanismos de ação frente às bactérias, os compostos presentes nos óleos essenciais tornam-se um objeto de estudo interessante (CUTRIM et al., 2019). Alguns desses mecanismos de ação possuem atividades relacionadas à membrana citoplasmática onde, principalmente os compostos aromáticos e fenólicos, provocam alterações na estrutura e funções bacterianas (MONTES; NETA; CRUZ, 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que de 25% a 50% dos insumos medicinais utilizados são derivados de forma direta ou indireta das plantas (BOXALL et al., 2006; ANAND et al., 2019). Diante do potencial dos óleos essenciais, sua aplicação poderia prevenir o início da deterioração de alimentos e impedir o crescimento de patógenos alimentares (RODRIGUES; CARVALHO; WIEST, 2011). Nos últimos anos, vem crescendo o interesse da indústria alimentícia em utilizar conservantes naturais. A aplicação extensiva de conservantes químicos pode estar relacionada com desenvolvimento de alergias, câncer e outras reações adversas. Além disso, a utilização descontrolada destas substâncias aumenta os riscos do desenvolvimento de resistência das cepas microbianas (CUTRIM et al., 2019).

A formação dos biofilmes é um dos principais mecanismos de resistência bacteriana. Em se tratando de biofilmes, a concentração necessária de um antimicrobiano para eliminar bactérias em estado séssil pode ser até 100 vezes maior do que a necessária para eliminar bactérias de vida livre (HØIBY et al., 2010; CHEN et al., 2018). Tal resistência gera um impacto negativo em várias

atividades produtivas, podendo ocasionar perdas significativas, tanto na indústria quanto na clínica (LEE; YOON, 2017). Assim, devido as propriedades antibacterianas e antioxidantes, estuda-se a aplicação dos óleos essenciais de plantas condimentares para reduzir os riscos de surtos de origem alimentar provocados por bactérias e biofilmes (MONTES; NETA; CRUZ, 2013).

O uso dos óleos essenciais na conservação de alimentos, em muitos casos, poderia ser uma alternativa segura para o consumidor e para o meio ambiente (CUTRIM et al., 2019). O uso plantas condimentares não se limita apenas no ponto de vista organoléptico, mas os seus compostos químicos também oferecem benefícios a saúde, por agregarem valores nutricionais aos alimentos e promoverem estímulos a certos sistemas biológicos. Plantas como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), alho (*Allium sativum* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) são conhecidas por terem ação profiláticas e como conservantes alimentares (LORENZI, 2014).

O valor terapêutico das plantas é atribuído aos seus componentes bioativos, podendo ser dependentes das quantidades consumidas e da sua biodisponibilidade (IZIDORO et al., 2021). Os óleos essenciais, que consistem em uma mistura de compostos, são ricos em metabólitos secundários, e cada um destes pode exibir efeitos sinérgicos e antagônicos (PAVELA, 2015). Os metabólitos secundários são compostos naturais que exercem diversas funções na planta e possuem propriedades bioativas num amplo espectro de ação contra patógenos clínicos e alimentares (RODRIGUES; CARVALHO; WIEST, 2011; CARVALHO et al., 2016).

O conjunto dos compostos bioativos dos óleos essenciais demonstram ter maior atividade antibacteriana do que seus componentes majoritários, sugerindo que os componentes minoritários são críticos para a atividade sinérgica, embora também tenham sido observados efeitos antagônicos e aditivos (BASSOLÉ; JULIANI, 2012). A diversidade de compostos permite a existência de diferentes mecanismos de ação, possibilitando o uso como um agente bacteriostático e/ou bactericida, e ainda dificultando a adaptação do microrganismo (RODRIGUES; CARVALHO; WIEST, 2011; CARVALHO et al., 2016).

Em sua maioria, o desenvolvimento de conservantes naturais permitiria a obtenção de produtos com baixa toxicidade, ação eficaz, poucos efeitos colaterais, além do melhor custo/benefício, quando comparados com os antimicrobianos sintéticos (BOXALL et al., 2006; ANAND et al., 2019). Com isso,

o objetivo do presente trabalho realizar a caracterização química dos óleos essenciais, obtidos a partir de plantas condimentares usuais, e avaliar o efeito na inibição de bactérias e biofilmes de cepas padrão e cepa clínica de importantes patógenos alimentares.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resistência bacteriana

2.1.1 Da era de ouro a era pós-antibiótica

A história da humanidade poderia ser dividida entre a vida antes e depois do surgimento dos antibióticos. Seguindo uma linha do tempo, durante o período da Primeira Guerra Mundial, cerca de 75% das mortes registradas foram causadas por doenças infecciosas (GOTTFRIED, 2005; LUEPKE et al., 2017). Alguns anos depois, a descoberta de Alexander Fleming iria revolucionar a medicina, após o primeiro registro da atividade antibacteriana de uma substância isolada do fungo do gênero *Penicillium*, a Penicilina (BROWN; WRIGHT, 1964; WRIGHT, 2017).

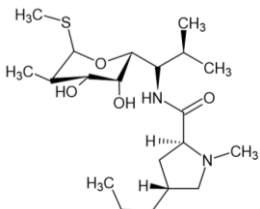
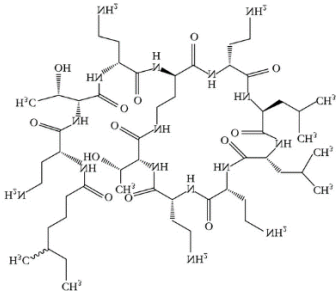
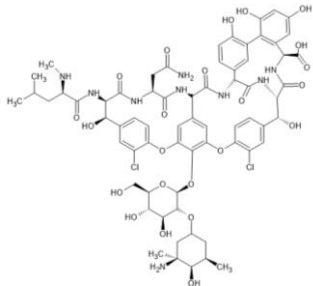
Historicamente, as doenças infecciosas causam milhares de mortes todos os anos. Em 1930, cerca de 22% do total de mortes registradas nos Estados Unidos, foram em decorrência de doenças bacterianas, sobretudo por tuberculose e pneumonia, que atualmente são totalmente tratáveis (GOTTFRIED, 2005; LUEPKE et al., 2017). Em 1935, outra classe importante de antibióticos foi descoberta: a atividade antibacteriana das sulfas era oficializada, após observação do efeito em ratos e estudos realizados em pacientes com erisipela e outras infecções (BORGES et al., 2005).

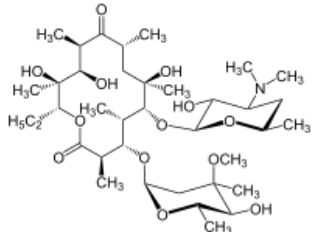
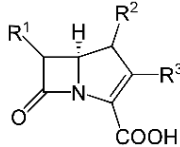
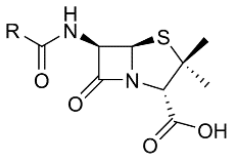
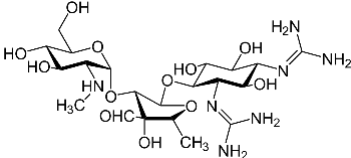
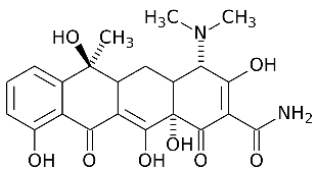
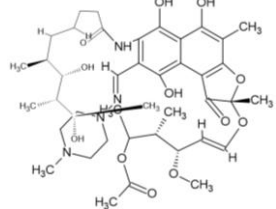
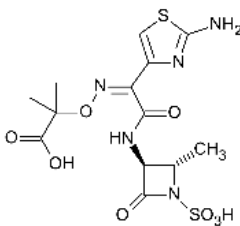
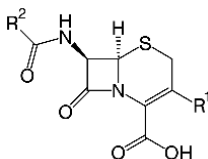
Por definição, os antibióticos são fármacos de baixa massa molecular, com diferentes funções e estruturas químicas (DUIJKEREN et al., 2018). São substâncias derivadas de microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) que inibem o crescimento de outros microrganismos, podendo combater infecções. Os antibióticos são, portanto, uma classe pertencente aos dentro dos fármacos antimicrobianos que de modo mais amplo, consistem em substâncias naturais (antibióticos), sintéticas (quimioterápicos) ou semi-sintético, que agem sobre microrganismos, inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

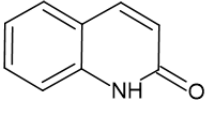
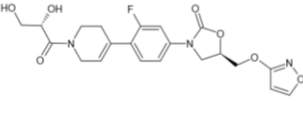
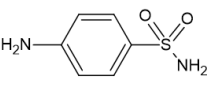
Com a aplicação dos antimicrobianos nos sistemas de saúde em larga escala, houve o aumento na expectativa de vida e erradicação de algumas doenças, proporcionando benefícios sociais e econômicos. Entre os anos de 1940 e 1980, a rápida expansão no desenvolvimento de antimicrobianos fez com que quase todas as classes de antibióticos disponíveis hoje na clínica fossem descobertas. Este período compreende a “Era de Ouro” dos antibióticos,

caracterizada pela explosão de pesquisas para a descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana (GWYNNE, 1958; LUEPKE et al., 2017).

As cefalosporinas foram descobertas em 1948, e os aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos e quinolonas foram identificados e desenvolvidas em 1960 (GWYNNE, 1958; LUEPKE et al., 2017). Todos estes antimicrobianos apresentam em comum a atividade antibacteriana letal ou inibitória, em meio ao complexo bioquímico do corpo humano (CONSTANT; CONSTANT, 2015) (Quadro 1).

Quadro 1. Principais classes de antimicrobianos utilizados, seus espectros de ação, mecanismos de ação e estrutura química.			
Classe do Antibiótico	Espectro de ação	Mecanismos de ação	Estrutura química
Lincosamidas	Gram-positivas aeróbias e anaeróbias, <i>Clostridium</i> , <i>Actinomyces</i> e <i>Bacteriodes</i>	Liga-se a subunidade 50S do ribossomo, paralisando a síntese proteica	
Polimixinas	<i>P. Aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> e <i>Acinetobacter</i>	Desarranjo da membrana por afinidade aos LPS	
Glicopeptídeos	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. diphtheriae</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Clostrídios</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> *Novos Glicopeptídeos: estafilococos e enterococos resistentes à vancomicina, oxacilina, metilicina, <i>Streptotococcus pneumoniae</i> multiresistente	Inibe a síntese da parede celular, altera a permeabilidade da membrana, pode inibir a síntese de RNA	

Macrolídeos	Amplo espectro, sendo específico para cada antibiótico da classe	Liga-se a subunidade 50S do ribossomo, paralisando a síntese proteica	
Carbapenemas & penemas	Todos os cocos e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos	Atua na síntese da parede celular	
Penicilinas	Cocos Gram-positivos e Gram-negativos; bacilos Gram-positivos, espiroquetas e actinomicetos.	Atua na síntese da camada de peptídeoglicano	
Aminociclitolis & Aminoglicosídeos	Amplo espectro, principalmente para bactérias Gram-negativas aeróbias	Liga-se ao ribossomo, desregulando a síntese de proteínas vitais	
Tetraciclinas	Cocos e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos, espiroquetas, <i>Rickettsia</i> , micoplasma e clamídia	Liga-se a subunidade 30S do ribossomo, impedindo a transcrição pelo tRNA	
Rifamicina & Rifampicina	<i>M. tuberculosis</i> , Cocos Gram-positivos e Gram-Negativos	Inibição da síntese protética ao impedir a transcrição do DNA	
Monobactâmicos	Gram-negativas	Impede a síntese da parede celular	
Cefalosporinas & Cefamicinas	Cocos e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos, e espiroquetas	Atua na síntese da parede celular	

Quinolonas	Estafilococos (porém existe aumento da resistência de MRSA), <i>S. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Atua sobre a enzima DNA-girase e topoisomerase IV, que controlam o processo de replicação cromossômica	
Oxazolidinonas	Cocos Gram-positivos aeróbios, <i>Corynebacterium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp. e <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Inibe a síntese proteica, atuando na subunidade 50S do ribossomo	
Sulfonamidas	Cocos Gram-positivos e Gram-negativos, <i>H. influenzae</i> , <i>H. ducrey</i> , <i>S. typhi</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , Salmonelas enteropatógenicas e brucela	Inibe a síntese de cofatores da síntese de timidinas, purinas e DNA bacteriano	

Adaptado: Constant & Constant, 2015.

No entanto, a partir de 1980 o desenvolvimento e produção de novos antimicrobianos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) apresentou um grande declínio (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Apenas duas novas classes de antimicrobianos foram descobertas nos últimos 20 anos, e este decréscimo estava acompanhando do aumento nos casos de resistência bacteriana em todo o mundo. Isto indica que estamos dando início a chamada era pós-antibiótica, já prevista por Fleming em 1945 (BROWN; WRIGHT, 2016; WHIGHT, 2017).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é descrita em termos de características fenotípicas (por exemplo, padrões de crescimento) e/ou genotípicas (por exemplo, presença e/ou expressão de genes) das bactérias (DAVISON; WOOLHOUSE; LOW, 2000). A resistência faz parte de um processo natural das bactérias, podendo ser explicada por diversos mecanismos, estando regida pelo princípio da evolução e adaptação genética (MAGALHÃES, 2007; SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018). A resistência bacteriana pode ser classificada de acordo com a origem (resistência intrínseca versus resistência adquirida) ou tipo (resistência única, múltipla ou cruzada) (PRESCOTT; BAGGOTT, 2000; DAVISON; WOOLHOUSE; LOW, 2000).

Contudo, a velocidade em que a resistência se desenvolve, acaba por colocar em desuso alguns antimicrobianos comumente utilizados (FARINÃ, 2016; ACOSTA; VARGAS, 2018). O emprego desnecessário de antimicrobianos acontece em mais de 50% dos casos registrados (WHO, 2012; SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018). Além do uso indiscriminado de antimicrobianos, a falta de programas para prevenção, controle de infecções, ausência de vigilância e regulação do uso de antimicrobianos, contribuem para acelerar o desenvolvimento da resistência (FARINÃ, 2016; ACOSTA; VARGAS, 2018).

A incerteza no diagnóstico entre infecções bacterianas e virais, ausência de exames diagnósticos e o uso de antibióticos de amplo espectro, contribuem para o desenvolvimento de resistência e falha do tratamento (FRANCO et al., 2015). Mas antes da aplicação na clínica, os antimicrobianos já eram empregados de forma extensiva na pecuária e agricultura (SCHWARZ; NOBLE, 1999; DUIJKEREN et al., 2018). No qual, as primeiras falhas terapêuticas da penicilina foram identificadas após três anos da sua liberação para uso comercial (ACOSTA; VARGAS, 2018).

Como consequência, a resistência bacteriana se tornou um problema de saúde pública a nível mundial, atribuindo-se cerca de 700.000 de óbitos, com estimativas de 10 milhões de mortes por ano até 2050 (ALLCOCK et al., 2017; ANGLES, 2018). Apesar disso, os antimicrobianos são parte essencial da medicina moderna, atuando no tratamento e prevenção de infecções graves, principalmente para pacientes transplantados, durante o tratamento do câncer e acometidos de doenças crônicas (VENTOLA, 2015).

2.1.2 Mecanismos de Resistência Bacteriana

Os primeiros antimicrobianos produzidos comercialmente utilizavam produtos resultantes das vias metabólicas de fungos (*Pleurotus*, *Cephalosporium* e *Penicillium*) e bactérias do solo (*Bacillus* e *Streptomyces*). Com a elucidação estrutural dos compostos químicos, foi possível a produção de antimicrobianos em grande escala, redução nos custos de produção e modificação de grupos químicos, viabilizando a alteração das propriedades farmacológicas (DUIJKEREN et al., 2018).

A ação antibacteriana dos antimicrobianos é fundamentada na regulação/inibição da produção de proteínas, enzimas, parede celular, membrana celular e na síntese/reparação dos ácidos nucleicos (KOHANSKI et

al., 2010; KHAMENEH et al., 2016). Esses fármacos podem interferir no crescimento bacteriano ou provocar a morte celular, os chamados efeito bacteriostático e bactericida, respectivamente (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001; DUIJKEREN et al., 2018).

Com exceção daqueles que possuem como alvos a membrana citoplasmática e a parede celular, é necessário que o antimicrobiano penetre na célula para exercer ação antibacteriana. Em resposta, algumas bactérias impermeabilizam a membrana, impedindo a entrada de Tetraciclina, Clorafenicol e Aminoglicosídeos. Os β -lactâmicos por sua vez, possuem mecanismo semelhante, mas seu alvo é a nível de parede celular, ligando-se aos receptores PBP's (*penicillin binding proteins*) presentes na membrana, que são imprescindíveis para a formação da parede celular (CONSTANT; CONSTANT, 2015).

A existência de mecanismos de resistência capazes de neutralizar/destruir antibacterianos, são relatados desde 1940. Naquele momento, cepas de *Staphylococcus* sp. começaram a produzir a enzima penicilase, que hidrolisava o anel β -lactâmico da Penicilina, inativando o antibiótico (MELRO et al., 2019). Compreender os mecanismos de resistência bacteriana auxilia na busca por métodos de combate mais adequados para às infecções (KOHANSKI et al., 2010; KHAMENEH et al., 2016). A resistência ocorre por vias diferentes, em que um mesmo gene/mecanismo de resistência pode se limitar a um único grupo de bactérias ou ser identificado em espécies bacterianas diferentes (DUIJKEREN et al., 2018).

Este mecanismo de resistência está presente frente aos antibióticos cefalosporinas, carbapenemas e, principalmente, para os aminoglicosídeos (MELRO et al., 2019). Além da ocorrência de resistência por meios enzimáticos e inativação de antibióticos, os principais mecanismos estão relacionados à alteração da permeabilidade, modificação do sítio de ação, bombas de efluxo e formação de biofilme (COSTA; JUNIOR, 2017). Devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, as linhagens de células filhas das bactérias são favorecidas, por haver um menor custo energético de adequação, resistência ilimitada e aumento a virulência. Além disso, a evolução possibilitou a transmissão de genes de resistência entre espécies diferentes, através dos elementos genéticos transmissíveis (plasmídeos, integrons e transposons) (PARTRIDGE et al., 2018).

Esses elementos carregam múltiplos genes, que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos (GARCILLÁN-BARCIA; DE LA CRUZ, 2013; PARTRIDGE et al., 2018). Espécies multidroga resistente aos antibióticos (MDR) estão envolvidas nos casos que causam maiores preocupações em instituições de saúde. Alguns dos organismos MDR mais problemáticos são os bacilos Gram-negativos do gênero *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Proteus* e *Morganella* (LEVIN et al., 1995; MILLER et al., 2005; KHAMENEH et al., 2016). Os Cocos Gram-positivos, geralmente *S. aureus*, se comportam como comensal/patógeno oportunistas também são importantes organismos MDR (SANDEL; MCKILLIP, 2004; CITRON et al., 2007).

2.1.2.1 Biofilmes

Mesmo que a definição exata do que seja um biofilme não seja um consenso, os mesmos podem ser definidos como formas de existência microbiana espacial e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas nas matrizes de substâncias poliméricas extracelulares e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Para as bactérias que se encontram associados à biofilmes, à resistência adquirida pela transferência horizontal de genes ocorre de maneira facilitada. Cria-se um ambiente ideal para a troca de genes no interior da matriz de exopolissacarídeos (EPS), meio pelo qual os biofilmes conseguem propagar plasmídeos e círculos de DNA extracromossômico (MC DERMOTT; WALKER; WHITE, 2003; HARBOTTLE et al., 2006).

Elementos genéticos liberados no interior da matriz, podem codificar genes resistência para diferentes classes de antimicrobianos (HARBOTTLE et al., 2006). Por consequência, temos o aumento da diversidade genética dos organismos que constituem os biofilmes, dificultando o tratamento e o controle (DONLAN, 2002; RIBEIRO; BRANDÃO; DALMOLIN, 2021), já que os biofilmes se diferenciam das suas formas livres planctônicas, tanto do ponto de vista fenotípico como genotípico (HA; O'TOOLE, 2015; CAIXETA, et al., 2019).

Para a formação do biofilme, o *quorum sensing* atua como fator responsável pela regulação da expressão gênica para a adesão, maturação e dispersão (CORRÊA, 2017). O sistema do *quorum sensing* refere-se ao fenômeno pelo qual o acúmulo de moléculas de "sinalização" no ambiente circundante permite que uma única célula detecte o número de bactérias (densidade celular),

de modo que a população como um todo possa dar uma resposta coordenada (DIGGLE; CRUSZ; CÁMARAM, 2007)

Primeiro, o biofilme precisa se aderir em uma superfície (processo reversível) natural (ex. pele e alimentos) ou artificial (ex. superfícies metálicas) (PERCIVAL et al., 2011). A adesão não é um processo aleatório, já que os microrganismos se aderem de acordo com o tropismo para determinadas superfícies. Isto explica, ecologicamente, por que uma espécie microbiana pode ser patogênica para o homem e não para outros animais (LORENZO, 2004; ALBUQUERQUE et al., 2010).

Após a adesão, ocorre o processo de multiplicação e deposição de camadas de células envoltas pelo EPS (processo irreversível) (PRAKASH; VEEREGOWDA; KRISHNAPPA 2003). É formada uma comunidade microbiana mais resistente a forças físicas, alterações de pH e temperatura, que sobrevive a baixas concentrações de nutrientes, presença de radicais oxigenados, radiação UV e dessecação (Figura 1). Essa comunidade pode integrar bactérias de uma mesma espécie ou de espécies diferentes (GACA; LEMOS, 2019). A capacidade de reduzir a própria taxa de crescimento, vivendo em fase estacionária, é um método eficiente contra ação de antibióticos dependentes da multiplicação bacteriana, como os β -lactâmicos. Além disso a produção de enzimas, como as β -lactamases, permite que os biofilmes consigam inativar antimicrobianos (LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014; NAVEED et al., 2020).

Figura 1. Esquema do modelo dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano (1) Adesão reversível; (2) Adesão irreversível; (3) Início do processo de maturação do biofilme; (4) Biofilme totalmente maduro com arquitetura complexa; (5) Rompimento



Fonte: Yi et al., 2020

A baixa difusão através da matriz de ESP protege a bactéria da ação de antimicrobianos, produtos sanitizantes e células fagocitárias da resposta imune. Por não conseguirem passar a matriz de EPS, os antimicrobianos não têm acesso às células aderidas à superfície, tornando as células sésseis cerca de 100 vezes mais resistente em relação às células planctônicas. Essa proteção possibilita a colonização e estabelecimento de biofilmes que, uma vez instaurados, são de difícil tratamento (ACHINAS; CHARALAMPOGIANNIS; EUVERINK, 2019; GOEL et al., 2021).

A inibição dos antibacterianos é provocada também pelas diferenças de pH dentro da matriz. O acúmulo de detritos metabólicos ácidos nos biofilmes alteram a quantidade de porinas, diminuindo a permeabilidade aos antimicrobianos. O acúmulo dessas moléculas pode ainda produzir gradientes de concentração, fornecendo proteção às células bacterianas subjacentes (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). A matriz é carregada negativamente, conseguindo inativar ou dificultar a integração de antibióticos carregados positivamente, como os aminoglicosídeos, dificultando a integração nas camadas mais profundas do biofilme (LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014; NAVEED et al., 2020).

A formação do biofilme promove vantagens para a comunidade bacteriana, provocando o aumento da resistência e virulência. Bactérias em biofilmes causam grande preocupação em relação a segurança dos alimentos. Os biofilmes conseguem colonizar diferentes ambientes industriais,

comprometendo qualidade dos alimentos. Fatores associados a presença dos biofilmes implicam na mudança da degradação e geração de substratos, gerando desvantagens como competição por nutrientes e acúmulo de produtos tóxicos excretados pelo metabolismo celular (RENDUELES; GHIGO, 2012).

Além do mais, a persistência de microrganismos patogênicos é responsável por contaminações cruzadas em produtos alimentícios (MIAO et al., 2017; CARVALHO et al., 2019). A remoção de biofilmes é um processo difícil, além do fato dos biofilmes responderem por mais de 80% dos casos de infecções bacterianas, o que requer a busca constante de alternativas para solucionar este problema (SANCHEZ et al., 2013). E com o aumento da tolerância aos sanitizantes comuns, estudos buscam por novos agentes capazes de inibir e prevenir a formação de biofilmes (ROSSI et al., 2020).

2.1.3 Doenças transmitidas por alimentos

Os alimentos são importantes veículos para a transmissão de bactérias resistentes aos antimicrobianos, provocando infecções de difícil tratamento (HARTANTYO et al., 2020). Isso se torna um problema grave quando relacionada às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). As DTAs são conhecidas por síndromes associadas a ingestão de alimentos contaminados por substâncias de origem química (ex. pesticidas) ou biológica (microrganismos patogênicos). No Brasil, as bactérias estão envolvidas em mais 84% dos casos notificados, o que pode ser agravado caso a bactéria envolvida seja resistente a antimicrobianos (SIRTOLI & COMARELLA, 2018).

Contaminações provocadas por microrganismos causam alterações significativas nas propriedades organolépticas dos alimentos. Todo alimento contém atividade biológica, e como isso, possuem a tendência de degradar-se por vias metabólicas e enzimáticas (ROWLAND et al., 2018). Porém, contaminações microbianas podem acelerar esses processos, levando à perda de qualidade e redução da vida de prateleira (SOUSA, 2008). Agentes bacterianos patogênicos, oferecem grande risco a saúde humana, visto que estão constantemente associados a surtos alimentares e mortes. Anualmente, cerca de 30% da população mundial sofre com doenças de origem alimentar provocadas por bactérias patogênicas (WHO, 2007).

Para Sirtoli & Comarella (2018), com a diversidade de agentes bacterianos envolvidos, os casos de infecções ou intoxicações podem se

apresentar de forma crônica ou aguda. Esses agentes geralmente estão presentes em surtos ou de casos isolados, com distribuição localizada ou disseminada e com formas clínicas diversas. Para ser classificada como uma epidemia, a DTA precisa ser registrada em duas ou mais pessoas, com a mesma enfermidade, após a ingestão de um mesmo alimento ou água, e com a confirmação das análises epidemiológicas (KLEIN; BISOGNIN; FIGUEIREDO, 2017).

Os casos de DTAs estão cada vez mais crescentes, sendo um assunto de interesse e de conscientização dos consumidores e empresas alimentícias (SOUSA, 2008). Em sua maioria, os casos que envolvem infecções provocadas por bactérias e suas toxinas, se desenvolvem a partir da manipulação inadequada dos alimentos, falta de higienização do ambiente/equipamento ou pelo transporte através dos vetores (BRASIL, 2014). E estima-se que em 70,3% dos casos registrados, não apresentam identificação do agente bacteriano envolvido (SIRTOLI & COMARELLA, 2018).

Poucos estados e municípios brasileiros possuem dados sobre os agentes causadores de DTAs mais comuns, alimentos mais frequentemente envolvidos e os fatores contribuintes (VAN AMSON, 2006). A maioria dos casos de DTAs não são notificados, em parte por que muitos dos patógenos presentes nos alimentos causam sintomas brandos, levando a vítima a não buscar ajuda médica (SIRTOLI; COMARELLA; 2018). Mas as subnotificações também são causadas pela escassez de dados confiáveis sobre os casos de infecção bacteriana, o difícil acesso da população a consultas médicas e a automedicação, que é uma prática comum, devido à facilidade na obtenção de de medicamentos sem prescrição. Em países subdesenvolvidos, incluindo o Brasil, poucas políticas públicas atuam na obtenção e processamento desses dados (FARIAS et al., 2016).

A presença de biofilmes multirresistente a sanitizantes e aos antimicrobianos é comum em ambientes hospitalares, alimentos e indústrias (SANCHEZ et al., 2013). Microrganismos associados a biofilmes exibem mecanismos de resistência importantes relacionados a sua fisiologia. Uma vez instalados, os biofilmes microbianos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos, e a retenção e acúmulo de resíduos e microrganismos em tais ambientes contribuem para o desenvolvimento de biofilmes (ROSSI et al., 2020).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, ressalta-se: *Enterococcus faecium*, *P. aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *K. pneumoniae* (ORAZI; O'TOOLE, 2019). Na Europa, estas bactérias foram responsáveis por cerca de 356.000 casos confirmados de infecção ou intoxicação em 2018, no qual, todos esses patógenos são conhecidos por produzir biofilmes (EFSA, 2019).

O controle de biofilmes microbianos é de grande importância para a indústria de alimentos e, diante do desenvolvimento da resistência aos agentes antimicrobianos, novas alternativas são necessárias. Dentre as estratégias, os óleos essenciais (OE) têm grande potencial para aplicação na indústria de alimentos. Os metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas exercem atividade antimicrobiana variável, dependendo da composição química. E com a crescente demanda por alternativas aos produtos químicos sintéticos convencionais e os problemas relacionados aos seus resíduos tóxicos, existe o interesse por alternativas naturais e verdes (ROSSI et al., 2020)

2.2 Plantas e Seus Compostos Bioativos

2.2.1 Histórico do uso

Investigações sobre as propriedades terapêuticas das plantas está presente desde o início das civilizações (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2015). Registros históricos mostram que por volta de 60 mil anos atrás, as civilizações mais primitivas utilizavam plantas no tratamento de enfermidades, estabelecendo-se como o primeiro método medicinal (SHANIDAR, 1975; CARDOSO et al., 2019). Bortoluzzi, Schmitt & Mazur (2020) descrevem que, o processo de seleção das plantas medicinais está relacionado com o processo de seleção das plantas comestíveis. Mesmo ocorrendo de modo empírico, a seleção ocorria após a planta conseguir combater determinada enfermidade com a ingestão.

Antigas civilizações da China, Índia e Egito, relatavam os efeitos das plantas medicinais envolvidas em cultos e religiões. Registrava-se em extensos catálogos as espécies vegetais como atividade farmacológica efetiva (ANG-LEE; MOSS; YUAN, 2001; CARDOSO et al., 2019). Na Europa, a medicina praticada tinha abordagem racional com base em verificações, diagnósticos e

formulações, produzidas a partir de extensos estudos científicos, sendo passível de comprovação científica (FREITAS, 2012; FREITAS; AZEVEDO; BISERRA, 2014). Quando os europeus chegaram ao Brasil, se depararam com povos que possuíam práticas medicinais únicas. Os nativos faziam uso das plantas encontradas na região e sempre envolviam fatores biológicos, espirituais e transcendentais durante o tratamento (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

No século XIX, a alquimia era substituída pela química experimental, permitindo a síntese em laboratório de diversos compostos orgânicos, inclusive compostos originados de plantas (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2000; FIRMO et al., 2011). Entretanto, após a revolução industrial a medicina priorizava o uso dos medicamentos sintéticos. O desenvolvimento tecnológico permitiu a produção em grande escala de drogas sintéticas, mesmo que derivados mais puros e concentrados das plantas tenham se tornando disponíveis (BRATMAN, 1998; SIMÕES; SCHENKEL; SIMON, 2001; FIRMO et al., 2011). Métodos terapêuticos baseados na fitoterapia e utilizados durante séculos, acabaram se tornando ultrapassados e/ou inadequados, sendo adaptadas ou substituídas pela medicina convencional (NANYINGI et al., 2008).

Mas no século XX, crises econômicas explodiram nos países subdesenvolvidos, provocando altos índices de pobreza e dificuldade no acesso aos medicamentos, fazendo com que houvesse a retomada do uso das plantas (HERSCH-MARTÍNEZ, 1995; SOUZA; FELFILI, 2006; FIRMO et al., 2011). Mesmo com várias plantas sendo citadas devido ao efeito medicinal, poucas destas realmente possuíam eficácia comprovada na época (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007; FIRMO et al., 2011). Necessitou-se que a ciência atuasse na validação das possíveis propriedades farmacológicas, através de testes pré-clínicos e clínicos, que buscassem identificar os constituintes bioativos envolvidos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

No ano de 1972, a valorização das plantas medicinais e fitoterápicos começaram a ser discutidas em conferências internacionais, proporcionando novos rumos à fitoterapia (RIBEIRO, 2019). Dados divulgados pela OMS ao final da década de 1980, revelaram que 80% da população mundial, em especial dos países tropicais e subdesenvolvidos, faziam uso de recursos naturais para o tratamento de patologias. Em sua maioria, utilizavam plantas em chás, decocções, lambedores, infusões, entre outros (SOUZA; RODRIGUES, 2016).

No Brasil, tudo se iniciou com os movimentos em prol da Reforma Sanitária, no final da década 1970 (SAAD; LIMA, 2010; CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

O uso de plantas com ação medicinal, por muitas vezes é a única alternativa terapêutica para populações mais vulneráveis. Os movimentos buscavam a democratização e a abrangência para saúde básica, permitindo que práticas tradicionais fossem integradas a medicina. Com isso, os órgãos começaram a apoiar políticas públicas nacionais voltadas para o uso de terapias complementares. As medidas adotadas começaram a abrir caminhos para que estudos científicos fossem desenvolvidos, com o objetivo de garantir a segurança, eficácia e qualidade dos insumos utilizados (SAAD; LIMA, 2010; CASTRO; CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

O governo brasileiro criou programas com o intuito de incentivar a fitoterapia, adotando técnicas integrativas dentro do sistema oficial de saúde (RIBEIRO et al., 2019). Com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares da Saúde (PNPICS), estabeleceu-se a associação entre as práticas da medicina tradicional e medicina alternativa (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019). O uso das chamadas “drogas vegetais” era regulamentado dentro do SUS através do uso de folhas, cascas, raízes ou flores, como alternativas terapêuticas (FLOR; BARBOSA, 2015; FERNANDES et al., 2019).

A fitoterapia se tornou alvo de interesse popular e institucional, proporcionando novos rumos dentro da saúde pública, estabelecendo o Brasil como uma referência mundial (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019). Por possuir referências fortes da cultura indígena, africana e europeia, muitos estudos utilizaram a cultura fitoterápica do Brasil como base (SOUZA; RODRIGUES, 2016). O conhecimento popular de quem convive intimamente com a natureza é essencial para a exploração das potencialidades terapêuticas das plantas, mantendo vivo a experimentação sistemática e constante (ELISABETSKY, 1997; FIRMO et al., 2011). Muitas pesquisas integrativas foram realizadas para que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovasse a produção de medicamentos fitoterápicos (BOXALL et al., 2006; ANAND et al., 2019).

Para Petrovska (2012), a ciência tem o papel de comprovar a eficácia e a segurança das plantas utilizadas como medicamentos. A descoberta de compostos medicinais derivados de plantas deve reunir evidências atualizadas sobre a presença dos compostos bioativos e a segurança para o uso medicinal

(BUKAR et al., 2016; CARDOSO et al., 2019). Além disso, deve criar campos específicos para identificar as substâncias bioativas, permitindo isolar novas moléculas orgânicas de alta complexidade, que podem servir no tratamento de diversas doenças (PEREIRA; CARDOSO, 2012; CUNHA et al., 2016).

2.2.2 Metabolismo vegetal e os compostos secundários

Define-se “metabolismo” como conjunto dos processos químicos que ocorrem no interior do organismo. No caso das plantas, o metabolismo pode ser dividido em metabolismo primário, que inclui todos os processos e compostos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta. Já o metabolismo secundário, é caracterizado por apresentar substâncias envolvidas principalmente na adaptação ambiental (PEREIRA; DAS GRAÇAS, 2012; SIMÕES et al., 2017).

O metabolismo primário é semelhante para plantas, animais, humanos e microrganismos, devido as similaridades no código genético e o uso de ATP para armazenar e transferir energia. Existem, ainda, a presença de processos metabólicos similares e a capacidade de armazenamento de substâncias essenciais, como gorduras, carboidratos e proteínas. A partir da fotossíntese, respiração, absorção e assimilação de água e nutrientes, as plantas conseguem produzir macromoléculas essenciais para a sobrevivência, como proteínas e polissacarídeos, lipídios, ácidos nucleicos e clorofila. Essas substâncias desempenham função estrutural, plástica e de armazenamento de energia (KIRKBY; RÖMHELD, 2007; GROENIGEN et al., 2015).

Os metabólitos primários são os grandes precursores dos metabólitos secundários. Alguns aminoácidos produzidos no metabolismo primário são identificados nas estruturas de alcaloides e ácidos acéticos, incorporados durante a produção de terpenos e policetídeos. Mesmo que por muitas vezes os metabólitos secundários sejam referidos como subprodutos, estes compostos possuem alta especificidade. Evidências apontam grande importância no processo evolutivo das plantas, atuando na interação com outros organismos e o ambiente (RASKIN et al., 2002; BORGES; AMORIN, 2020).

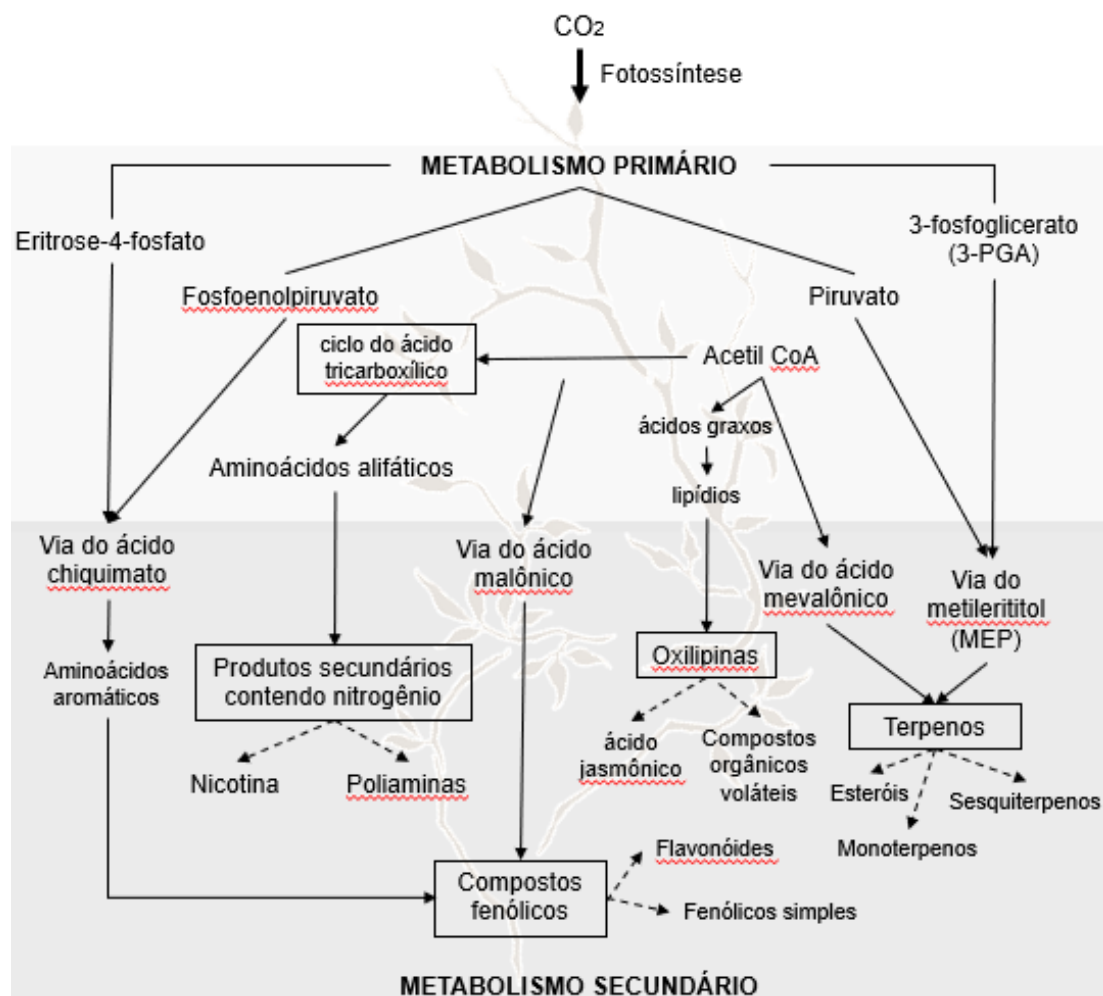
Para a planta, as principais funções atribuídas aos metabólitos secundários são a atuação na proteção contra herbívoros, radiação UV, estresse hídrico e alelopatia. De forma prática, eles reutilizam a energia e moléculas produzidas durante reações anabólicas e catabólicas da célula no metabolismo

primário. São gerados compostos quimicamente heterogêneos com atividade biológica, responsáveis por atrair polinizadores, atuar na sinalização intraespecífica, dentre outras funções (CARDOSO et al., 2019).

Os metabólitos secundários são chamados de princípios ativos vegetais, e são encontrados em diversos produtos e usados em terapias. Podem ser comuns a algumas plantas ou exclusivos para uma determinada família, gênero ou espécie (CHEN et al., 2011). Frequentemente, são utilizados para caracterização de um grupo de plantas, de modo que os produtos do metabolismo secundário sofrem a influência direta da adaptação da planta aos fatores bióticos e abióticos do ambiente (GLOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Com a impossibilidade de locomoção, as plantas desenvolveram formas para se adaptarem, sem correr o risco de comprometer suas células ou os seus processos fisiológicos primários. Por isso, os metabólitos secundários sofrem influência direta das variações de luz, temperatura, solo e água (ISAH, 2019, BORGES; AMORIN, 2020). As vias metabólicas possuem importante papel na identificação das diferentes classes dos metabólitos secundários. Seu funcionamento é multidirecional, na qual uma única rota metabólica pode ser utilizada de formas diferentes (Figura 2), e substâncias podem ser resultado da combinação de duas vias diferentes (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Figura 2. Relações biossintéticas entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário das plantas.



Adaptado de: Sinha et al., 2019

A presença das vias intermediárias está estritamente ligada a diversidade dos compostos secundários (CHEN et al., 2011). A partir de estudos fitoquímicos realizados até o presente momento, identificou-se a existência de mais de 100.000 mil metabólitos. Deste modo, ao longo dos anos, os metabólitos secundários foram organizados de acordo com as suas estruturas químicas. Como principais classes, são citados os compostos terpenos/terpenoides fenólicos/fenóis e os compostos nitrogenados (BARTWAL et al., 2013; CUNHA et al., 2016).

Os terpenoides são a classe mais variada de metabólitos, possuindo cerca de 55.000 terpenoides já identificados, distribuídos de forma ampla no reino vegetal. Esta classe é formada a partir da fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos (C5). A classificação é realizada pela quantidade de unidades C5, podendo ser monoterpenos (duas unidades C), sesquiterpenos (três unidades C5), diterpenos (quatro unidades C5), triterpenos (seis unidades C5),

tetraterpenos (oito unidades C₅) e os politerpenoides (mais de oito unidades C₅) (TAIZ; ZEIGER, 2009; SOUSA; SOUSA, 2017).

Os monoterpenos e sesquiterpenoides são compostos voláteis e com baixa massa molecular, muitas vezes citados como os compostos mais importantes do grupo dos terpenos. Os monoterpenos possuem diversas funcionalidades, como a atração de polinizadores e repelência de insetos, além das aplicações na indústria. Os sesquiterpenos por sua vez, podem atuar como fitoalexinas, possuindo ação antimicrobiana e propriedades no combate a herbivoria. Uma característica importante, é que os sesquiterpenos são produzidos imediatamente após a planta ser infectada por bactérias ou fungos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Para o grupo dos fenóis, quase todas as substâncias são derivadas da L-fenilalanina (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Apenas são chamados de compostos fenólicos aqueles que possuem pelo menos um anel aromático, em que o tipo e o número de anéis fenólicos são utilizados para a classificação como flavonoides ou não flavonoides. Seus compostos são responsáveis pela defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, proteção UV, atração de polinizadores, além de conferir sabor, odor e coloração para várias plantas (FARAH; DONANGELO, 2006; SILVA et al., 2013; SOUSA; SOUSA, 2017).

Estando presentes em 20% das plantas vasculares, o grupo dos compostos nitrogenados são divididos em alcaloides, glicosídeos, cianogênicos e glucosinolatos (TAIZ; ZEIGER, 2009; SOUSA; SOUSA, 2017). Apresentam solubilidade em água e são compostos majoritariamente heretocíclicos, com pelo menos um átomo de nitrogênio na estrutura. As atividades biológicas estão envolvidas na defesa da planta contra herbívoros, apresentando também propriedades tóxicas e alucinógenas (GARCÍA; CARRIL, 2011).

A elevada importância comercial dessas moléculas desperta o interesse das indústrias agronômicas, alimentícias e farmacêuticas para a caracterização química (OOTANI et al., 2013). Devido à grande diversidade estrutural, os metabólitos secundários constituem-se com uma importante fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos produtos (SAKLANI; KUTTY, 2008; LIMA et al., 2018). Seus compostos são fontes promissoras para o isolamento de novas moléculas, diante da utilidade e diversidade dos seus compostos bioativos (OOTANI et al., 2013).

Os estudos com os óleos essenciais se destacam, proporcionando benefícios únicos e ilimitadas possibilidades de aplicação. Os óleos são utilizados extensamente na aromaterapia, culinária e higiene pessoal (DOMINGOS; BRAGA, 2014). Contudo, a utilização dos óleos essenciais não se limita apenas em promover o bem-estar mental, físico e emocional (BAKKALI et al., 2008; SOUZA et al., 2020). Seus compostos complexos demonstram propriedades úteis para a saúde, servindo como uma alternativa complementar ou direta, no tratamento de doenças anti-inflamatórias, antiasmáticas, ansiolíticas e carcinogênicas (SOUZA et al., 2020)

2.2.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, sendo compostos lipofílicos de baixa massa molecular. Apresentam solubilidade reduzida em água, mas são solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, clorofórmio e etanol (SANTOS et al., 2021). Estes compostos podem ser descritos ainda como líquidos voláteis a temperatura ambiente, com odor característico e coloração amarelada ou incolor, raramente coloridos (SIMÕES et al., 2017).

As plantas produzem os óleos essenciais como método de proteção química e atração de polinizadores (PAULO et al., 2001). Funções ecológicas, como a atuação na inibição da germinação, proteção contra a perda de água e o aumento da temperatura, podem ser atribuídas aos óleos. Contudo, diferenças quanto as propriedades físico-químicas, composição e aroma podem ocorrer dentro de uma mesma espécie. Isso ocorre em resposta a sazonalidade, condições de clima e solo, época de coleta e estágio de maturação (BAKKALI et al., 2008; BENDAOU et al., 2009).

Os óleos são substâncias resultantes das principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários. Podem ser constituídos por terpenos (em especial monoterpenos e sesquiterpenos) e seus derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, fenóis e óxidos), além de cumarinas e ácidos orgânicos (SIMÕES; SPITZER, 2010). A biossíntese e armazenamento ocorrem em células e glândulas especializadas, localizadas dentro de diferentes órgãos da planta, como por exemplo o caule, ramo, semente, fruto, raiz, casca e botões florais (SIMÕES et al., 2017).

A elucidação do perfil químico dos óleos essenciais é imprescindível para comprovar sua atividade biológica (JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005). Durante a extração, algumas questões podem influenciar na composição, devendo então ser adotada a metodologia adequada para tipo material vegetal e os metabólitos de interesse (JARDINI; MANCINI, 2007; COSTA; HOSCHEID, 2018). Para isso, os métodos empregados, a quantidade material vegetal de interesse e o solvente extrator devem ser adequados para cada planta (JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005).

Após a extração do óleo de interesse, a próxima etapa refere-se aos métodos de elucidação estrutural e caracterização dos seus constituintes. Para esse fim, as técnicas de cromatografia e espectroscopia evoluíram paralelamente. A contribuição para os avanços nos estudos de produtos naturais, possibilitou o isolamento e identificação de metabólitos secundários (JÚNIOR; DE SOUZA; CHAVES, 2005). Essas técnicas são empregadas em análises físico-químicas, com o objetivo de separar e/ou purificar misturas complexas (NASCIMENTO et al., 2018).

Collins et al. (2010) e Oliveira & Silva (2018), descrevem que a cromatografia é baseada na distribuição dos componentes da mistura em duas fases, no qual uma fase se move através da outra. Durante a migração da fase móvel através da fase estacionária, os componentes se distribuem seletivamente, resultando em migrações diferenciais. Com isso, é possível traçar o perfil químico de óleos essenciais pelas diferentes técnicas de cromatografia, como a cromatografia líquida clássica (CLC) com sílica gel, cromatografia gasosa (CG), cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de exclusão molecular (CEM) e a cromatografia em camada delgada (CCD) (SULEIMAN, 2015).

Tratando-se da espectroscopia, a técnica permite a visualização das interações moleculares em função da frequência ou comprimento de onda. O resultado de tal interação permite pressupor informações analítica na estrutura atômica ou molecular da matéria. As técnicas espectroscópicas são aplicadas de acordo com o material analisado, podendo optar pela espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de ultravioleta (UV). O uso desses métodos em análises fitoquímicas contribuem para detecção de compostos bioativos que são isolados, identificados e quantificados, utilizando técnicas hifenadas ou acopladas, como CLAE/UV,

CLAE/EM, CLAE/RMN e CG/EM (BANDEIRA et al., 2002; QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006; SULEIMAN, 2015).

Existem mais de 3.000 substâncias já identificadas nos óleos essenciais, em que uma única planta pode apresentar de 20 a 200 compostos diferentes (SIMÕES et al., 2017). Chen et al. (2011) explicam que o princípio ativo que proporciona a ação farmacológica atribuída as plantas são resultado da mistura dessas substâncias. Estes constituintes podem ser classificados conforme a sua concentração na composição geral do óleo, podendo ser os constituintes majoritários (20-95%), secundários (1-20%) ou componentes-traço (abaixo de 1%) (SIMÕES et al., 2017).

Bassolé & Juliani (2012) descrevem que os compostos presentes nos óleos essenciais podem ter interações indiferentes, aditivas, antagônicas ou sinérgicas. O efeito indiferente refere-se à ausência de interação entre os compostos; por outro lado, o sinergismo é atribuído quando o efeito combinado das substâncias é maior do que a soma dos efeitos individuais. Para o efeito aditivo, o efeito dos compostos combinados é igual à soma dos efeitos individuais. Já o antagonismo, é observado quando o efeito de um ou ambos os compostos são menores quando são aplicados juntos do que quando aplicados individualmente (NYCHAS, 1995; BURT, 2004; DELGADO et al., 2004; PEI et al., 2009; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

As diferentes interações entre os metabólitos secundários provavelmente é uma estratégia adaptativa de defesa das plantas. A planta pode utilizar várias combinações de compostos químicos com uma maior eficiência e em concentrações mais baixas, ou através do acúmulo de um composto defensivo em altas concentrações (NELSON; KURSAR, 1999; RYABUSHKINA, 2005). Efeitos sinérgicos podem surgir pela conversão de compostos inativos em ativos após sua interação com um alvo, por uma maior disponibilidade de alvos, por transporte facilitado ou outros mecanismos (RYABUSHKINA, 2005).

O princípio da fitoterapia é baseado nos efeitos sinérgicos e antagônicos dos compostos bioativos. A diversidade estrutural dos compostos contribui de forma positiva para a existência de diferentes mecanismos de ação. Isso pode ser uma estratégia para alcançar máxima resposta farmacológica e redução da resistência (TOMÁS MENOR et al., 2015).

Os alcaloides, flavonoides e os terpenos são os compostos mais citados com os princípios ativos responsáveis pelo efeito medicinal em humanos

(BAKKALI et al., 2008). Essas classes representam compostos com ampla diversidade estrutural, muitos dos quais possuem atividade antimicrobiana, inseticida, antiviral, antifúngica e antiparasitária (GARCÍA; CARRIL, 2009; CHEN et al., 2011). Durante anos, pesquisas trazem informações sobre as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, mas apenas recentemente a atividade está sendo realmente comprovada (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014). Rios & Recio (2005) relatam que, vários estudos vêm abordando sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, óleos essenciais e seus compostos isolados.

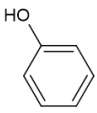
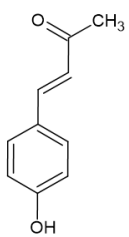
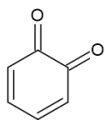
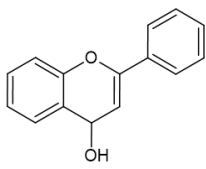
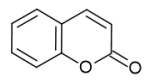
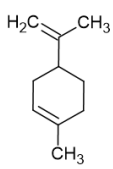
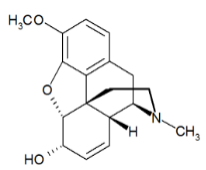
2.2.3.1 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

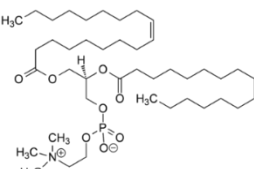
O termo antibiótico foi utilizado pela primeira vez em 1942 por Waksman, nomeando compostos de origem natural ou sintética, que em pequenas concentrações possuíam atividade contra microrganismos (CORRÊA, 2004). Para Murray et al. (2002), mesmo que existam diferentes mecanismos de ação, todos os antimicrobianos devem apresentar propriedades comuns. As propriedades envolvem possuir amplo espectro de ação, toxicidade seletiva e mecanismo de ação específico, atuando de forma diferente nas células-alvo, necessitam estar presentes (MURRAY et al., 2002).

Plantas nativas e exóticas são utilizadas em comunidades como profiláticos naturais para diversas doenças, como leishmaniose, malária, esquistossomose, além das infecções fúngicas e bacterianas (BUSSMANN, 2002). Pesquisas com plantas têm crescido em nosso país, trazendo informações técnico-científicas, associados ao fator da grande biodiversidade nos biomas brasileiros e diversidade dos produtos secundários produzidos interesse (JARDINI; MANCINI, 2007; COSTA; HOSCHIED, 2018; MEOTTI et al., 2021).

Duarte (2006) cita os terpenoides, timol, carvona, carvacrol, mentol e eucaliptol, como os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Outros compostos que possuem ação antimicrobiana são os taninos e flavonoides, que provavelmente conseguem inativar enzimas, formar complexos com proteínas solúveis e com a parede celular bacteriana (NELSON et al., 1997) (Quadro 2). Mesmo que estes compostos demonstrem atividade quando estão isolados, por muitas vezes os constituintes ativos dos óleos

essenciais possuem efetividade devido a ação sinérgica de vários compostos (MILLEZI et al., 2014).

Quadro 2. Principais classes de compostos antimicrobianos de plantas e seus possíveis mecanismos de ação			
Compostos orgânicos	Mecanismos de ação	Estrutura química	Autores
Fenóis simples	Inibição enzimática		Sá Azevedo et al., 2011 Spézia et al., 2020
Ácidos fenólicos	Ruptura de membrana		Mekinić et al., 2014
Quinonas	Inativação enzimática, ligação a adesinas de superfície		Dey; Ray; Hazra, 2014
Flavonas, Flavonoides e Flavonóis	Inativação enzimática, ligação com proteínas extracelulares ou com a parede celular bacteriana		Bylka; Matlawska; Pilewski, 2004 Coppo; Marchese, 2014
Cumarinas	Interação com o DNA eucariótico		Souza; Delle Monache; Smânia 2005
Terpenoides e óleos essenciais	Ruptura de membrana		Guimarães et al., 2019
Alcaloides	Se intercalar na parede celular e / ou DNA		Cushnie; Cushnie; Lamb, 2014

Lectinas e polipeptídeos	Formação de canais iônicos na membrana microbiana		Breitenbach et al., 2018
--------------------------	---	--	--------------------------

Por conta das características lipofílicas, presume-se que os óleos essenciais se acumulam na membrana, promovendo a perda de energia pelas células, aumento de permeabilidade e coagulação do citoplasma (DUARTE, 2006). Para as bactérias, a permeabilidade da membrana citoplasmática está relacionada com a sobrevivência. Através da membrana é possível regular o ATP, pH interno, potencial elétrico e a perda de metabólitos e íons, como o potássio e o fosfato. Com isso, os danos estruturais na membrana levam as disfunções na barreira seletiva, local de ação enzimática e geração de energia (BURT, 2004; QUEIROZ et al., 2014). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é determinada pela menor quantidade de óleo, que consegue inibir o desenvolvimento microbiano (OSTROSKY et al., 2008).

Para isso, técnicas de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição, investigam novos compostos com atividades farmacológicas. Realiza-se o *screening* do potencial antimicrobiano das plantas e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, concentração mínima que um extrato ativo de planta é capaz de inibir a proliferação de microrganismos. Testes para determinar a atividade dos antimicrobianos convencionais, seguem a metodologia padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Contudo, para óleos essenciais e extratos vegetais, as suas propriedades químicas não permitem que a metodologia postulada pelo CLSI seja seguida de forma integral, necessitando de adaptações (OSTROSKY et al., 2008).

Para a determinação da CIM de óleos e extratos, é necessário considerar a origem da planta, época da coleta, condições de preparo do material, microrganismos e cepas utilizadas, não existindo uma metodologia padrão (NASCIMENTO et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008). Mesmo assim, alguns óleos essenciais são estudados na elaboração de produtos conservantes, desinfetantes, sanitizantes e inseticidas (MELLO et al., 2014; PEREIRA et al., 2014). Segundo Lee & Park (2015), os óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana comprovada, podendo ser uma alternativa viável. Os seus

compostos bioativos são reconhecidos como substâncias seguras para saúde humana, animal e para o meio ambiente.

A preocupação com o meio ambiente e o consumo crescente de produtos naturais, está abrindo espaço para o incentivo de novas tecnologias que produzam sanitizantes e conservantes naturais menos agressivos (HRUDEY et al., 2015). Alguns óleos essenciais estão sendo estudados e aplicados na indústria alimentícia, com a substituição parcial ou total de conservantes químicos (MONTES; NETA; CRUZ, 2014). Muitas plantas utilizadas para dar sabor aos alimentos possuem óleos essenciais com ação antibacteriana e antioxidante. Esses óleos podem ser aplicados na conservação de alimentos, diminuindo a concentração de aditivos sintéticos (HONORATO et al., 2013) e controlando o crescimento de microrganismos patogênicos (KNAAK; FIUZA, 2010).

Algumas plantas condimentares, utilizadas como especiarias, temperos ou ervas, produzem substâncias com efeito bacteriostático ou bactericida (MENDES et al., 2011; RIBEIRO, et al., 2012; BAPTISTA, 2017). Plantas condimentares demonstram suscetibilidade satisfatória, podendo inibir o crescimento bacteriano e a formação de biofilme por diferentes mecanismos (TEGOS et al., 2002; BAKKALI et al., 2008; CHORIANOPOULOS et al., 2008; SAKARIKOU et al., 2020). Mesmo que os mecanismos de ação dos óleos e seus metabolitos secundários em bactérias e biofilmes ainda não estejam totalmente elucidados, sabe-se que muitos compostos interferem na estrutura da parede celular microbiana ou *quórum sensing* microbiano (SIMÕES et al., 2009; AHMAD et al., 2011).

De fato, durante toda a evolução do processo de formação do biofilme, os OE exercem atividade antimicrobiana nas células planctônicas e sésseis (SERIO et al. 2010; ZHANG et al. 2016; ROSSI et al., 2020). É possível que os compostos bioativos das plantas condimentares atuem na “comunicação” célula-célula, impedindo a formação de biofilmes robustos e induzindo a dispersão celular (SIMÕES et al., 2009; AHMAD et al., 2011). Os efeitos das plantas condimentares e seus óleos essenciais, são relatados em pesquisas que destacam o interesse renovado no uso de especiarias como agentes antibacterianos (OATTARA et al., 1997; TRAJANO et al., 2009). Como consequência da tendência atual do “Consumo Verde”, busca-se por alimentos com menos aditivos sintéticos (HOLLEY; PATEL, 2005).

2.2.4 Plantas Condimentares

O termo “plantas bioativas” refere-se a plantas que possuem substâncias que exercem alguma ação sobre outros seres vivos, sejam eles animais, vegetais ou humanos. Dentro da definição, as plantas são classificadas como medicinais, aromáticas e condimentares, podendo uma única planta acumular mais de uma classificação (SILVA et al., 2013). O termo condimento, por sua vez, é definido como uma substância, normalmente de origem vegetal, que pode ser adicionada ao alimento para ressaltar o sabor (HOUAIS, 2009).

O uso de plantas condimentares e seus derivados é uma prática milenar, por conferir sabor e aroma diferenciados aos alimentos (KIM et al., 1995; TRAJANO et al., 2009). De acordo com Montebello (2013), a maioria dos condimentos tem propriedades nutraceuticas e medicinais. Além da aplicabilidade medicinal, as plantas eram utilizadas para melhorar os aspectos organolépticos de carnes durante seu armazenamento, principalmente em locais de clima quente, onde não havia refrigeração (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999; TRAJANO et al., 2009).

Aplicações como profilático e conservantes são atribuídas as plantas condimentares (NEPOMUCENO, 2014; KINUPP; LORENZI, 2014). Uma das principais características dessas plantas é a riqueza em óleos essenciais e substâncias aromáticas. Seu uso permitiria acesso fácil e barato a medidas profiláticas e conservantes eficientes, quando comparados aos métodos convencionais (CARDOSO et al., 2019). Para isso, pesquisas precisam aproximar o conhecimento científico do conhecimento popular, possibilitando a aplicação de plantas utilizadas na culinária e estimulando o consumo sustentável dos recursos naturais (LEITE, 2009; TONIN et al., 2020).

Hughenoltz & Smid (2002) descreveram que alguns estudos buscam relacionar os hábitos alimentares de diferentes populações com a incidência de certas doenças. Estes estudos epidemiológicos demonstraram as primeiras evidências sobre os benefícios que alguns alimentos têm para a saúde, a partir do que o termo nutraceutico poderia ser aplicado ao alimento e componentes alimentícios que também possuem algum efeito medicinal. Seu efeito pode variar desde o suprimento de minerais e vitaminas essenciais, até a proteção contra doenças infecciosas (HUGENHOLTZ; SMID, 2002).

As plantas condimentares são conhecidas por conter substâncias que retardam o crescimento microbiano, ou até mesmo exercer total supressão da população microbiana (GERHARDT, 1990; KRAMER, 1997; TRAJANO et al., 2009). Muitas plantas têm demonstrado potencial como fonte natural de agentes antimicrobianos e conservantes de alimentos, podendo ser aplicados para inibir o crescimento de bactérias de origem alimentar (OUSSALAH et al., 2006). Com a comprovação do uso farmacológico e médico, os condimentos poderiam agregar mais valor aos alimentos (FURLAN, 2007; RODRIGUES; CARVALHO; WIEST, 2011).

Com o intuito de suprir a demanda *in natura*, na maioria dos casos as plantas condimentares são comercializadas em pequenas quantidades, tendo como exemplo as espécies: alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.); cebolinha verde (*Allium schoenoprasum* L.); salsa (*Petroselinum sativum* H.); alho (*Allium sativum* L.); manjerona (*Origanum manjorana* L.); manjericão (*Ocimum basilicum* M.); orégano (*Origanum vulgare* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). E mesmo que existam alguns aspectos negativos com relação à cadeia de comercialização dos fitoterápicos, é inegável seu potencial econômico (CARVALHO; CRUZ; WIEST, 2005).

2.2.4.1 *Rosmarinus officinalis* L.

O *R. officinalis* L. é uma planta aromática pertencente à família das Lamiaceae, nativa do Sul da Europa, Mesopotâmica, Norte da África (PORTE; GODOY, 2001) e Ásia (SATYAL et al., 2017^b). Identificada por Carl Linnaeus, o *R. officinalis* extensamente utilizado nas indústrias de higiene, perfumaria e alimentícias, por apresentar aroma refrescante e valor econômico acessível. No alimento, além do sabor e textura proporcionados pelo óleo, seu papel como conservante é um grande diferencial (PORTE; GODOY, 2001; HERNÁNDEZ et al., 2016).

Popularmente conhecida como alecrim, alecrim-de-horta ou alecrim-de-cheiro, a planta é descrita como um arbusto perene e denso, que pode atingir entre 1-3 m de altura (SILVA, et al., 1995; AL-SEREITI MR; ABU-AMER KM; SEM, 1999; WHO, 2002; ARANTES et al., 2016; ANDRADE et al., 2018). Possui folhas ramificadas, semelhantes a agulhas (Figura 3), com cerca de 1-4 cm de comprimento e 2-4 mm de largura, sésseis, coriáceas e com bordas curvas (WHO, 2002; FARCACOPÉIA PORTUGUESA, 2003; BEGUM et al., 2013;

SATYAL et al., 2017^b; ANDRADE et al., 2018). Suas flores perenes são pequenas, podendo ser azuis ou brancas, possuindo hastes lenhosas (CUTRIM, 2019), com ramos castanhos e eretos (BORGES et al., 2019).

Figura 3. *Rosmariuns officinalis* L. *in natura*.



Fonte: Aurora (2021)

A planta é cultivada em vários locais temperados e tropicais ao redor do mundo (SATYAL et al., 2017^b). O óleo essencial do alecrim é incolor ou amarelo claro, com aroma característico de cânfora, podendo ser obtido através da extração realizada com folhas, raízes, caules ou flores (CUTRIM, 2019). Segundo Andrade et al. (2018), os métodos de extração devem ser aplicados nas partes mais ativas da planta, para a obtenção dos compostos biologicamente ativos do alecrim. O óleo apresenta compostos hidroxilados, carbonilados, fenólicos e monoterpênicos (RIBEIRO et al., 2012).

Cerca de 150 substâncias já foram identificadas no alecrim, dentre as quais o α -pineno limoneno, mirceno e o 1,8 cineol como os mais comuns (LUCHESE, 2017). O 1,8-cineol, a cânfora e o α -pineno são citados como responsáveis pela ação farmacológica (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2016; BORGES et al., 2019; BORGES et al., 2019). As atividades biológicas do óleo de *R. officinalis* são atribuídas ao efeito somatório de diversas substâncias presentes na composição química (SATYAL et al., 2017^b). Na farmacologia, pode ser empregado *in natura* no preparo de infusões ou na aromatização de fórmulas destinadas ao uso oral (CUTRIM et al., 2019).

As atividades antiparasitária, antisséptica e antimicrobiana estão relacionadas com os seus compostos bioativos (AL-SEREITA; ABU-AMERB; SENA, 1999; ARANTES et al., 2016). Na medicina tradicional, o alecrim é empregado no tratamento de doenças intestinais, respiratórias, hepáticas e renais, além de servir como antidepressivo natural e cicatrizante (LIMA et al., 2014; CUTRIM et al., 2019). Em revisão, Begum et al. (2013) citam efeito do óleo essencial no tratamento de feridas e erupções cutâneas, dor de cabeça, dispepsia, problemas de circulação. Possui, também, propriedades expectorantes, diurética e antiespasmódico na cólica renal (HABTEMARIAM, 2016; KAYASHIMA; MATSUBARA, 2012; NIETO ROS CASTILLO, 2018).

O *R. officinalis* produz substâncias antimicrobianas a partir do seu metabolismo secundário, que servem também para defesa contra herbivoria, patógenos e predadores (DOUGHARI, 2012; ANDRADE et al., 2018). Registra-se a atividade antibacteriana do óleo essencial para *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* (BURT, 2004; BAJPAI et al., 2012; LUCHESI, 2017; NIETO ROS CASTILLO, 2018), podendo ainda apresentar efeito modulador e sinérgico com antimicrobianos convencionais, trazendo novas alternativas para o combate a resistência (PANIZZA; VEIGA; ALMEIDA, 2012; OLIVEIRA; VEIGA, 2019).

2.2.4.2 *Zingiber officinale* Roscoe

O *Z. officinale* é uma planta nativa da Índia e das florestas tropicais do sudoeste da Ásia. A planta inserida na família Zingiberaceae é conhecida como uma das especiarias mais utilizadas para condimentos e tratamentos de doenças (AYSE et al., 2008; KUMAR et al., 2011; GRANDIS et al., 2015). Seu rizoma contém cerca de 60 – 70% de carboidratos, 3 – 8% de fibra bruta, 9% de proteína, 2 – 3% de óleo volátil e 4 – 7% de oleoresinas (LIMA et al., 2014; MAJOLO et al., 2014).

Identificada pela primeira vez por William Roscoe em 1807, *Z. officinale*, popularmente conhecido como gengibre, é descrito como uma monocotiledônea de rizoma perene, articulado, reptante, anguloso, bastante ramificado, de 1-2 cm espessura (Figura 4), podendo atingir 1,5 m de altura. Suas folhas hermafroditas são dísticas, com cerca de 28 cm de comprimento, 3 cm de espessura, como um limbo lanceolado (GRANDIS et al., 2015; BARRETO; TOSCANO; FORTES, 2011; CARDOSO et al., 2018).

Figura 4. *Zingiber officinale* Roscoe in natura.



Fonte: Autora (2021)

As propriedades organolépticas que conferem ao gengibre sabor e aroma característico são atribuídas ao óleo essencial, que são ricos em monoterpenos e sesquiterpenos. Os principais componentes do óleo essencial de gengibre são o d-canfeno, zingibereno, cineol e o gingerol que, por muitas vezes, são os responsáveis pelas propriedades farmacológicas (OLIVEIRA, 2003; LIMA et al., 2014; RODRIGUES; LIRA, 2013; SOUSA et al., 2019). O óleo essencial possui grande importância na área alimentícia, farmacêutica, cosmética e química, em virtude das propriedades aromatizantes, antibacterianas antifúngicas (MESOMO et al., 2013; JAKRIBETTU et al., 2016).

Em ensaios laboratoriais, os compostos extraídos do gengibre demonstraram atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiúlcera, antináusea e antimutagênica (SINGH et al., 2008; SIVASOTHY et al., 2011; GRANDIS et al., 2015). Outros autores citam o potencial em combater problemas gastrointestinais, ação diurética e hepatoprotetora (NICÁCIO et al., 2018). O uso da planta se torna muito atrativo, de modo que a baixa toxicidade permite o amplo uso (COWAN, 1999; AZADPOUR et al., 2016). O *Z. officinale* apresenta atividade antimicrobiana direta, podendo ser aplicado no tratamento de infecções bacterianas, como fontes alternativas na busca de inibidores naturais de microrganismos patogênicos (TAN; VANITHA 2004; SINGH; MOSES; DAVID, 2018).

Em pesquisas já realizadas, os efeitos bactericida e bacteriostático do *Z. officinale* são registrados para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RAHMANI; SHABRMI FMA; SALAH, 2014; SOUSA et al., 2019). O óleo essencial e extratos de gengibre, demonstra excelente atividade antimicrobiana sobre a formação do biofilme, culturas planctônicas super-resistentes e inibição de fatores de virulência (YAHYA; SAIFUDDIN; HAMID, 2013; CHAKOTIYA et al., 2017).

2.2.4.3 *Allium sativum* L.

O *A. sativum* L. está inserida na família Amaryllidaceae, reconhecida como uma das herbáceas mais antigas cultivadas pela humanidade (LUCINI, 2008; SILVA et al., 2019). Registada pela primeira vez por Linnaeus em 1753, provavelmente tem origem nas regiões de zonas temperadas da Ásia central e ocidental (CUNHA et al., 2006). O alho é descrito com folhas lanceoladas, que formam o pseudocaule e as gemas do caule formam os bulbilhos (dentes) (Figura 5), podendo atingir 0,40-0,70 m de altura (HARVEY, 1995). As flores são reunidas em umbela branca ou vermelhadas longo-pendunculada (LORENZI; MATOS, 2002; CALDAS et al., 2019).

Figura 5. *Allium sativum* L. *in natura*.



Fonte: Autora (2021)

A parte mais utilizada do alho são os bolbilhos, que possuem sabor e aroma característicos, originários do processo de hidrólise de alguns dos seus componentes (CUNHA et al., 2009). As plantas pertencentes ao gênero *Allium* são ricos em aminoácidos, minerais, flavonoides, fibras, compostos fenólicos (BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007; GUILLAMÓN, 2018) e vitaminas, principalmente complexo B e C (CUTLER; WILSON, 2004; FONSECA, et al., 2014). O alho apresenta ampla distribuição geográfica e grande importância econômica, sendo a quarta hortaliça mais importante do Brasil (LUCINI, 2008; SILVA et al., 2019).

A maioria dos constituintes fitoquímicos com atividade terapêutica estão localizados nos bolbilhos (CUTLER; WILSON, 2004; FONSECA, et al., 2014). Cerca de 53 compostos químicos já foram identificados a partir do seu óleo essencial. Em sua maioria, o ajoeno, alicina e aliina e derivados orgânicos do enxofre estão presentes como um dos compostos majoritários. Devido à natureza volátil, estes compostos estão relacionados aos mecanismos de defesa, sendo liberados em resposta a danos celulares e lesões nos tecidos das plantas (LORENZI; MATOS, 2002).

Desde os tempos mais remotos, existem registro do seu uso medicinal e alimentício (MOTA et al., 2005; FONSECA, et al., 2014). O alho é uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos totais presentes na dieta humana. Porém,

não é apenas utilizado como condimento, tendo seu potencial terapêutico reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o tratamento de feridas, infecções, gripe e úlcera (LANZOTTI et al., 2014; BORLINGHAUS et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

Em revisão realizada por Corzo-Martínez et al. (2007), os autores citam as propriedades farmacológicas de *A. sativum*, que apresenta tratamento e prevenção de algumas doenças no trato digestivo/intestinal, renal e respiratório. Seus componentes ativos demonstram potencial ação no tratamento da diabetes, hipertensão arterial, além de atividades anticarcinogênicas e quimio-preventivas.

Os metabólitos secundários se concentram nos bulbos, e podem estar relacionados à atividade antimicrobiana do alho. Compostos como as cumarinas, alcaloides, taninos, flavonoides estão quase sempre presentes (FELIX; MEDEIROS; MEDEIROS, 2018). Outros importantes componentes são os compostos organossulfurados, que apresentam concentração três vezes maior do que em outros vegetais (CUTLER; WILSON, 2004; FONSECA, et al., 2014).

Os organossulfurados também estão presentes em concentrações expressivas na cebola, repolho, couve, couve-flor, couve de Bruxelas e entre outros (VERHOEVEN et al., 1996). No alho, os organossulfurados determinam o cheiro e sabor, sendo os grandes responsáveis pelas propriedades bioativas atribuídas à sua ingestão, por apresentar propriedades funcionais importantes na prevenção ou retardamento de processos patológicos (PACHECO; SGARBIERI, 2001; BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007; GUILLAMÓN, 2018). Dentre os organossulfurados, a alicina é responsável pela maioria das propriedades farmacológicas da planta (ELLMORE; FELDBERG, 1994; SILVA, 2009).

Estudos evidenciam o efeito do alho como antibacteriano, antifúngico, antiviral e antiprotzoário (RAHMAN; LOWE, 2006; ALMEIDA et al., 2013). O alho é especialmente ativo no tratamento de infecções, sendo uma alternativa como fitoterápico utilizados no combate de cepas resistentes. Ele pode atuar de forma independente ou em associação com os antimicrobianos sintéticos (SOUZA; SOARES, 2014; FELIX; MEDEIROS; MEDEIROS, 2018).

O espectro de ação do alho é atribuído a alicina, sugerindo que as propriedades antimicrobianas estejam relacionadas a interações específicas com o grupo tiol dos microrganismos (FELIX; MEDEIROS; MEDEIROS, 2018). O composto pode levar à inibição da proliferação de microrganismos de forma

definitiva, possuindo eficácia comparada com antibióticos convencionais, tais como β -lactâmicos ou aminoglicosídeos (BORLINGHAUS et al., 2014). A alicina presente no alho é duas vezes mais eficiente que a própria alicina sintética, (FUJISAWA et al., 2009), agindo na destruição e inibição de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (WU et al., 2001; CALDAS et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de óleos essenciais extraídos de plantas condimentares como conservantes alimentares, através da avaliação dos efeitos antibacterianos e antibiofilmes de óleos essenciais.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a extração do óleo essencial *R. officinalis*, *A. sativum*, *Z. officinale* e calcular o rendimento do óleo essencial obtido;
- Caracterizar quimicamente as plantas *R. officinalis*, *A. sativum*, *Z. officinale* por técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas;
- Determinar as concentrações inibitórias e bactericidas mínima dos óleos essenciais das plantas selecionadas frente a bactérias de interesse alimentar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar *in vitro* o efeito dos óleos obtidos a partir de *R. officinalis*, *A. sativum*, *Z. officinale* na formação do biofilme das bactérias de interesse alimentar;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óleos Essenciais

4.1.1 Material vegetal e Extração do óleo

Para a extração dos óleos essenciais, folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), bulbos de *Allium sativum* (Alho) e rizomas de *Zingiber officinale* (gingibre), foram obtidos na feira de orgânicos do município de Natal/RN, em novembro de 2020. Após a obtenção do material vegetal, pesou-se 500g de cada material vegetal selecionado que, na sequência, foram submetidos ao processo de extração por hidrodestilação, utilizando 2L de água destilada, submetidos a aquecimento a 96 °C por 4 h, em aparelho do tipo Clevenger (Figura 6). A extração do óleo essencial foi realizado no no Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos Orgânicos (LISCO/UFRN).

Figura 6. Procedimento para a extração do óleo essencial de *R. officinalis* (1) Pesagem do material vegetal (2) extração do óleo essencial pela técnica de hidrodestilação (3) Aparelho de Clevenger acoplado ao balão volumétrico.



Fonte: Autora (2021)

Após a obtenção dos óleos, estes foram secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) (DINAMICA), para a retirada da água. Os frascos com os óleos essenciais foram pesados em balança analítica, para a determinação do rendimento de cada óleo (m/m), de acordo com a fórmula proposta por Santos et al. (2004):

$$To = \left(\frac{Vo}{Bm} \right) \times 100$$

O cálculo para a porcentagem do teor (T_o) dos óleos essenciais em base úmida é determinado pela relação entre o peso do óleo (V_o) e a biomassa vegetal (B_m) em gramas. Para o armazenado dos óleos essenciais, foram utilizados frascos âmbar de 5 mL e conservação a temperatura de 4 °C, para a preservação das características químicas até o seu uso.

4.1.2 Caracterização química

Para a caracterização química dos óleos essenciais (OE), foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG / MS), conduzida no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As análises foram realizadas utilizando GC/MS QP 5050^a (Shimadzu, Kyoto, Japão) e uma coluna capilar não polar Agilent DB-5ms (50 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A temperatura do forno foi programada a 60 °C com aumento de 4 °C/min até atingir 280 °C e depois mantida por 15 min. O gás hélio foi utilizado como gás portador, com uma taxa de fluxo constante de 1 mL/min.

A temperatura da fonte de ionização foi mantida a 280 °C, a energia de ionização a 70 eV e a corrente de ionização a 0,88 kV. Os espectros de massa foram registrados de 10 a 400 m/z . Em triplicatas, as amostras do OE foram dissolvidas em diclorometano. Os componentes individuais foram identificados comparando os índices de retenção e padrões de fragmentação com a biblioteca do espectrômetro e os dados da literatura de Adams (2017) e NIST (2005).

4.2 Atividade Antibacteriana

4.2.1 Microrganismos utilizados e condições de cultivo

As análises das atividades antibacterianas foram realizadas no Laboratório de Micobactérias (LABIMIC) da UFRN, no de dezembro de 2020 a junho de 2021. Os óleos essenciais foram testados contra cepas bacterianas ATCC (*American Type Culture Collection*), previamente padronizadas com relação a seu fenótipo bioquímico e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (LIN; CHANG, 2000). Foram selecionadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* (CCBH 5698) e a cepa clínica de *Salmonella* Typhimurium.

Os microrganismos são provenientes da coleção de culturas do LABIMIC, mantidos em ágar Mueller-Hinton (MHA) (HIMEDIA) em geladeira microbiológica em temperatura de 2 – 8 °C. Para a recuperação das estirpes bacterianas, realizou-se o cultivo em tubos com caldo *Brain heart infusion* (BHI) (FLUKA ANALYTICAL) e em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (NA) (HIMEDIA). O objetivo era obter crescimento *overnight* das colônias, sob condições de 37 °C em estufa bacteriológica. Ambos os meios de cultura são utilizados para o cultivo da maioria dos microrganismos menos fastidiosos, servido como fontes nutrientes como nitrogênio, vitaminas, minerais e aminoácidos (VIEIRA; NAHAS; 2000). Para ajuste da densidade, utilizou-se o método de suspensão direta das cepas, obtendo suspensão em 2 mL Caldo BHI, com turvação equivalente a 0,5 da escala padrão de McFarland (concentração equivalente a uma densidade de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL) (CLSI, 2012; REIS et al., 2020).

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

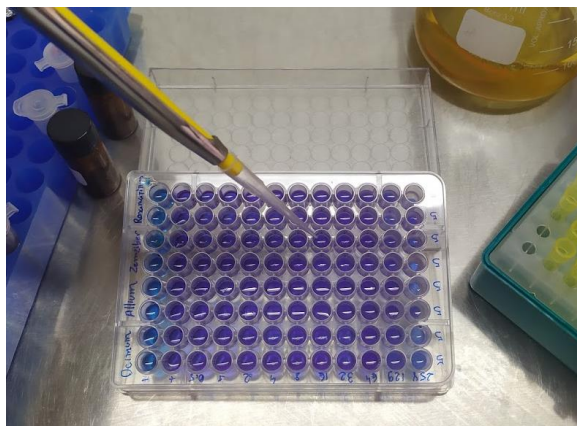
As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos foram determinadas de acordo com o procedimento de referência de microdiluição em caldo de Gazim et al. (2010) e CLSI (2018), com adaptações. As soluções-estoque dos óleos extraídos foram produzidas após da diluição com DMSO 2%, obtendo a concentração inicial de 516 µg/mL. Foram preparadas microplacas de 96 poços de poliestireno, distribuindo-se em cada poço 95 µL de caldo Mueller-Hinton (MH), 100 µL da solução estoque do óleo no primeiro poço, para a realização da diluição seriada em MH nos demais poços.

Após diluição, as concentrações fixas do OE foram de 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL. Por fim, 5 µL de inóculo bacteriano previamente ajustado 0,5 na escala MacFarland foi distribuído nos poços. Cerca de 20 µL de do corante resazurina (Sigma-Aldrich) completaram o volume final de 220 µL em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 h em estufa bacteriológica.

O crescimento das bactérias em MH e DMSO serviram como controle positivo e negativo, respectivamente. O CIM foi definido como a menor concentração que resultou em inibição visível do crescimento após mudança de coloração da resazurina (Figura 7). O reagente funciona como indicador redox, no qual as células bacterianas ativas reduzem a resazurina não fluorescente

(azul) para a resorufina fluorescente (rosa) (O'BRIEN et al. 2000; ELSHIKH et al., 2016).

Figura 7. Teste de microdiluição em placa para a determinação da concentração mínima dos óleos essenciais.



Fonte: Autora (2021)

4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida mínima

Após a determinação do CIM, os poços contendo crescimentos visíveis ou não, foram repicados em placas de Petri contendo o MHA (DIFCO) para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). As placas foram identificadas e incubadas em condições de 37 °C por 18 – 24 h em estufa bacteriológica. Após este período, determinou-se a menor concentração no qual não demonstrou crescimento microbiano em meio de cultura com os tratamentos, indicando o seu potencial bactericida.

4.3 Atividade inibitória do crescimento de biofilmes

4.3.1 Avaliação da produção de biofilme como parâmetro

Seguindo a metodologia de Santos (2016) com modificações, os inóculos foram preparados a partir da suspensão celular com crescimento recente (24 h) em solução salina (0,85%). A densidade ótica foi ajustada até turbidez correspondente a 0,5 McFarland. Todas as cepas foram submetidas a avaliação da produção de biofilme nos meios de BHI enriquecido com 1% de glicose e 2% NaCl. Em microplaca de 96 poços com fundo formato U, em triplicata, foram depositados 100 µL de cada meio teste e posteriormente adicionados 100 µL dos inóculos. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Como controle da placa, utilizou-se o meio de cultura BHI adicionado +10% de DMSO

Passado o período de incubação, as placas foram invertidas e lavadas com água destilada, para a remoção das células não aderidas, e deixadas ao ar livre durante 15 min para secagem. Logo depois, as células aderidas foram fixadas com 180 µL de álcool 95% P.A por 2 min. Após descarte do álcool, foram aplicados 180 µL de corante cristal violeta (0,5%) em cada orifício da placa, e deixados por 15 min.

Após esse período, o cristal violeta foi descartado e as placas mergulhadas em água destilada até que a água de enxágue não apresentasse mais nenhuma coloração. Por fim, as placas foram secas superficialmente com toalhas de papel, e 180 µL de álcool 95% P.A foram adicionados em cada orifício e deixados por 15 min, para solubilização das células aderidas. Passado esse período, 180 µL do material resultante nos orifícios foram transferidos para uma nova placa de ELISA de fundo chato, na qual foi lida a absorbância a 595 nm em espectrômetro (BioTek Epoch™) no Laboratório de Biotecnologia e Polímeros Naturais da UFRN.

4.3.2 Efeitos dos óleos essenciais e misturas sobre o biofilme

O CIM necessário para inibir a aderência das células foram analisadas pela Oes e suas combinações. As concentrações utilizadas para o teste foram referentes ao CIM apresentado por cada cepa frente aos óleos essenciais testados, chegando as concentrações subinibitórias equivalentes ao CIM, 2X CIM e 4X CIM, sugerido por Merghni et al. (2018).

As placas foram preparadas com 90 µL dos inóculos, preparados de acordo com Item 4.3.1. Utilizou-se as cepas com crescimento em BHI como controle positivo. O antibiótico amoxicilina (DIFCO) foi utilizado como controle negativo antimicrobiano, utilizando-o como parâmetro comparativo nas concentrações de CIM apresentados pelas bactérias no Item 4.2.2. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Após o período de incubação, procedeu-se a quantificação do biofilme conforme com a medição da densidade óptica (D.O.), conforme descrito no Item 4.3.1. Para cada orifício, calculou-se a inibição utilizando a seguinte equação:

$$\% = \left(\frac{\text{D.O do poço da amostra} - \text{D.O do poço controle da placa}}{\text{D.O da bactéria} - \text{D.O do poço controle da placa}} \right) \times 100$$

Os resultados obtidos foram convertidos em porcentagem, expressando a quantidade de biofilme formado em relação ao próprio controle do microrganismo, sendo considerados satisfatórios apenas os tratamentos que provocaram a inibição de pelo menos 50% de formação de biofilme, segundo a metodologia de Endo et al. (2018).

4.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados coletados, utilizou-se o programa GaphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Amostras foram analisadas através da média aritmética e do desvio padrão. Para a comparação dos valores obtidos, utilizou-se o teste de múltipla comparação de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Foram considerados significativos resultados com nível de significância inferior a 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Composição química dos óleos essenciais

O óleo essencial extraído das folhas frescas de *R. officinalis* (OERO) apresentou rendimento de 0,48%. O OERO analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) apresentou 18 sinais na Figura 8, entre os tempos de 5 e 42 min. Dentre esses compostos, 88,89% são classificados como monoterpenos, 5,56% como sesquiterpenos e 5,56% como ácidos orgânicos, identificados a partir dos espectros de massa (Figura 9).

Figura 8. Perfil cromatográfico de folhas frescas de *Rosmarinus officinalis*.

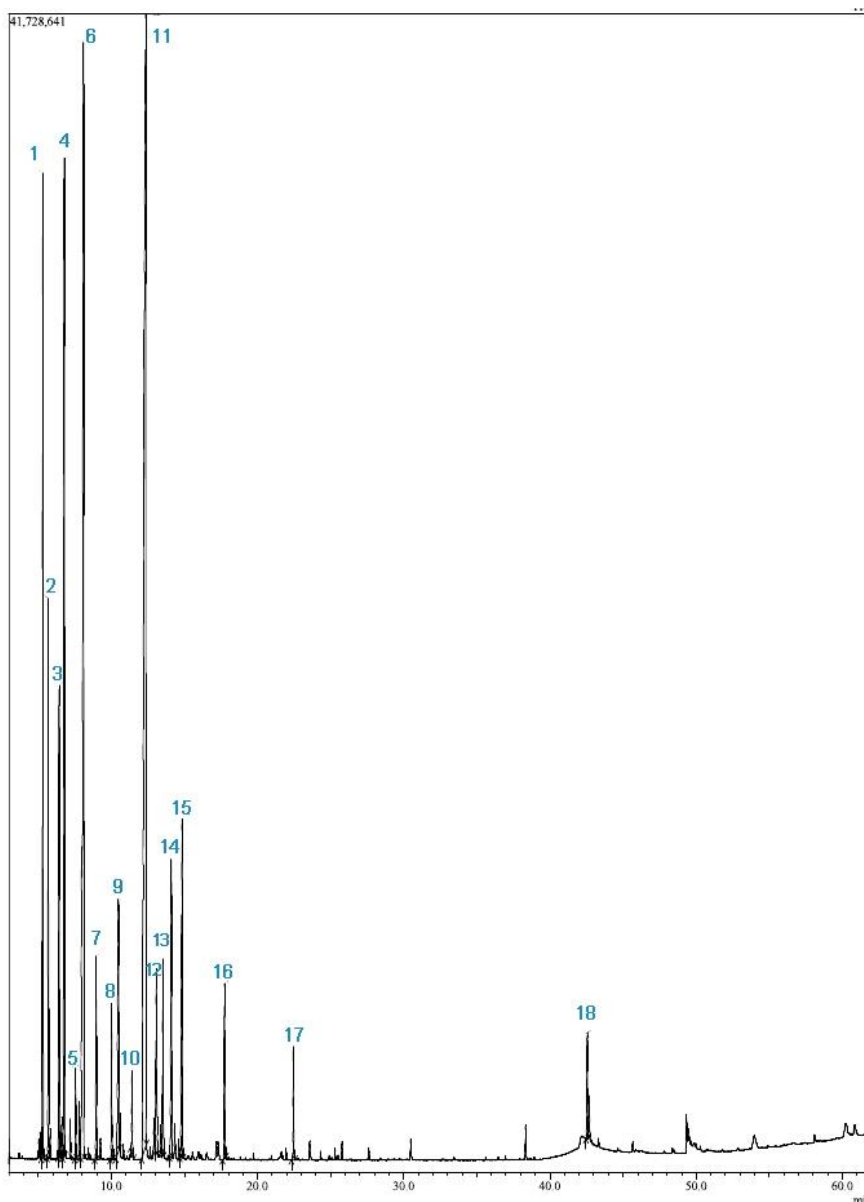
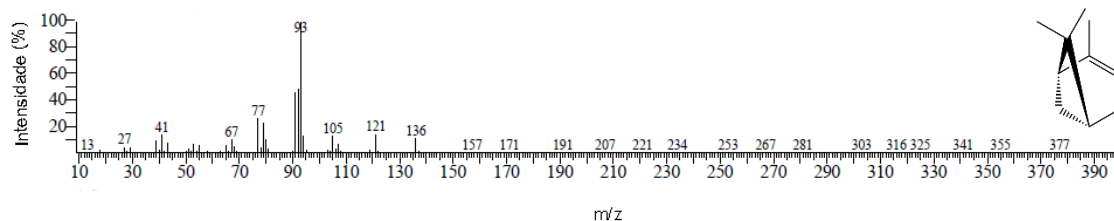
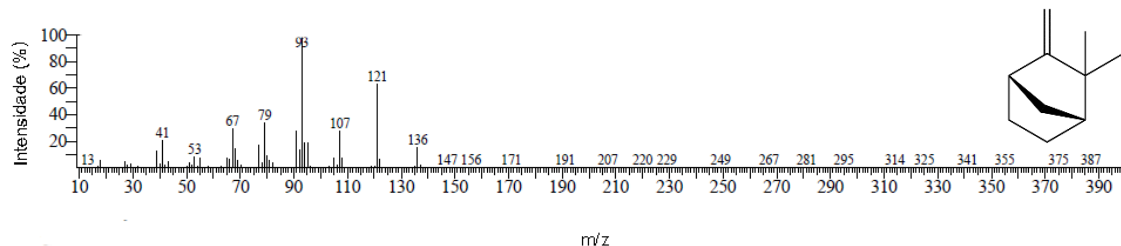


Figura 9. Espectros de massas de *R. officinalis* com fragmentos MS dos compostos identificados de 1-18 e suas respectivas estruturas

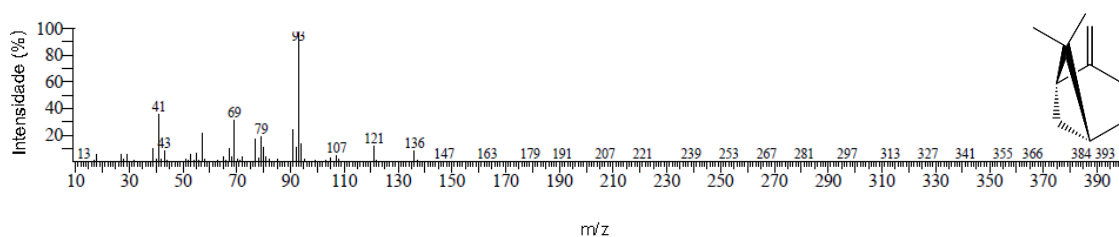
(1) α -Pineno



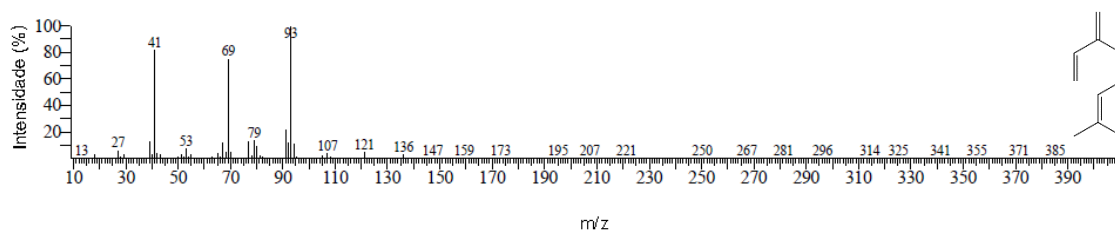
(2) Canfeno



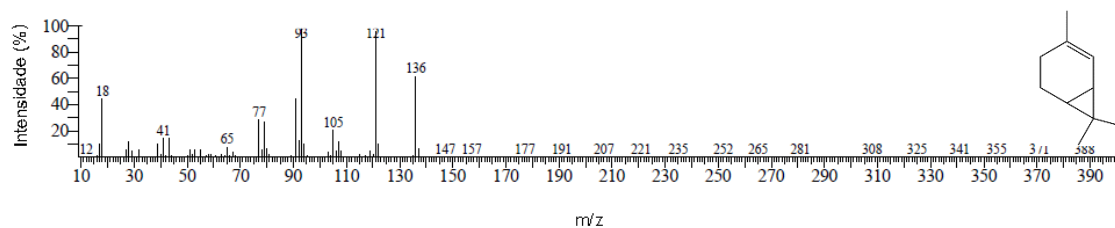
(3) β -Pineno



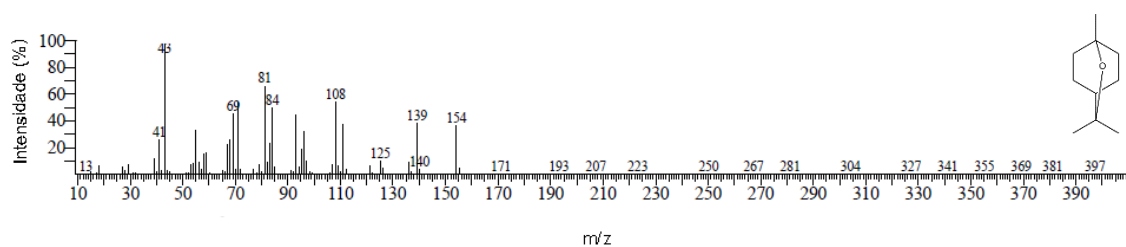
(4) Mirceno

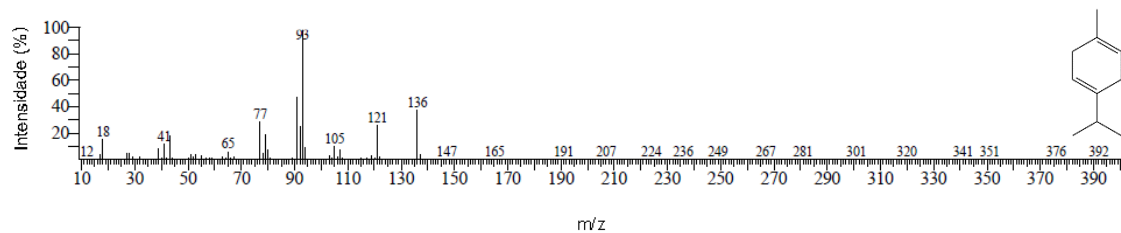


(5) δ -2-Caren

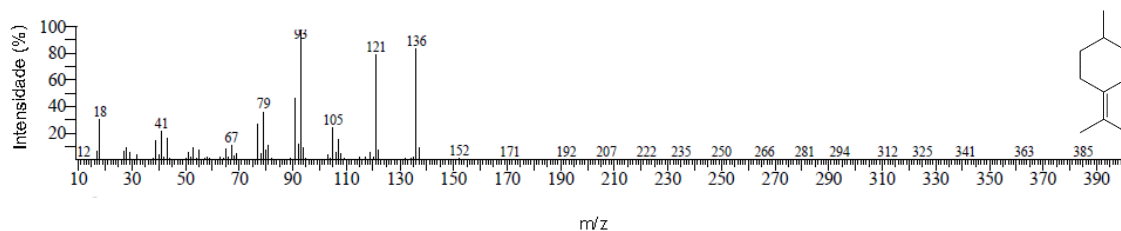


(6) 1,8-Cineol

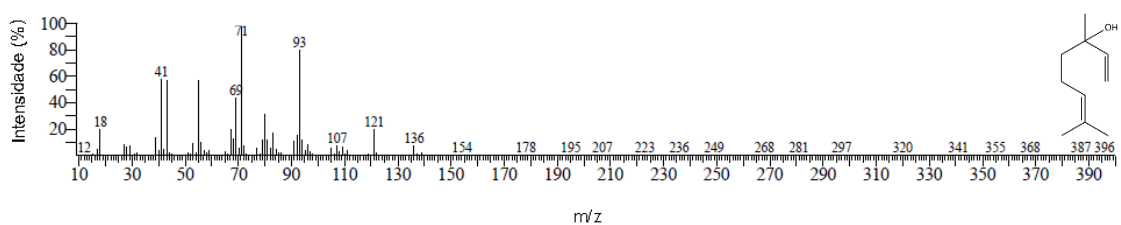


(7) γ -Terpineno

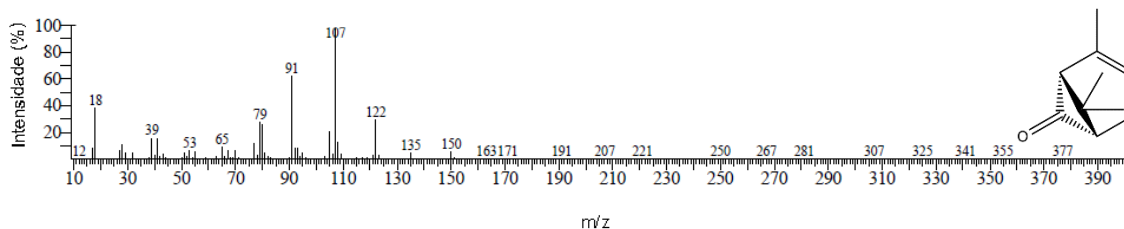
(8) Isoterpinoleno



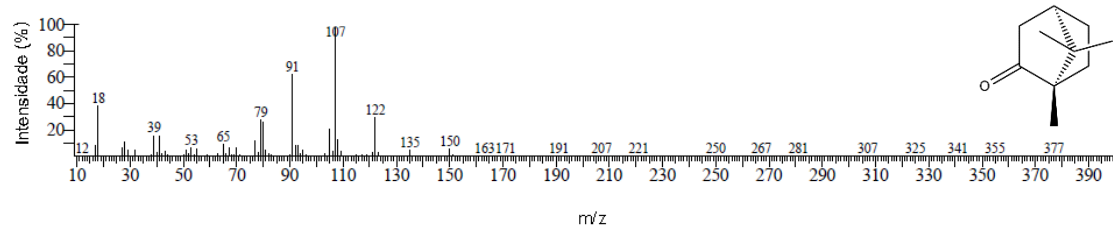
(9) Linalol



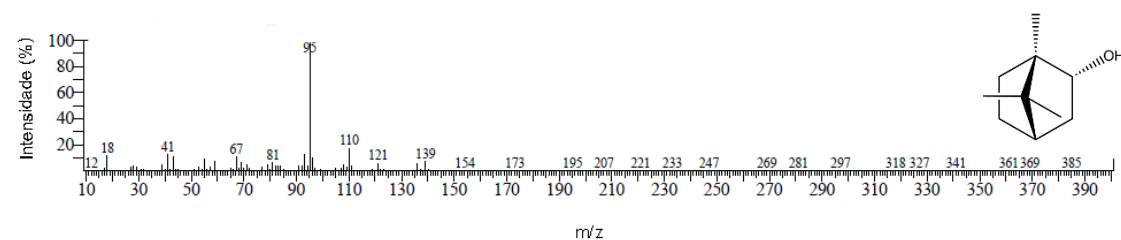
(10) Crisantenona



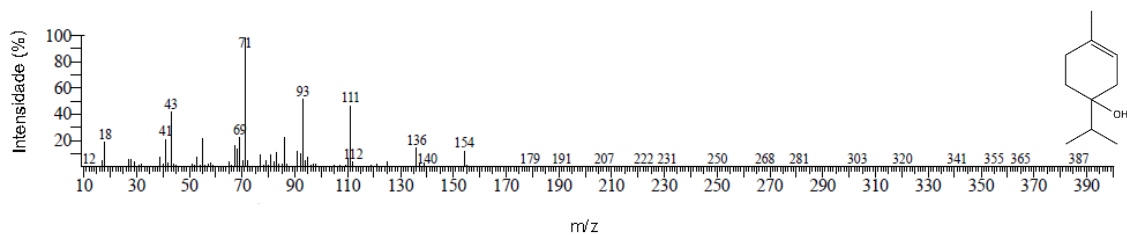
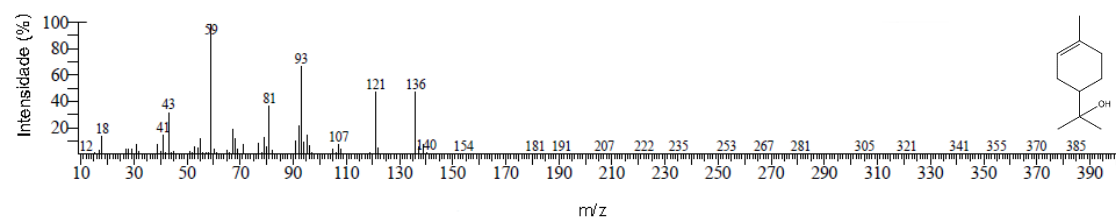
(11) Cânfora



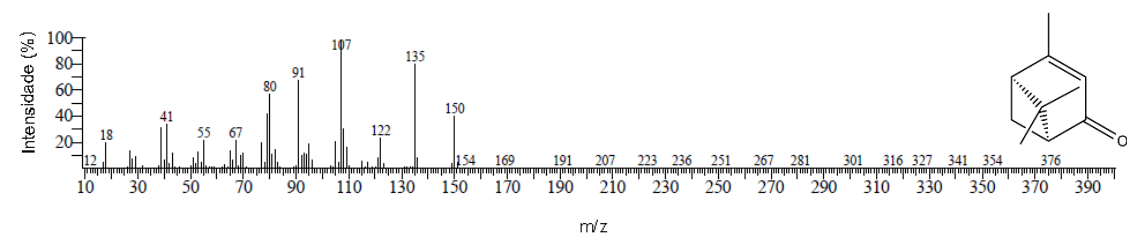
(12) Borneol



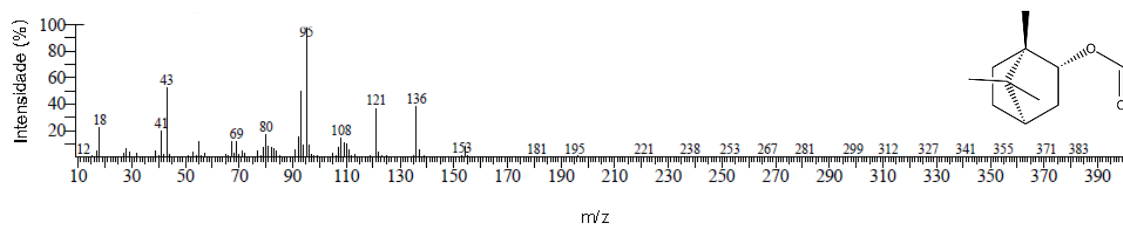
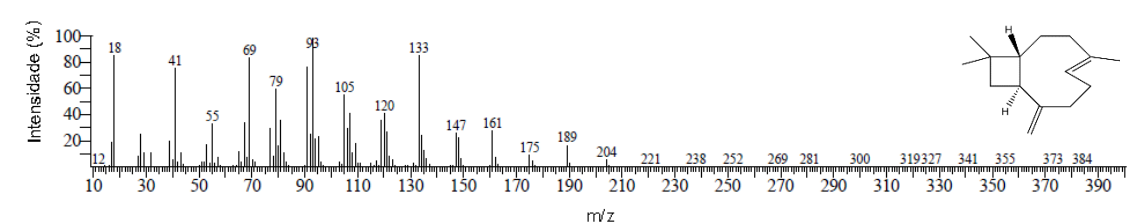
(13) Terpinen-4-ol

(14) α -Terpineol

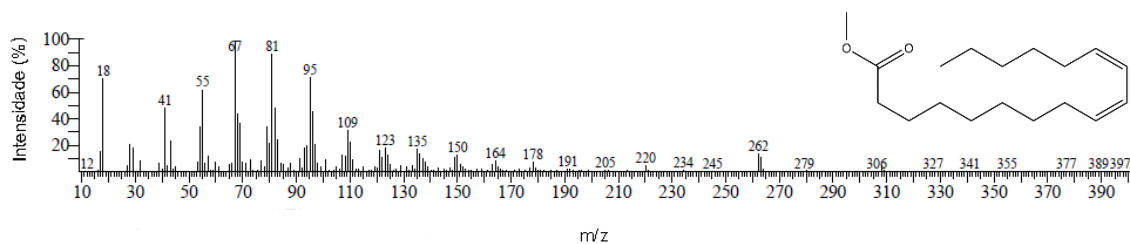
(15) Verbenona



(16) Formato de isobornil

(17) β -Cariofileno

(18) Linoleato de metila



Os espectros obtidos a partir da corrida cromatográfica, foram identificados com os dados da biblioteca NIST (2005), e comparados com ADAMS (2017), para cálculo do índice de retenção de Kovat's. Com os espectros de massa obtidos, os teores e os índices de Kovat's calculados estão expressos na Tabela 1. De acordo com as características apresentadas pelo espectro de massas e os picos comparados com a literatura, o CG/MS do OERO possui como compostos majoritários a Cânfora (30,72%); 1,8-Cineol (17,63%), Mirceno (10,17%), α -Pineno (8,98%) e a Verbenona (4,37%).

O óleo essencial extraído dos rizomas de *Z. officinale* (OEZO) obteve rendimento total de 0,13%. Em análise do cromatograma, 19 sinais identificados entre os tempos de 4 a 30 min., representam os compostos identificados como monoterpenos (52,63%), sesquiterpenos (42,1%) e cetonas alifáticas (5,26%) (Figura 10), identificados a partir dos espectros de massa (Figura 11).

Tabela 1. Análise cromatográfica do óleo de *R. officinalis*

Pico ¹	Composto	Teor (%)	RT ²	IK-L ³	IK-S ⁴
1	α -Pineno	8,98	5,330	939	935
2	Canfeno	4,15	5,705	954	946
3	β -Pineno	3,85	6,430	979	968
4	Mirceno	10,17	6,785	990	979
5	δ -2-Caren	0,72	7,575	1002	1002
6	1,8-Cineol	17,63	8,070	1031	1018
7	γ -Terpineno	1,70	8,985	1059	1044
8	Isoterpinoleno	1,42	10,045	1088	1076
9	Linalol	3,96	10,495	1096	1090
10	Crisantenona	0,84	11,435	1127	1118
11	Cânfora	30,72	12,280	1146	1146
12	Borneol	2,25	13,095	1169	1168
13	Terpinen-4-ol	1,93	13,540	1177	1181
14	α -Terpineol	3,54	14,110	1188	1198
15	Verbenona	4,37	14,830	1205	1220
16	Formato de isobornil	1,64	17,740	1239	1307
17	β -Cariofileno	1,11	22,455	1419	1448
18	Linoleato de metila	1,02	42,555	2085	2049

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ² Tempo de retenção dos compostos na coluna cromatográfica em minutos; ³ Índice de Kovats da literatura; ⁴ Índice de Kovats calculado.

Figura 10. Perfil cromatográfico de rizomas frescos de *Zingiber officinale* Roscoe.

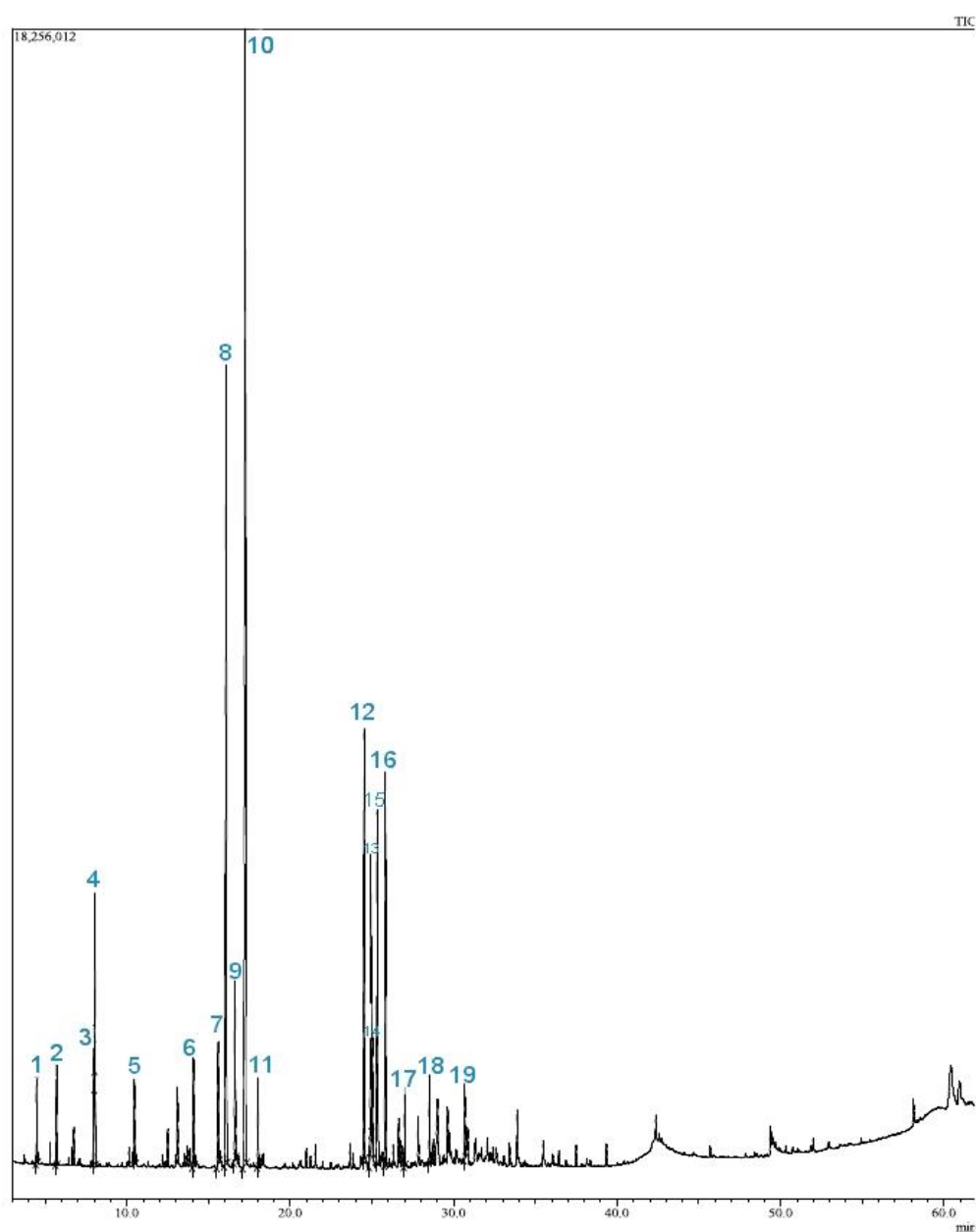
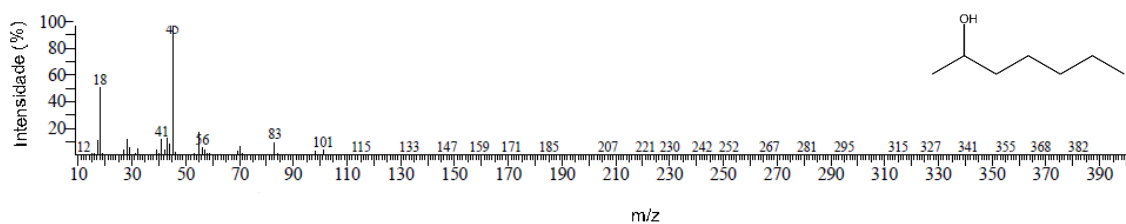
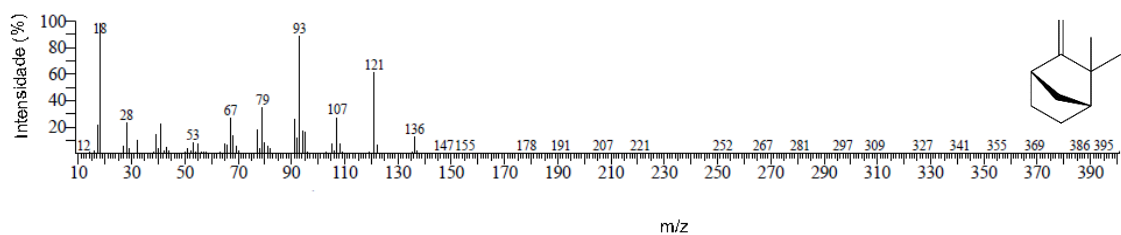


Figura 11. Espectros de massas de *Z. officinale* com fragmentos MS dos compostos identificados de 1-19 e suas respectivas estruturas

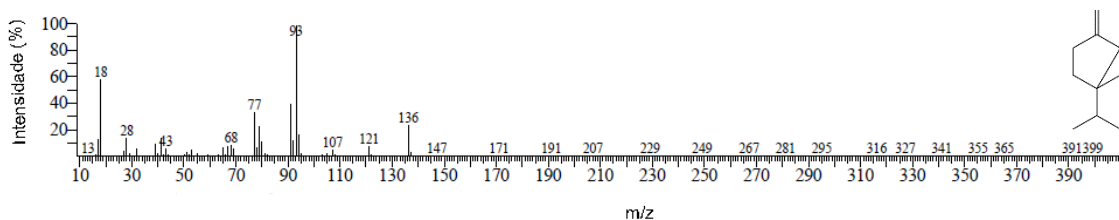
(1) 2-Heptanol



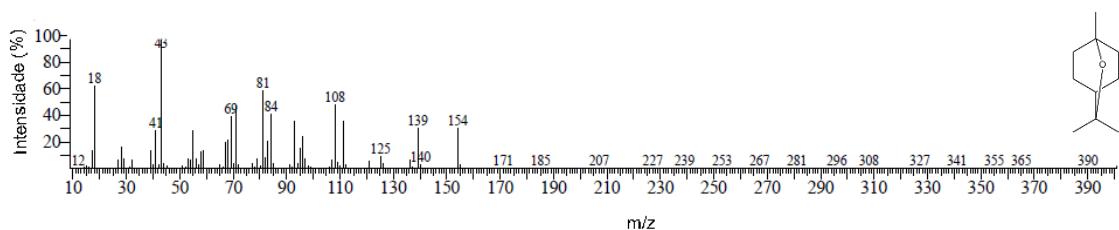
(2) Canfeno



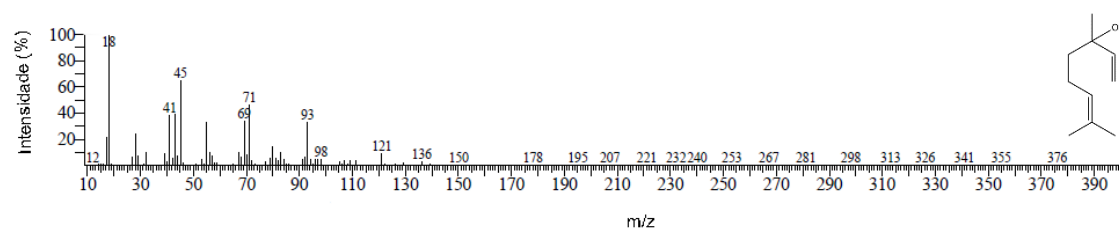
(3) Sabineno



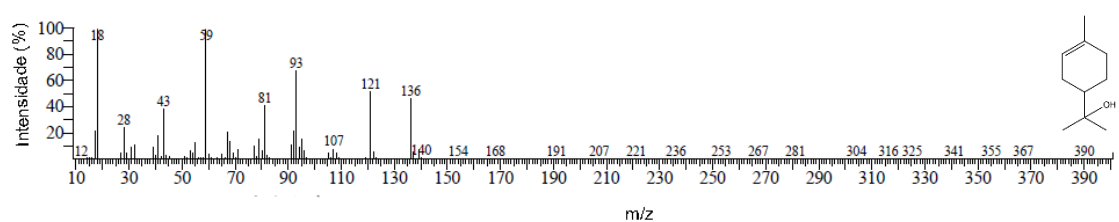
(4) 1,8-Cineol



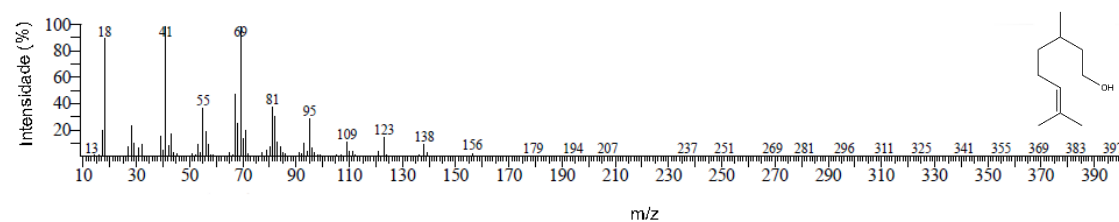
(5) Linalol



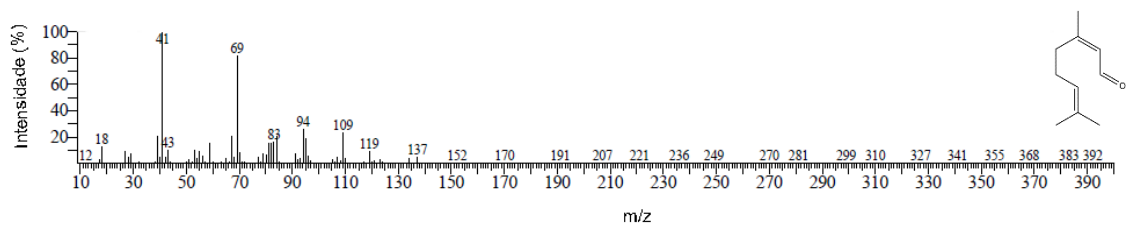
(6) α-Terpineol



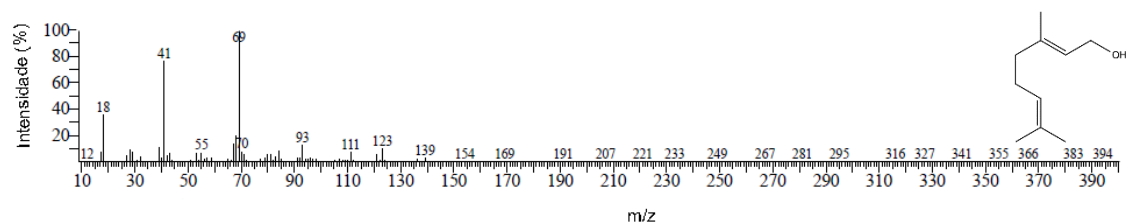
(7) Citronelol



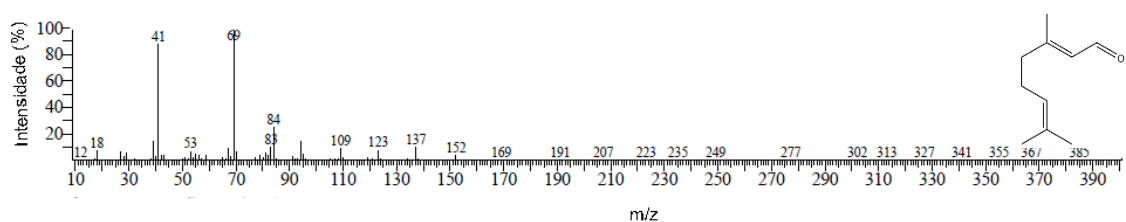
(8) Neral



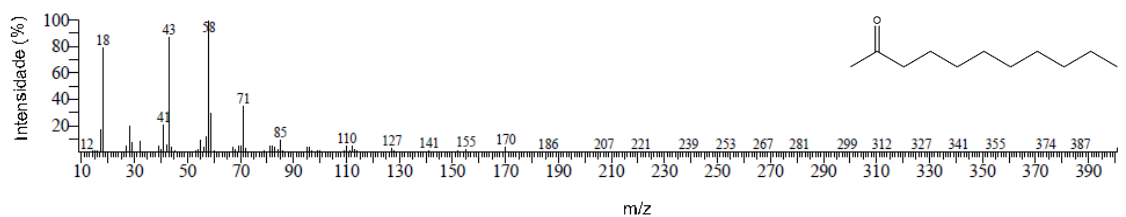
(9) Geraniol



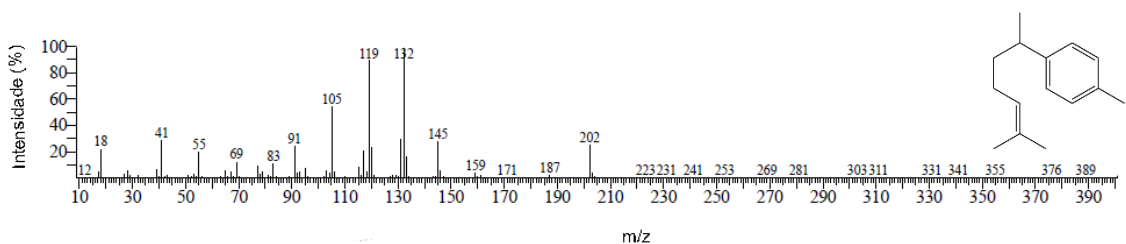
(10) Geranial



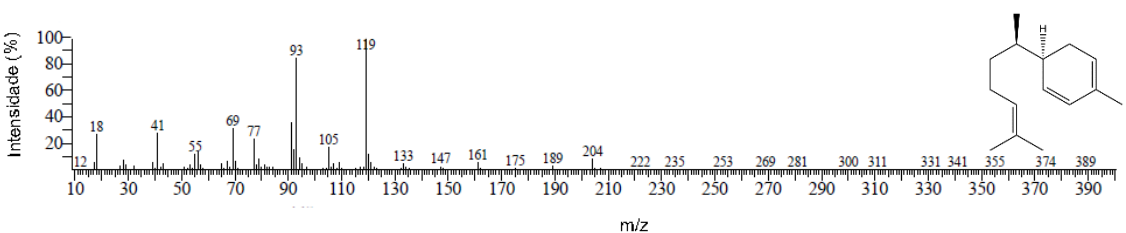
(11) 2-Undecanona



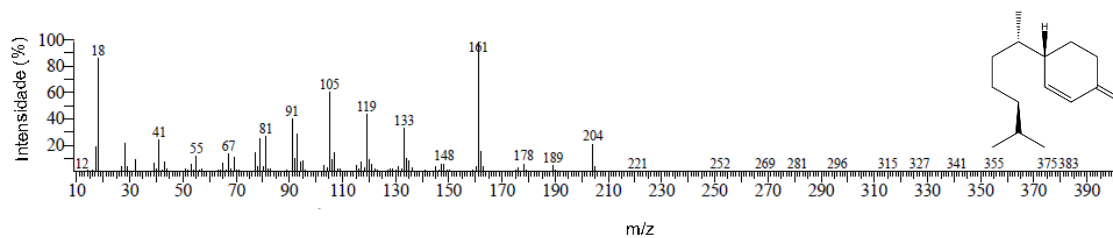
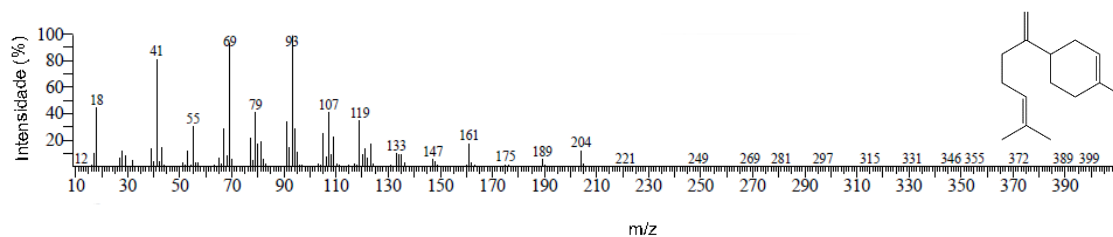
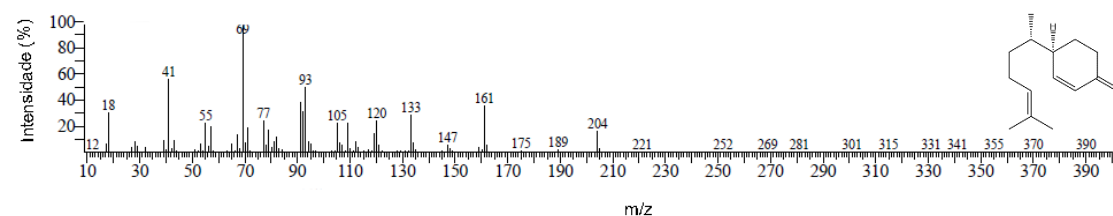
(12) ar-Curcumenol



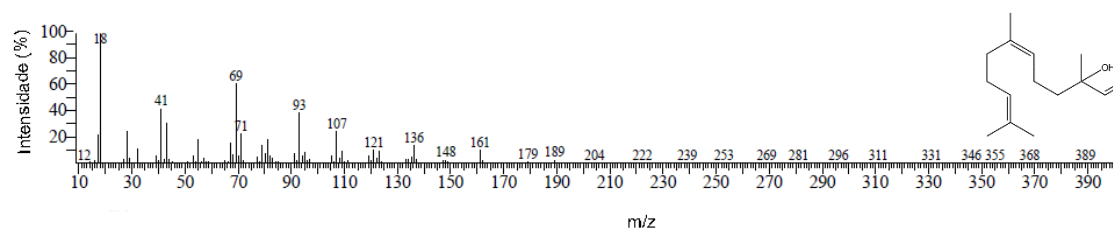
(13) Zingibereno



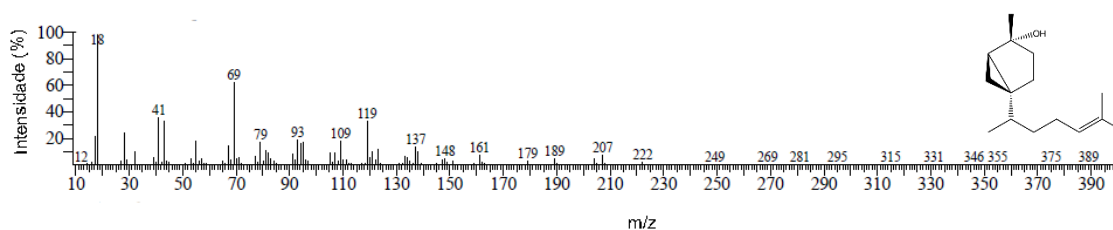
(14) Trans-Muurolo-4(14),5-diene

(15) β -Bisaboleno(16) β -Sesquifelandreno

(17) (Z)-Nerolidol



(18) cis-Hidrato de sesquisabineno



(19) trans-Hidrato de sesquisabineno

Para cada sinal identificado do OEZO, foram calculados o índice de Kovat's de acordo com a literatura e seus teores expressos na Tabela 2. Entre

os compostos identificados, o Geranial (29,82%), Neral (18,10%), ar-Curcumeno (8,25%), β -Bisabolenol (8,03%), β -Sesquifelandreno (6,89%) e o Zingibereno (5,64 %), apresentaram as maiores concentrações no OEZO analisado.

Tabela 2. Análise cromatográfica do óleo de *Z. officinale*

Pico ¹	Composto	Teor (%)	RT ²	IK-L ³	IK-S ⁴
1	2-Heptanol	1,00	4,495	896	919
2	Canfeno	1,28	5,700	954	952
3	Sabineno	1,07	7,995	975	1014
4	1,8-Cineol	2,30	8,070	1031	1016
5	Linalol	1,61	10,465	1096	1081
6	α -Terpineol	2,07	14,095	1188	1180
7	Citronelol	2,73	15,600	1225	1221
8	Neral	18,10	16,080	1238	1235
9	Geraniol	3,82	16,625	1252	1249
10	Geranial	29,82	17,235	1267	1267
11	2-Undecanona	1,55	18,035	1294	1288
12	ar-Curcumeno	8,25	24,535	1480	1465
13	Zingibereno	5,64	24,935	1493	1476
14	Trans-Muurola-4(14),5-diene	1,52	25,035	1493	1478
15	β -Bisabolenol	8,03	25,340	1505	1486
16	β -Sesquifelandreno	6,89	25,830	1522	1500
17	(Z)-Nerolidol	1,30	27,015	1532	1532
18	cis-Hidrato de sesquisabineno	1,58	28,525	1544	1574
19	trans-Hidrato de sesquisabineno	1,45	30,675	1579	1632

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²Tempo de retenção dos compostos na coluna cromatográfica em minutos; ³Índice de Kovats da literatura; ⁴Índice de Kovats calculado.

O óleo essencial extraído a partir dos bulbos frescos de *A. sativum* (OEAS) obtiveram rendimento de 0,14%. Em análise de CG/MS, o OEAS apresentou 6 sinais (Figura 12), entre os tempos de 3 e 26 min. de corrida cromatográfica, no qual os sinais demonstram que o OE é composto em 100% por substâncias organossulfuradas, identificados a partir dos espectros de massa (Figura 13).

Figura 12. Perfil cromatográfico de bulbos frescos de *Allium sativum*.

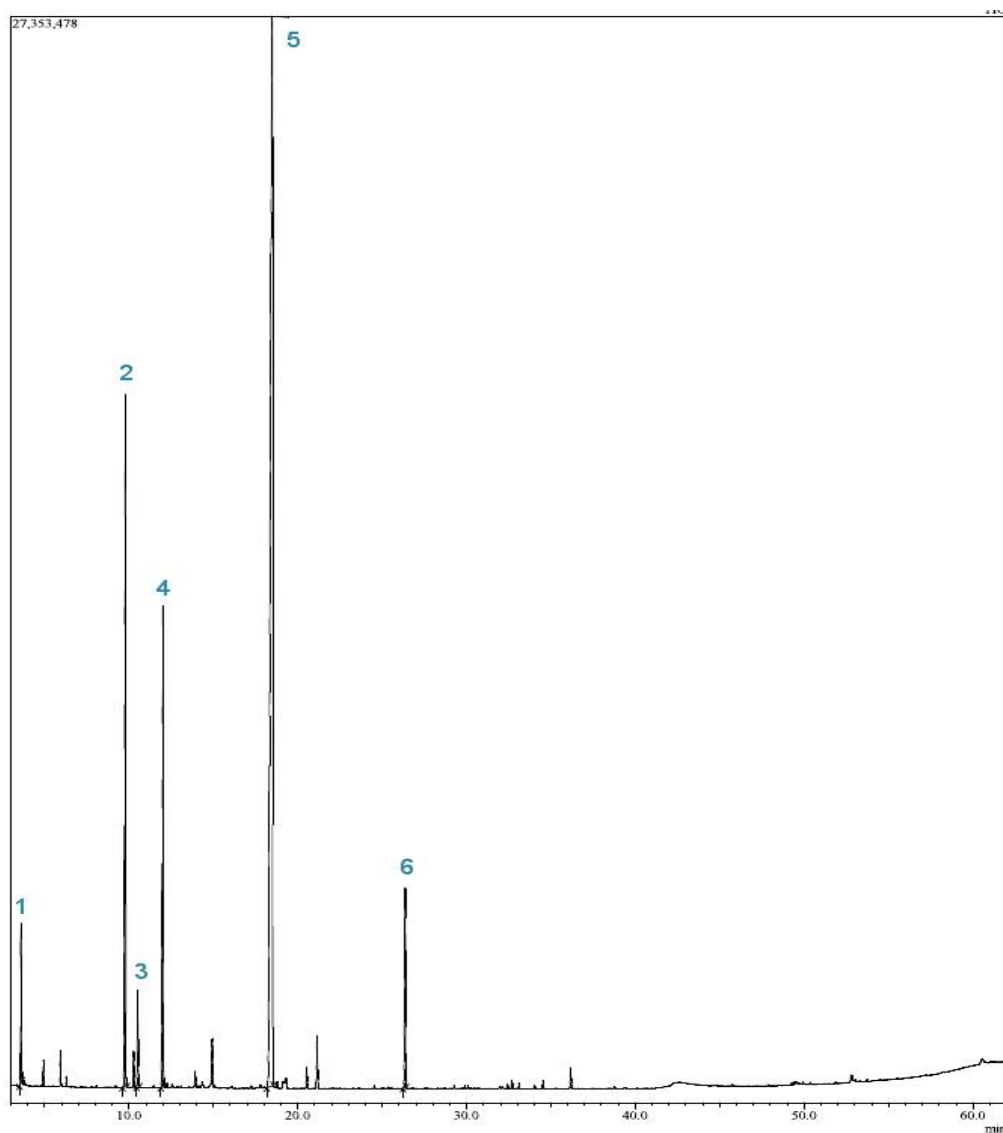
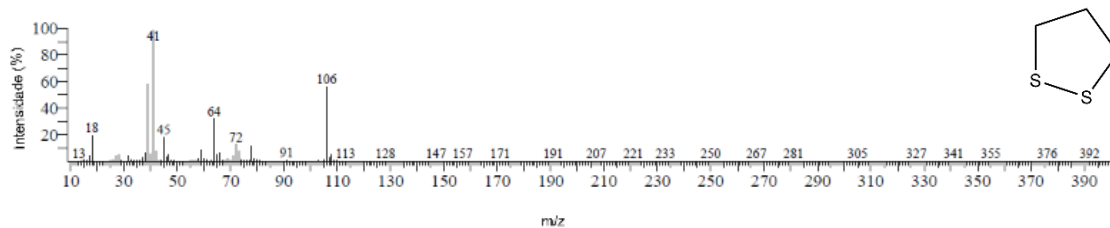
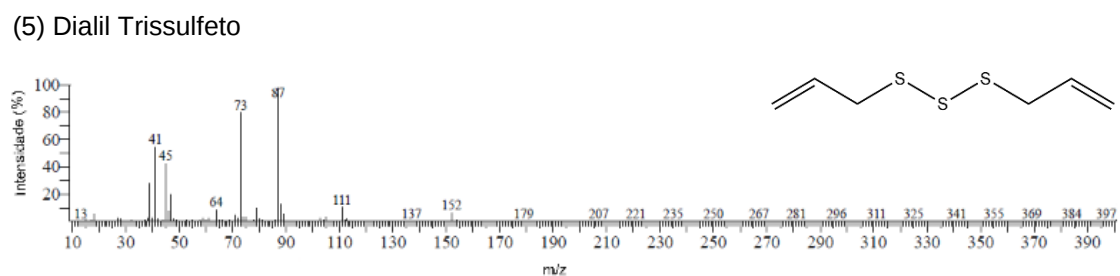
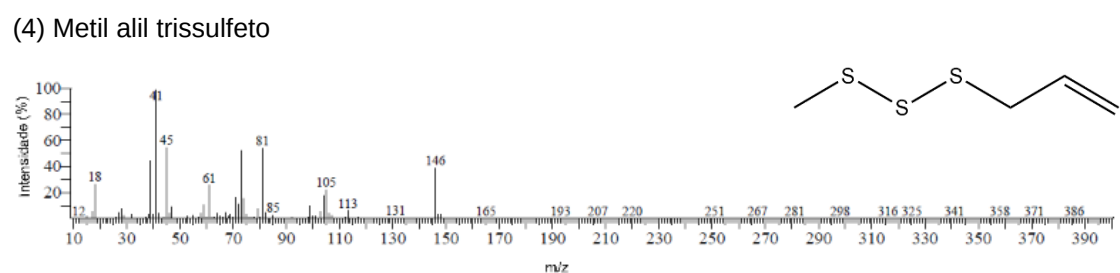
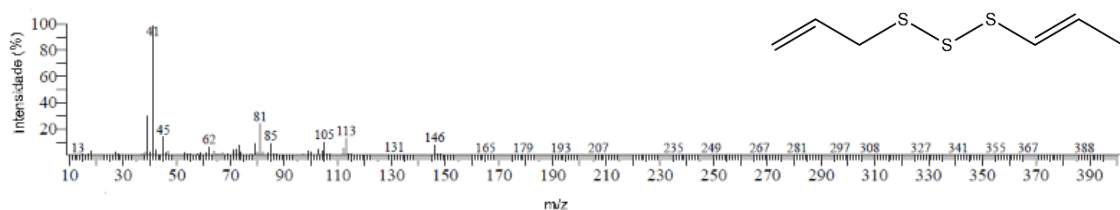
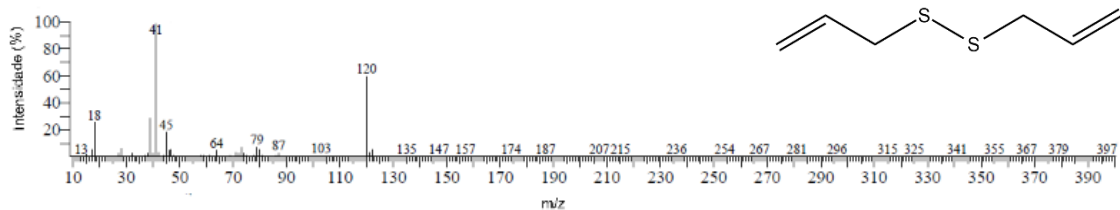


Figura 13. Espectros de massas de *A. sativum* com fragmentos MS dos compostos identificados de 1-6 e suas respectivas estruturas

(1) 1,2- Ditiolano



(2) Dialil Dissulfeto



Os compostos foram identificados pela comparação do índice de Kovat's e calculado de acordo com Adams (2017). Na Tabela 3, estão expressos os valores dos índices de Kovat's calculados e a concentração de cada composto. Dentre as substâncias identificadas, os compostos majoritários foram o Dialil trissulfeto (60,50%), Dialil dissulfeto (18,22%) e o Metil alil trissulfeto (12,62%).

Tabela 3. Análise cromatográfica do óleo de *Allium sativum*

Pico ¹	Composto	Teor (%)	RT ²	IK-L ³	IK-S ⁴
1	1,2- Ditiolano	2,22	3,605	978	950
2	Dialil Dissulfeto	18,22	9,770	1077	1096
3	Dissulfeto de Alilil (<i>E</i>)-1-propenil	1,84	10,525	1103	1113
4	Metil alil trissulfeto	12,62	12,000	1143	1148
5	Dialil Trissulfeto	60,50	18,390	1289	1300
6	Dialil Tetrasulfeto	4,60	26,360	1502	1485

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ² Tempo de retenção dos compostos na coluna cromatográfica em minutos; ³ Índice de Kovats da literatura; ⁴ Índice de Kovats calculado.

5.2 Atividade Antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais testados, os valores observados em testes de CIM e CBM foram classificados de acordo com a metodologia de Aligianis et al. (2001). Os autores propuseram uma classificação para avaliar a atividade antimicrobiana de materiais vegetais, podendo apresentar efeito de forte inibição: CIM até 500 µg/mL; inibição moderada: CIM entre 600 e 1000 µg/mL; e fraca inibição: CIM acima de 1000 µg/mL. De acordo com esse parâmetro, as médias e desvios padrão dos resultados foram analisados.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a diferentes bactérias patogênicas humanas (µg/mL)

Bactérias	<i>R. officinalis</i>		<i>Z. officinale</i>		<i>A. sativum</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	85,33 ± 36,95	-	5,33 ± 2,31	4,00±0	53,33 ± 18,48	4,00 ± 0
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	8,00 ± 0	3,33 ± 1,15	10,67 ± 4,62	3,33 ± 1,15	213,33 ± 73,90	5,33 ± 2,31
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 10031)	10,67 ± 4,62	8,00 ± 0	16,00 ± 0	8,00 ± 0	32,00 ± 0	8,00 ± 0
<i>S. Typhimurium</i>	21,33 ± 9,24	0,83 ± 0,29	85,33 ± 36,95	64,00±0	64,00 ± 0	32,00±0

<i>P. aeruginosa</i> (CCBH 5698)	5,33 ± 4,62	1±0	1,33 ± 0,58	0,83 ± 0,29	1,67 ± 0,58	0,83 ± 0,29
-------------------------------------	----------------	-----	-------------	----------------	----------------	----------------

(-) não observado

O tratamento com o OERO demonstrou ser efetivo frente a maioria das cepas testadas. Em comparação com as demais bactérias, foram necessárias maiores concentrações do OERO para inibir o crescimento de *E. coli*. A cepa exibiu maior resistência frente ao tratamento com OERO, com CIM médio de 85,33 µg/mL. Além disso, para a cepa de *E. coli* analisada, não foram observadas atividade bactericida nas concentrações testadas (Figura 14).

Figura 14. Análise para determinar a Concentração Bactericida Mínima do óleo de *Rosmarinus officinalis* frente a *E. coli*.



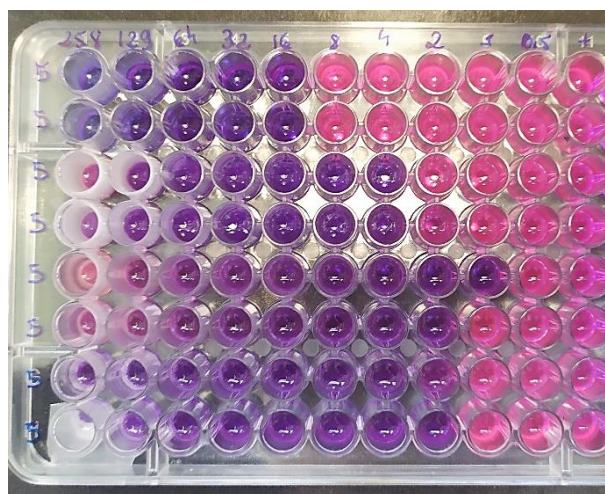
Fonte: Autora (2021)

Entretanto, o tratamento com o OERO se mostrou mais efetivo frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, com valores médios de CIM 8,0 µg/mL e CBM 3,33 µg/mL. Altas sensibilidades também foram observadas para as demais bactérias Gram-negativas testadas. Frente as cepas de *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*, o tratamento com OERO apresentou as menores concentrações bactericidas, como valores de CBM de 0,83 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente.

Diferente do tratamento com o OERO, *E. coli* demonstrou alta sensibilidade frente o OEZO, com valores médios de CIM 5,33 µg/mL e CBM 4 µg/mL. *E. coli* foi a segunda bactéria mais sensível ao OEZO, ficando atrás

apenas da cepa de *P. aeruginosa*, no qual o óleo obteve CIM e CBM de 1,33 $\mu\text{g/mL}$ e 0,83 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo revelados na coloração da resazurina, no qual a coloração rosa indica crescimento bacteriano (Figura 15). Resultados satisfatórios também foram encontrados para *S. aureus* e *K. pneumoniae* nos testes de CBM, no qual cada divisão é referente ao crescimento bacteriano após a exposição a cada uma das concentrações testadas (Figura 16). Os valores foram similares aos encontrados no tratamento com OERO.

Figura 15. Análise para determinar a Concentração Inibitória Mínima do óleo de *Zingiber officinale* frente a *P. aeruginosa*.



Fonte: Autora (2021)

Figura 16. Análise para determinar a Concentração Bactericida Mínima do óleo de *Zingiber officinale* frente a *K. pneumoniae*.



Fonte: Autora (2021)

No entanto, a mesma cepa de *S. Typhimurium* no qual para o OERO demonstrou CIM e CBM $\leq 21,33 \mu\text{g/mL}$, para o tratamento com OEZO a

sensibilidade foi menor. O isolado de *S. Typhimurium* apresentou CIM de 85,33 µg/mL e CBM de 64 µg/mL. Assim como em comparação as demais cepas submetidas ao tratamento com o OEZO, *S. Typhimurium* demonstrou ser muito mais resistente. Uma menor sensibilidade de *S. Typhimurium*, quando comparado ao tratamento com OERO, também foi observado para o tratamento com OEAS. Apenas as concentrações de 64 µg/mL e 32 µg/mL conseguiram obter efeitos bacteriostáticos e bactericidas, respectivamente.

Observou-se também que para *S. aureus*, foram necessárias concentrações de 213,33 µg/mL do OEAS para o CIM, a maior concentração inibitória dentre todos os tratamentos. Para a mesma cepa, verificou-se o valor médio de CBM de 5,33 µg/mL. Para *K. pneumoniae*, o tratamento com OEAS demonstrou efeitos em concentrações satisfatórias, com valores médios de CIM e CBM de 32 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente. Mas quando comparados aos tratamentos com OERO e OEZO, foram necessárias maiores concentrações de OEAS para obter efeito inibitório frente a *K. pneumoniae*, mas a concentração bactericida permanece a mesma para os três tratamentos.

Maiores concentrações de OEAS também foram necessárias para gerar um efeito inibitório em *E. coli*, quando comparado ao OEZO. Observou-se CIM médio de 53,33 µg/mL e CBM de 4 µg/mL, no qual o valor de CBM foi igual para os dois tratamentos. Para *P. aeruginosa*, também foram observados os menores valores de CIM e CBM dentre todas as bactérias frente aos três tratamentos. Para esta cepa, o OEAS apresentou CIM e CBM como valores $\leq 1,67$ µg/mL.

5.3 Atividade Antibiofilme

Foram realizados ensaios para avaliar o efeito inibitório dos tratamentos na formação de biofilmes das cepas selecionadas (Anexos 1-3). As concentrações foram previamente determinadas, através do menor valor do CIM observado dentre as análises em triplicata do item 5.2. A partir disso, utilizou-se os valores subinibitórios do CIM, 2xCIM e 4xCIM de cada um dos óleos testados frente as cepas selecionadas. Os efeitos dos tratamentos dos óleos essenciais em resposta a formação do biofilme, foram avaliados por meio de ensaio com cristal violeta e medição da densidade ótica a 595 nm (Tabela 5). Os resultados das densidades óticas foram comparados com o efeito do antibiótico Amoxicilina, utilizando as mesmas concentrações do CIM, 2xCIM e 4xCIM encontrados para cada óleo essencial, indicado como o controle negativo.

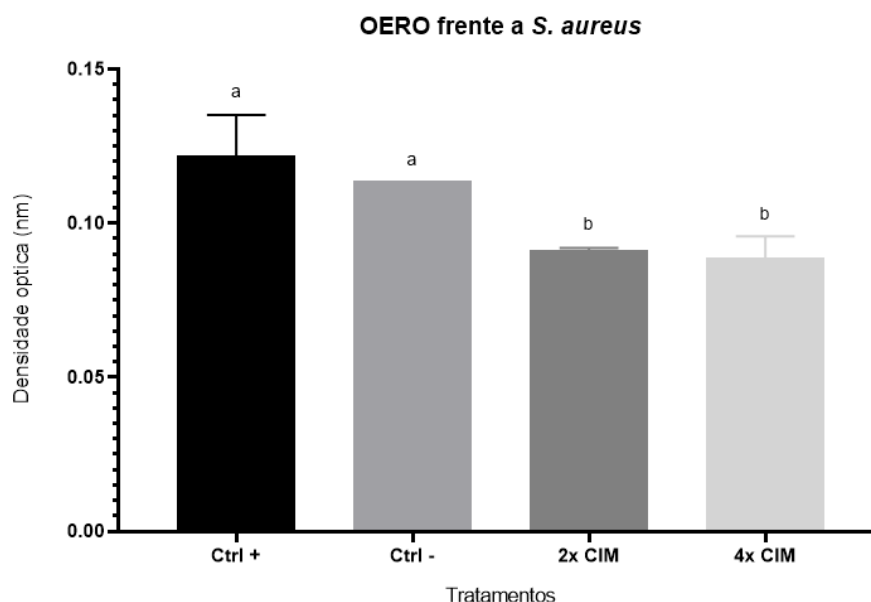
Tabela 5. Percentual de inibição da formação de biofilme

	<i>R. officinalis</i>			<i>Z. officinale</i>			<i>A. sativum</i>		
Bactérias	CIM	2xCIM	4xCIM	CIM	2xCIM	4xCIM	CIM	2xCIM	4X CIM
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	1,84%	100%	77,50%	71,37%	3,88%
<i>S. aureus</i>	41,33%	57,33%	60%	100%	100%	100%	100%	100%	x
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	100%	100%	100%	18,18%	36,36%	93,93%
<i>S. Typhimurium</i>	29,96%	24,77%	32,55%	100%	100%	100%	100%	100%	96,10%
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	9,09%	7,91%	22,17%	100%

(-) não foi observado; (x) não foi avaliado

A partir dos resultados obtidos, apenas os tratamentos que obtiveram índices de inibição na formação do biofilme acima de 50%, de acordo com a fórmula do item 4.3.2, foram comparados de acordo com os controles utilizados. Em análise, observou-se que o tratamento com OERO conseguiu inibir significativamente apenas a formação do biofilme de *S. aureus*, nas concentrações subinibitórias de 2xCIM (16 µg/mL) e 4xCIM (32 µg/mL). Ambas as concentrações diferiram significativamente do controle positivo ($p \leq 0,0044$), que é referente ao biofilme formado apenas na presença do meio de cultura, e mais efetivo do que o efeito do antibiótico Amoxicilina ($p \leq 0,0240$) (Figura 17).

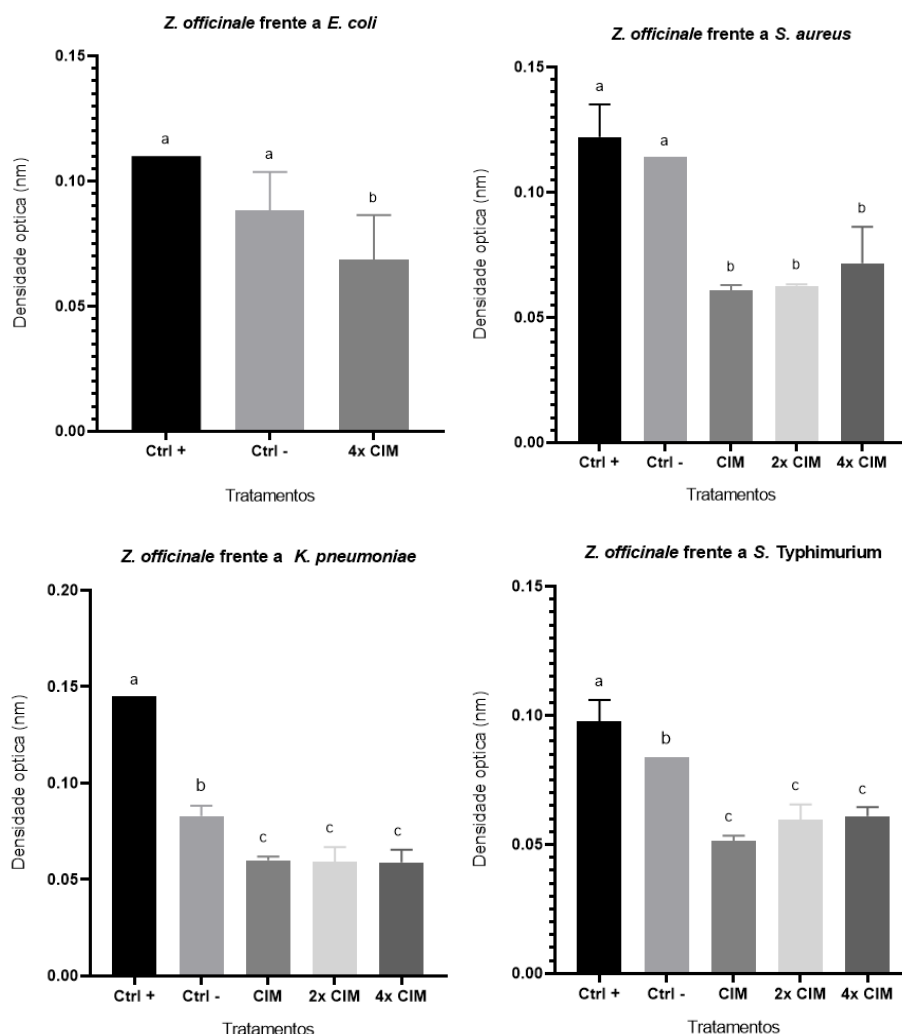
Figura 17. Efeito do OERO na formação do biofilme de *S. aureus*. Estão indicados quais análises obtiveram inibição de 50% na formação do biofilme e diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e os controles (positivo e/ou negativo). As barras indicadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.



Para os testes utilizando o tratamento com o OEZO, observou-se eficácia na inibição do biofilme formado por *K. pneumoniae*, com inibição em 100% para todas as concentrações testadas (16 – 64 $\mu\text{g/mL}$). O efeito do tratamento foi mais efetivo quando comparado com o antibiótico Amoxicilina ($p \leq 0,0019$), assim como para o controle positivo ($p < 0,0001$). Já para o biofilme formado por *E. coli*, apenas a concentração subinibitória de 4xCIM (16 $\mu\text{g/mL}$) apresentou diferença significativa em relação ao controle positivo ($p = 0,0226$), sendo também a única concentração que inibiu satisfatoriamente a formação do biofilme pela cepa estudada (Figura 18).

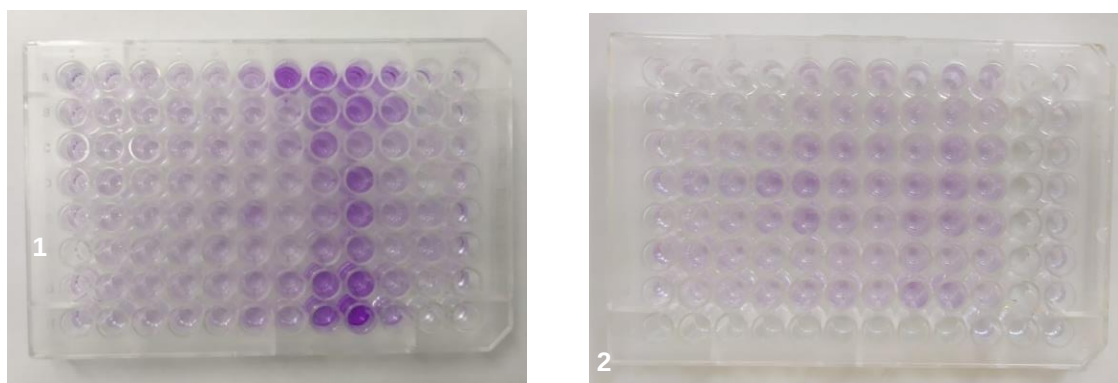
Figura 18. Efeito do OEZO na formação dos biofilmes. Estão indicados quais análises obtiveram inibição de 50% na formação do biofilme e diferença

significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e os controles (positivo e/ou negativo). As barras indicadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey



Constatou-se que todas as concentrações subinibitórias testadas do OEZO (64 - 256 $\mu\text{g/mL}$), frente ao biofilme de *S. Typhimurium*, inibiram em 100% a formação do biofilme. Foram observados que, o efeito do tratamento com OEZO sobre *S. Typhimurium* conseguiu diferir estatisticamente do controle positivo ($p < 0,0001$) e negativo ($p \leq 0,0013$). Frente ao biofilme formado por *S. aureus*, o OEZO conseguiu obter efeito inibitório mais efetivo quando comparado com efeito inibitório do antibiótico amoxicilina ($p < 0,0011$) (Figura 19). Além disso, OEZO também apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo do biofilme ($p < 0,0001$), além de inibir em 100% a formação do biofilme de *S. aureus*, para as concentrações testadas de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial. Os resultados indicam então, que o óleo obteve resultado positivo, principalmente frente as cepas de *S. aureus* e *S. Typhimurium*.

Figura 20. Teste de captação do cristal violeta submetido aos biofilmes bacterianos frente ao OEZO (1) *P. aeruginosa* (2) *S. aureus*.



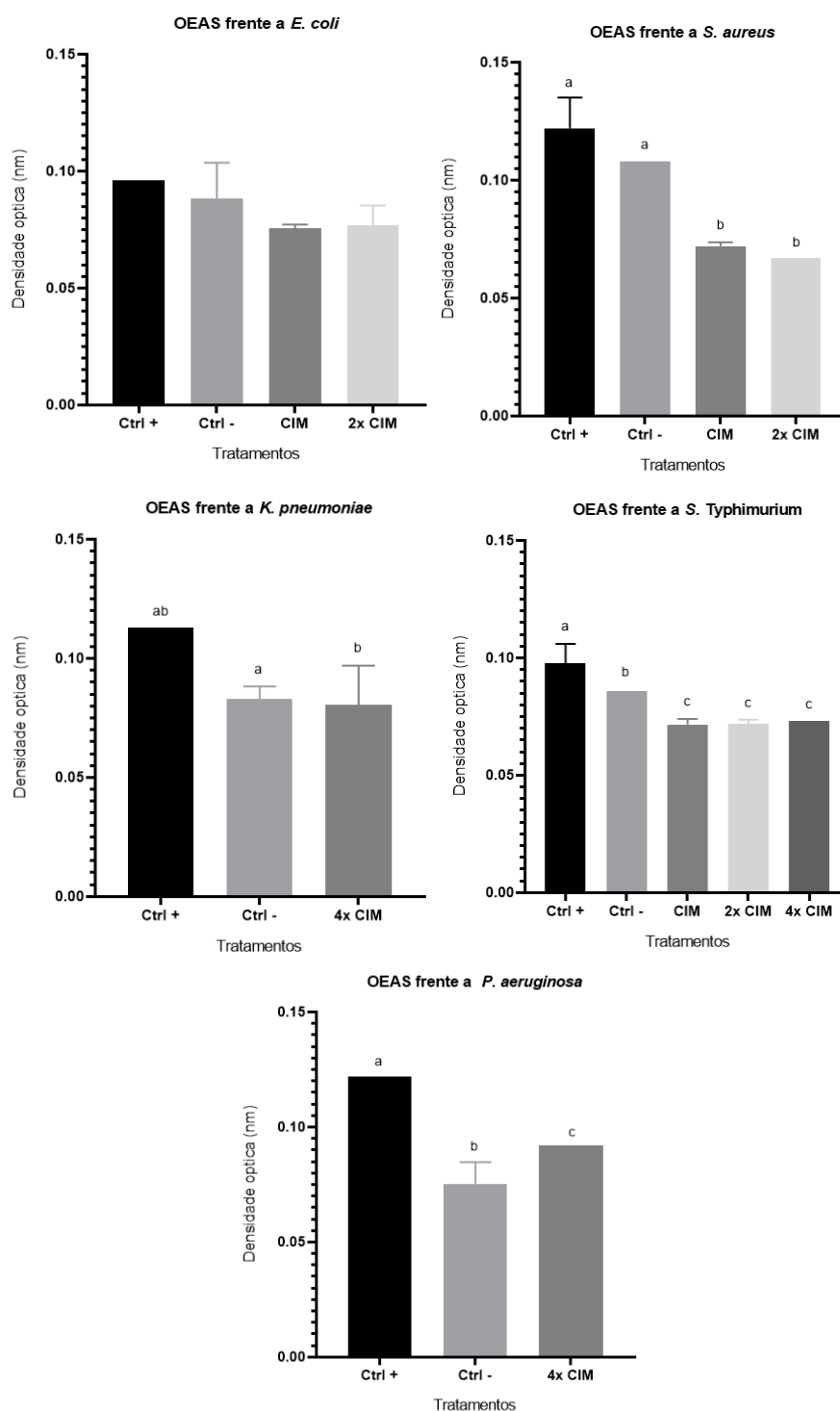
Fonte: Autora (2021)

Os tratamentos utilizando as concentrações subinibitórias (64 – 256 $\mu\text{g/mL}$) do OEAS frente a *S. Typhimurium*, obteve inibição em mais de 95% na formação do biofilme, diferindo dos controles positivos ($p < 0,0001$) e negativo ($p \leq 0,0157$). No entanto, para o biofilme formado por *E. coli*, mesmo com inibição em mais de 70% na formação do biofilme, as concentrações de CIM (64 $\mu\text{g/mL}$) e 2xCIM (128 $\mu\text{g/mL}$) do tratamento com o OEAS, não diferiram significativamente dos controles (Figura 20).

O biofilme formado por *S. aureus* foi sensível a todos os tratamentos com os óleos essenciais. O tratamento com OEAS, assim como para o tratamento com OEZO, todas as concentrações testadas (128 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$) conseguiu inibir em 100% a formação do biofilme. Além disso, as concentrações utilizadas conseguiram diferir significativamente do controle positivo ($P < 0,0001$) e do controle negativo ($p \leq 0,0007$).

Figura 210. Efeito do OEAS na formação do biofilme bacteriano. Estão indicados quais análises obtiveram inibição de 50% na formação do biofilme e diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e os controles (positivo e/ou

negativo). As barras indicadas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.



No entanto, para o biofilme formado por *P. aeruginosa*, observou-se a maior resistência a todos os tratamentos como os óleos essenciais. Porém, para

o tratamento com OEAS, constatou-se inibição satisfatória em pelo menos uma das concentrações testadas, assim como para *K. pneumoniae*. As concentrações de 4 µg/mL e 128 µg/mL, referente a 4xCIM, conseguiram inibir satisfatoriamente os biofilmes produzidos por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, respectivamente, no qual as taxas de inibição foram maiores que 90% para ambos os biofilmes. Para *P. aeruginosa*, o tratamento com 4xCIM conseguiu diferir dos controles positivos ($p = 0,0013$), diferindo negativamente do tratamento com antibiótico com $p = 0,0224$. No caso do biofilme formado por *K. pneumoniae*, o tratamento com o OEAS diferiu apenas do controle positivo ($p = 0,0173$).

6 DISCUSSÃO

A presente pesquisa analisou o perfil químico de diferentes plantas condimentares adquiridas na Feira de Orgânicos de Natal/RN para avaliação do seu efeito antibacteriano e antibiofilme. Os rendimentos foram calculados a partir do óleo essencial obtido em relação a massa fresca do vegetal utilizado.

Neste estudo, a partir de 500 g das folhas verdes de *R. officinalis* obteve-se o rendimento de 0,48%. Em estudos realizados por Cutrim et al. (2019), que também utilizaram a técnica hidrodestilação acoplada ao Clevenger, o rendimento foi de 0,3% com 200 g das folhas verdes de *R. officinalis*. Em análises realizadas por Okoh et al. (2010), os autores utilizaram dois métodos de extrações diferentes. Com 200g do material vegetal, obteve-se o rendimento de 0,31% e 0,39% pelas técnicas de hidrodestilação e destilação por micro-ondas, respectivamente. Já para o óleo extraído de 200 g de folhas secas de *R. officinalis*, Badar et al. (2007) obtiveram rendimento de 1,35%, utilizando a técnica hidrodestilação acoplada ao Clevenger, porém o rendimento, assim como para os demais autores, foi maior do que os apresentados no presente trabalho.

Vários estudos informam a presença de uma grande variedade de terpenos em plantas da família Lamiaceae, que possuem propriedades antibacterianas, antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias (NAGHIBI et al., 2005; ANDRADE et al., 2018). Cutrim et al. (2019) relataram a presença de 18 compostos no OERO provenientes de espécies coletadas em São Luís–MA. O CG/MS dos autores apontaram a Cânfora (37,00%), 1,8-Cineol (11,32%), α -Terpineol (7,12%), β -Cariofileno (6,43%) e a Verbenona (5,85%) como os constituintes majoritários. Estes resultados com os encontrados no presente trabalho, em que os compostos majoritários OERO incluíam a Cânfora (30,72%), 1,8-Cineol (17,63%) e a Verbenona (4,37%).

Diferenças na composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (OERO) podem ser observadas, devido a exposição de diferentes condições bióticas e abióticas. Análises cromatográficas realizadas por Satyal et al. (2017^b), a partir de *R. officinalis* cultivadas em diferentes países, constatou-se que apesar das variações, os óleos analisados possuíam maior concentração de α -Pineno (13,5%–37,7%), seguindo pelo 1,8-cineol (16,1%–29,3%), Verbenona (0,8%–16,9%), Borneol (2,1%–6,9%) e a Cânfora (0,7%–7,0%).

A presença de alguns terpenos, como o α -Pineno, pode explicar atividade antibacteriana de OERO. Estes compostos conseguem desorganizar a

membrana celular bacteriana, levando à lise celular (ZAOUALI et al., 2010). Compostos como o 1,8-cineol, Borneol, Canfeno e Cânfora também podem ter influência na ação antimicrobiana do OERO (GUIMARÃES et al., 2017). No estudo realizado por Hussain et al. (2010), os autores observaram que o OERO apresentou ação antibacteriana satisfatória e que o seu composto majoritário isolado, o 1,8-cineol, também demonstrou atividade antimicrobiana eficaz, quando comparados a ação do antibiótico Ciprofloxacino.

Em estudos realizados por Bajalan et al. (2017), os autores observaram que os óleos com melhores atividades antibacteriana apresentavam maior concentração de hidrocarbonetos monoterpênicos. Esses compostos provocam a perda da alta impermeabilidade da membrana para prótons e íons maiores, tornando o óleo mais permeável, facilitando a sua penetração em compostos lipídicos na membrana celular (DENYER; HUGO, 1991; ARANTES et al., 2016). Essa característica influencia os mecanismos de ação do OE frente a diferentes grupos de bactérias.

Na presente pesquisa, foram necessárias maiores concentrações do OERO (CIM 85,33 µg/mL), para inibir o crescimento das cepas de *E. coli*, em comparação as demais bactérias testadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2009), verificando maior susceptibilidade para as cepas de *S. aureus*, enquanto para *E. coli* foram necessárias concentrações 10x maiores de OERO para inibir o seu crescimento. Essa diferença provavelmente é referente à variação estrutural da parede bacteriana entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas: a parede celular das bactérias Gram-positivas possui diversas camadas de peptídeoglicanos, formando uma estrutura espessa e rígida; para as bactérias Gram-negativas, existem poucas camadas de peptideoglicanos e uma membrana externa. Esta variação pode acarretar maior resistências para as Gram – em comparação com as Gram + (MACEDO JÚNIOR, 2019).

O cultivo, local e época da colheita são fatores que afetam a composição química das plantas, assim como na atividade antimicrobiana. Por isso, os parâmetros para determinar os valores de CIM e CBM de óleos essenciais e extratos de *R. officinalis*, assim como para outras plantas, variam de acordo com os autores. Bajalan et al. (2017), avaliaram a relação entre a atividade antibacteriana e a composição química de sete populações *R. officinalis*. Os autores observaram que as espécies que apresentavam maior índice de 1,8-

cineol possuíam melhor efetividade contra *E. coli*, com CBM's variando de 2,5 - 20 µg/mL. Entretanto, as amostras que possuíam maior índice de α -Pineno, Canfeno e Verbenona obtiveram atividade fraca para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Com o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis atualmente, mais estudos têm sido realizados para controlar a formação de biofilmes (ALNI; GHORBAN; DADMANESH, 2020). Os biofilmes são a base de muitas doenças persistentes e contaminações de alimentos, desempenhando papel importante na patogenicidade, virulência e resistência (BAYATI, 2018; TEWARI et al., 2018; FARRAG et al., 2019). A maioria das infecções importantes é resultado da aderência bacteriana em alguma superfície do tecido (WIEDEMANN et al., 2014; SARKAR, 2016; GAMBOGOU et al., 2018).

Os grupos das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam diferenças bem documentadas em relação à composição membrana externa e nas características estruturais do biofilme. Isso influencia nas variações dos valores de CIM entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OYEDEJI et al., 2009; NAZZARO et al., 2013; DAS et al., 2019). Contudo, o OERO não apresentou efeito inibitório na formação do biofilme das cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*.

O OERO apresentou inibição do crescimento, mas apenas para o biofilme formado por *S. aureus*. O tratamento chegou a inibir 60% a formação do biofilme na concentração subinibitória de 4xCIM (32 µg/mL). Os resultados encontrados corroboram as observações realizadas por Ceylan et al. (2014), no qual o OERO apresentou atividade antibacteriana principalmente contra as bactérias Gram-positivas. Os autores observaram ainda a inibição de 60,76% na formação do biofilme de *S. aureus*, após o tratamento com OERO, utilizando a concentração de 1,25 µL/mL, bem abaixo da utilizada na presente pesquisa. Para o OERO analisado por Kanth et al. (2018), demonstrou inibição na formação de biofilme de duas bactérias Gram-positivas. Os biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, apresentaram inibição de 73,0% e 77,65%, respectivamente, em comparação com seus respectivos controles.

Freire et al. (2017) explicam que a atividade antibiofilme de *R. officinalis* pode ser atribuída aos terpenos, por possuírem caráter lipofílico. Os terpenos atuam em membranas biológicas, particularmente na matriz lipídica, reduzindo as interações hidrofóbicas, provocando desordens estruturais, osmóticas e

inibição de enzimas locais (DOOLAEGE et al., 2007; FERIRE et al., 2017). No presente trabalho, a classe dos terpenos constitui em mais de 94% o óleo essencial, divididos entre os monoterpenos (88,89%) e os sesquiterpenos (5,56%).

Em estudo realizado por Jardak et al. (2017), os autores relacionaram a inibição da formação do biofilme e a concentração de terpenos no OERO. Em análise da atividade antibiofilme, o OERO em questão apresentava altas concentrações de compostos monoterpênicos (62,28%). Os autores encontraram o efeito inibitório de 57,1% na formação de biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*, a uma concentração de 25 µL/mL. A inibição é atribuída principalmente à riqueza do óleo em hidrocarbonetos monoterpênicos, como 1,8-cineol (23,56%). Este mesmo composto apresentou concentração de 11,32% na composição total do óleo, podendo caracterizar a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas.

Por se tratar de um patógeno oportunista, isolados de *S. aureus* frequentemente estão envolvidos em casos de doenças agudas e crônicas, incluindo infecções supurativas, disseminadas e infecções mediadas por toxinas (MURRAY, ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Humanos são portadores assintomáticos de *S. aureus* enterotoxigênico no nariz, garganta e pele, facilitando a contaminação de alimentos por manipuladores (ANDRADE et al., 2019). Além disso, uma das DTAs mais comuns são causadas pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas de *S. aureus*, resultando em intoxicações alimentares (SILVA; FEITOSA; RODRIGUES, 2017). Devido ao seu perfil de resistência, *S. aureus* representa um risco para a saúde pública. Contaminações frequentes ocorrem em carnes, principalmente as fatiadas, leite e seus derivados, molhos, enlatados, presunto, salames e produtos de panificação (FORSYTHE, 2013).

Para o óleo essencial de *Zingiber officinale* (OEZO), dentre os 19 compostos identificados, foram observados como compostos majoritários o Geranial (29,82%), Neral (18,10%), ar-Curcumeno (8,25%), β-Bisaboleno (8,03%), β-Sesquifelandreno (6,89%) e Zingibereno (5,64%). Resultados semelhantes foram encontrados por Majolo et al. (2014), em que o OEZO coletados em Manaus/AM possuía 20 compostos identificados. Os autores identificaram o Geranial (23,9%), Neral (17,2%), 1,8-Cineol (16,0%) e o Canfeno (11,4%) como compostos majoritários.

Além de apresentar o Geranial (13,18%) como um dos compostos majoritários, Reis et al. (2020) identificaram no OEZO adquiridos em Itajuípe-BA a presença do α -Zingiberene (25,20%), Cis- β -Guaieno (9,08%) e o 1,8-Cineol (6,56%). Entretanto, outros compostos foram encontrados por Noori, Zeynali & Almasi (2018) em *Z. officinale* do Urmia-Irã. Sendo eles o β -Sesquifelandreno (12,74%), Hidrato de Sesquisabineno (6,19%), Canfeno (5,90%) e Zingiberenol (4,26%).

Dabague et al. (2013) afirmam que, normalmente, o OEZO acumula-se nos rizomas e apresentam os menores rendimentos dentre as espécies de plantas aromáticas. O óleo utilizado na presente pesquisa teve rendimento de 0,13% utilizando 500g do material fresco. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2014), que obtiveram rendimento de 0,13% com 540g do material submetido a extração por arraste de vapor, utilizando aparelho Clevenger modificado. Já no óleo analisado por Dhanik et al. (2017), os autores encontraram um rendimento de 0,2% para 200g de *Z. officinale* frescos, utilizando o mesmo método de extração do presente trabalho.

Na presente pesquisa, revelou-se que o OEZO apresentou atividade frente a cepas de importantes patógenos humanos e contaminantes de alimentos. Todas as cepas testadas apresentaram atividade antibacteriana, com destaque para *P. aeruginosa* e *E. coli*, com CIM e CBM inferiores a 8 $\mu\text{g/mL}$. No estudo realizado por Santos (2018), foram encontrados resultados semelhantes aos observados nesta pesquisa. Em análises realizadas com o OEZO, o autor relatou taxas de inibição satisfatórias para as cepas *E. coli* 0157:H7 (NCTC 12900), *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 15443), possuindo valores de CIM e CBM entre as concentrações de 2,3-18,7 $\mu\text{g/mL}$.

Pode-se relacionar a concentração dos diterpenos e sesquiterpenos fenólicos com a efetividade do OEZO (BERGER, 2007; LÓPEZ et al., 2017). No presente trabalho, foram detectadas altas concentrações de sesquiterpenos no OE analisado, corroborando os achados de Santos (2018). Estes compostos podem estar relacionados as propriedades lipofílicas do OE, que interagem com as membranas alterando a fluidez e permeabilidade (BERGER, 2007; LÓPEZ et al., 2017). Para Noori, Zeynali & Almasi (2018) e Calo et al. (2015), a presença dos sesquiterpenos β -Sesquifelandreno, α -Zingibereno e o Zingiberenol, podem estar associados as propriedades antibacterianas do OEZO.

No presente trabalho, dentre as bactérias Gram-Positivas e Gram-negativas testadas, *S. Typhimurium* apresentou menor sensibilidade ao óleo. Valores de CIM e CBM foram os maiores, quando comparados com as demais cepas testadas. Em pesquisa, Majolo et al. (2014), também observaram uma maior resistência de cepas de *Salmonella* spp., constatando atividade fraca a moderada do OEZO rico em Geranial e Neral, com valores de CIM e CBM variando entre 2500 – 10000 µg/mL. López et al. (2017) observaram que o efeito antibacteriano do OEZO apresenta diferenças significativas na inibição de Gram-positivas e Gram-negativas ($p < 0,0001$).

As cepas Gram-positivas são as mais suscetíveis, sugerindo que um dos alvos microbianos do OEZO é a parede celular (BERGER, 2007; LÓPEZ et al., 2017). Resultados encontrados por Şener et al. (2017), o OEZO apresentou resultados semelhantes ao presente trabalho, em que o OE não se mostrou eficaz para *S. Typhimurium*, *S. Kentucky*, *S. Infantis* e *S. Enteritidis*. Contudo, este mesmo óleo apresentou concentrações inibitórias de 100 µg/mL, 3,125 µg/mL, 100 µg/mL e 6,25 µg/mL para *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente.

Os biofilmes estão frequentemente associados a problemas envolvendo a segurança alimentar e degradação de alimentos (KASNOWSKI et al., 2010). As infecções em tecidos, trato urinário, placa dentária e infecções desencadeadas por dispositivos médicos causados pelos biofilmes também causam grandes preocupações para a saúde pública (COSTERTON et al., 1999; MENOITA et al., 2012). Mesmo que as cepas bacterianas possuam diferenças na intensidade da produção de biofilme, considerando as diferenças genéticas e fenotípicas, os biofilmes de forma geral são mais resistentes aos antimicrobianos, quando comparados as suas versões planctônicas (HASSAN et al., 2011; NEOPANE et al., 2018).

O tratamento com o OEZO conseguiu inibir a formação da maioria dos biofilmes testados. Para *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *S. Typhimurium*, todas as concentrações subinibitórias dos óleos apresentaram 100% de inibição do biofilme, conseguindo diferir dos controles positivos e negativos em todas as concentrações testada referentes aos CIM, 2xCIM e 4xCIM. A formação de biofilme é uma parte importante da infecção e resistência antimicrobiana (MAO et al., 2019). Além das cepas de *S. aureus*, as bactérias *K. pneumoniae* e *Salmonella* sp. possuem grande importância na segurança alimentar e clínica,

uma vez que provocam pneumonia, infecções do trato urinário e diarreias (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

A *Samonella* sp. é uma das principais causadoras de gastroenterites agudas, doença responsável por casos de morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente em crianças com até 5 anos de idade (BERN,1992; MAJOWICZ, 2010). Durante um levantamento bibliográfico realizado por Van Amson (2006), a *Salmonella* sp. é apontada como a segunda bactéria mais envolvida em surtos de DTAs causadas por agentes bacterianos no Paraná/BR, relacionada com cerca de 33,8% dos casos, ficando atrás apenas da bactéria *S. aureus*, com 41,2% dos casos.

Vários estudos abordam o uso de compostos bioativos naturais presentes nos OE para exibir atividade antimicrobiana. Em pesquisa realizada por Das et al. (2019), os autores observaram a maior porcentagem de inibição de biofilmes pelo OEZO frente a isolados MDR *S. aureus*, seguido por *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. A inibição na formação dos biofilmes teve média de 83-94%, em que dentre os óleos essenciais testados pelos autores, o OEZO demonstrou melhor efeito inibitório e contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em menores concentrações. A partir dos achados, atribuiu-se à presença de monoterpenos e sesquiterpenos, que representavam 99,7% do conteúdo de OE, tendo como compostos marjoritários os Zingiberene (29,6%), β -Sesquiphellandrene (11,4%), Camphene (9,1%) e Geranial (8,5%).

Cepas de *K. pneumoniae* são comumente descritos como patógenos oportunistas, envolvidos em casos de infecções nosocomiais como septicemia, abscessos hepáticos e pneumonia. Porém, há relatos de cepas de *K. pneumoniae* envolvidas em DTAs, como contaminantes de vegetais crus, carne, peixe e laticínios (NERES et al., 2019). Cepas resistentes a antibióticos já foram isolados de carnes e aves, indicando o potencial de *K. pneumoniae* como reservatório de genes de resistência na cadeia alimentar (HARTANTYO et al., 2020).

Estudos revelam que *Z. officinale* na forma *in natura* e seca, possui efeito inibitório no *quorum sensing*, importante mecanismo para a formação, desenvolvimento e na patogênese do biofilme (KUMAR et al., 2014; NIKOLIĆ et al., 2014). Alguns compostos de *Z. officinale* ainda possuem efeito na liberação extracelular de DNA pelo biofilme de *P. aeruginosa*, possivelmente em resposta

a presença do zingibereno (YAHYA; SAIFUDDIN; HAMID, 2013; SHAHWANY; TAWFEEQ; HAMED, 2016).

Das et al. (2019) encontraram resultados semelhantes aos apresentados no presente trabalho. A inibição do biofilme, pelo óleo essencial do rizoma de *Z. officinale*, demonstraram maiores porcentagens frente as cepas multirresistentes de *S. aureus* seguido por *Enterococcus faecalis*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Os autores relatam que, de maneira geral, o óleo se mostrou mais eficiente frente a biofilmes de bactérias Gram-positivas. Mas para todos os isolados, as taxas de inibição foram acima de 90%, provavelmente devido a presença de terpenos totais (sesquiterpenos e monoterpenos), que respondem por 99,7% do conteúdo de OEZO (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995; DAS et al., 2019).

O OE extraído a partir do rizoma *Z. officinale* é rico em terpenos, como o zingibereno, β -sesquifelandreno, neral, ar-curcumeno, geranial α -farneseno e o 1,8-cineol. Esses compostos são citados devido a eficácia como agentes antibacterianos e antifúngicos (SINGH et al., 2008; DAS et al., 2019). O OEZO analisado neste trabalho é composto em 94,7% de terpenos, possui atividade antibacteriana e antibiofilme satisfatória. Essa eficácia pode ser atribuída a ação dos monoterpenos, que afetam a membrana celular como agente tóxico e causam deformações da estrutura, reduzindo a função da membrana celular microbiana (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995; AVCIOGLU; SAHAL; BILKAY, 2016).

Para os biofilmes de *P. aeruginosa* e *E. coli* não foram observados efeitos satisfatórios do OEZO. As cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* são considerados como forte e moderado formadores de biofilmes, respectivamente (STEPANOVIĆ et al., 2000; HASSAN et al., 2011; NIKOLIĆ et al., 2014). Nikolić et al. (2014), relatam como capacidade de formação de biofilmes influenciam na atividade do extrato etanólico de *Z. officinale*. O extrato de *Z. officinale* utilizado no estudo demonstrou atividade moderada antibiofilme, reduzindo em 10,5% a formação de *P. aeruginosa* para a concentração de 20 mg/mL. Para as cepas de *E. coli*, não houve redução na produção de biofilme. Na presente pesquisa apenas a concentração de 4xCIM (16 μ g/mL) do OEZO conseguiu ter efeito inibitório frente o biofilme de *E. coli*.

Em óleo essencial de *Allium sativum* (OEAS) analisado, foram detectados 6 sinais em corrida cromatográfica, e identificados de acordo com a literatura o dialil trissulfeto (60,50%), dialil dissulfeto (18,22%) e o dialil alil trissulfeto

(12,62%), como os compostos majoritários. Os resultados observados em análise de CG/MS corroboram com os achados de Oliveira et al. (2018), em espécies coletadas em Manaus/AM. Os autores identificaram 6 compostos, tendo com majoritários o dialil trissulfeto (51,8%), dialil dissulfeto (23,2%) e metil alil trissulfeto (13,6%).

A comparação da composição dos óleos essenciais se torna difícil, visto que não é aplicado uma metodologia padrão para a extração. Para isso, Satyal et al. (2017^a) analisaram composições do OEAS coletados na Espanha e submetidos a diferentes métodos de extração. Componentes semelhantes foram encontrados em OEAS extraídos por hidrodestilação acoplado a Clevenger e a hidrodestilação industrial. Foram identificados o dialil trissulfeto (33,4%-31,2%), dialil dissulfeto (20,8%-25,9%) e o metil alil trissulfeto (19,2%-14,5%) como compostos majoritários. Entretanto, a extração por destilação a vapor industrial, resultou na identificação de dialil dissulfeto (27,9%), metil alil trissulfeto (17,7%) e o dialil trissulfeto (16,8%) como os componentes principais. Os óleos essenciais obtidos apresentaram rendimento de 0,2%, 0,22% e 0,18%, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Dziri et al. (2014), com rendimento de 0,1% do óleo essencial obtido de 100g de *A. sativum* seco. Por ser extremamente rico em substâncias biologicamente ativas com diversos efeitos terapêuticos, *A. sativum* é um recurso promissor na busca por novas alternativas contra bactérias patogênicas. Pesquisas demonstram que a alicina (dialil dissulfeto), um dos principais compostos antibacterianos do alho fresco, inibe uma variedade de agentes infecciosos de forma significativa (FUJISAWA et al., 2009; GOUVEIA, 2010; BAYAN et al., 2014; BORLINGHAUS et al., 2014; BHARWAJ et al., 2016; LEONTIEV et al. 2018; REITER et al., 2020; MAGRYŚ; OLENDER; TCHÓRZEWSKA, 2021).

Muitas enzimas sulfidrilas bacterianas são oxidadas e inibidas quando expostas à alicina, reduzindo a atividade enzimática e o metabolismo bacteriano (MAGRYŚ; OLENDER; TCHÓRZEWSKA, 2021). Os princípios ativos presentes no *A. sativum* responsáveis pela atividade antibacteriana, assim como alguns antibióticos de origem sintética, reagem com a cisteína, não estando demonstrada a razão para essa reação, mas acreditando-se que se deve a uma inibição enzimática (EL-SABER BATIHA, 2020). A cisteína é um aminoácido

presente em vários alimentos, que apresenta um importante grupo tiol (-SH) (GOUVEIA; SÁ; HENRIQUES, 2012).

Em análises para atividade antibacteriana do OEAS, a cepa de *P. aeruginosa* demonstrou alta sensibilidade ao tratamento, quando comparada com as demais cepas testadas, com valores de CIM e CBM abaixo de 2 µg/mL. Em pesquisa realizada por Arasu et al. (2019), o OE de duas espécies do gênero *Allium* (*A. calamus* e *A. sativum*), inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*, se mostrando altamente sensível dentre as cepas testadas, apresentando CIM de 18,9 µg/mL.

Para a cepa de *S. aureus*, as concentrações de CIM para OEAS foram de 213,33 µg/mL, sendo muito maior do que os valores observados para as outras bactérias-teste. Oliveira et al. (2018), analisaram cepas de *E. coli* e *S. aureus* frente ao óleo de *A. sativum*, observando melhor eficiência do OE frente as cepas de *E.coli*. O OEAS apresentou CIM nas concentrações de 25 µg/mL frente a cepa. Para a cepa de *S. aureus*, o OE apresentou CIM de 100 µg/mL, quatro vezes maior quando comparado a cepa de *E. coli*.

O maior efeito preventivo pode ser devido ao efeito bactericida do alho na fase planctônica e, posteriormente, à interferência na etapa de fixação inicial que é essencial para a formação do biofilme (NIDADAVOLU et al., 2012; FARRAG et al., 2019). O OEAS extraído e submetido a avaliação da atividade antibiofilme, apresentou inibição do biofilme formado por todas as cepas testadas. Alni, Ghorban & Dadmanesh (2020) observaram redução significativa na formação de biofilme por cepas de *Salmonella* sp. testadas frente ao OEAS rico em dialil tetrassulfeto (29,47%) e alil dissulfeto (22,49%) com inibição em 60% do biofilme formado.

A alicina é citada por Alni, Ghorban & Dadmanesh (2020) e Zainal et al. (2021) como um dos principais componentes do OEAS, podendo ser o fator determinante para o controle de biofilmes de *Salmonella* sp. e *E. coli*, por exemplo. O efeito satisfatório do tratamento com OEAS foi observado na inibição do biofilme produzido por *S. Typhimurium*. Todas as concentrações testadas conseguiram inibir em mais de 95% no biofilme produzido por *S. Typhimurium*, além disso, o tratamento conseguiu diferir positivamente dos controles, sendo mais efetivo que o antibiótico utilizado. Biofilmes formados por *Salmonella* spp. são comunidades complexas, que participam da resistência e persistência em

determinados ambientes, principalmente em indústrias de processamento de alimentos (STEENACKERS et al., 2012; SALEM et al., 2017).

A formação do biofilme pode ser considerada como fator de cronicidade para doenças causadas por essas bactérias. Bhatwalkar et al. (2019) também observaram efeitos antibiofilme do *A. sativum*, relatando pela primeira vez a atividade contra cepas *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), responsáveis por quadros de colite hemorrágica e diarreia (KAPER; NATARO; MOBLEY; 2004; BHATWALKAR et al., 2019). Os autores observaram que a concentração de 4% (v/v) do extrato *A. sativum* inibiram a formação de todos os isolados biofilmes das cepas de STEC, demonstrando redução da formação de biofilme na presença dos organossulfurados.

Pesquisas tratam da atividade antibiofilme de OEAS sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sob condições quimiopreventivas e quimioterápicas (NIDADAVOLU et al., 2012; RATTHAWONGJIRAKUL; THONGKERD, 2016; FARRAG et al., 2019). O *A. sativum* é um alimento rico em vitaminas, minerais e em compostos com atividade antibacteriana e antibiofilme (LU et al., 2019). Chen et al. (2018) explicam que produtos naturais ou agentes derivados de alimentos, principalmente o *A. sativum*, estão atraindo grande atenção por apresentar compostos com grande potencial antimicrobiano e nutracêutico (RATTHAWONGJIRAKUL; THONGKERD, 2016; FARRAG et al., 2019).

Na presente pesquisa, observou-se ação efetiva do OEAS na inibição do biofilme produzido por *S. aureus*, com o efeito do tratamento sendo melhor do que o tratamento com o antibiótico e o controle positivo, além de apresentar inibição de 100% nas concentrações de CIM (128 mg/mL) e 2xCIM (256 mg/mL). Ratthawongjirakul e Thongkerd (2016) encontraram inibição média de $69,55 \pm 0,1\%$ em biofilmes formados por *S. aureus* e *E. coli*, após serem submetidos aos tratamentos com 50% extrato metanólico de *A. sativum*, no qual a alicina estava presente em $25,59 \pm 0,5\%$ da composição total do óleo de alho.

Farrag et al. (2019) também avaliaram a extratos frescos de *A. sativum* a partir das subconcentrações de CIM para as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* (CIM 16 mg/mL), *Serratia marcescens*, *S. aureus* MRSA (CIM 32 mg/mL) e *K. pneumoniae* (CIM 64 mg/mL). O efeito na redução da formação do biofilme foi observado com 1/2 CIM contra todas as cepas/teste, com melhores efeitos frente

a *S. mariscens* (66%) seguido por *K. pneumoniae* (61%), *E. coli* (57%), *S. aureus* (56%) e *P. aeruginosa* (55%).

Para o gênero *Staphylococcus*, a produção de biofilmes é um importante fator de virulência (CUCARELLA et al., 2002; DI CICCIO et al., 2015). *S. aureus* é conhecido por ser um organismo altamente adaptável, no qual o seu biofilme consegue se estabelecer em vários ambientes (RODE et al., 2007; DI CICCIO et al., 2015). Biofilmes de *S. aureus* tem sido registrado na contaminação de alimentos congelados, de origem animal, matérias-primas, em locais de processamento de alimento e circulação de mercadorias (XU et al., 2011; SOUZA et al., 2014; MIAO et al., 2019). Surtos alimentares causados por *S. aureus* são frequentes, no qual uma investigação revelou que a intoxicação alimentar por *S. aureus* acarretou morbidade de 2.431 pessoas, tendo a carne contaminada como o principal veículo (65,71%) (MIAO et al., 2019).

A atuação de algumas plantas medicinais indianas, incluindo *A. sativum*, são relatados em relação ao seu efeito antibiofilme (LU et al., 2019). O uso de compostos organossulfurados do *A. sativum*, no desenvolvimento de novos agentes com atividade antibiofilme é promissor. Estes compostos podem alterar composição do biofilme, mais especificamente, atuam reduzindo o teor de carboidratos (BHATWALKAR et al., 2019). Contudo, muitas propriedades ainda não estão totalmente descritas. Como por exemplo, os mecanismos moleculares envolvidos no controle e perturbação da sinalização *quorum sensing* ou as estruturas moleculares dos compostos bioativos que exerceram a atividade antibiofilme (LU et al., 2019).

No presente estudo, o óleo essencial de *A. sativum* foi o único que conseguiu inibir satisfatoriamente a formação do biofilme de *P. aeruginosa* na concentração de 16 µg/mL (4xCIM). O tratamento com OEAS conseguiu diferir do controle positivo. As cepas de *P. aeruginosa* formam biofilmes resistentes e com alta taxa de crescimento. Devido à alta resistência, os biofilmes de *P. aeruginosa* conseguem se estabelecer de forma recorrente e persistente em diversos tipos de ambientes, fato que não é necessariamente observado nas mesmas bactérias quando se desenvolve na forma planctônica (CAIXETA et al., 2019).

A *P. aeruginosa* é conhecida por deteriorar alimentos de origem animal e produzir importantes toxinas envolvidas em intoxicações alimentares. Esta bactéria pode multiplicar-se em condições de baixas concentrações de

nutrientes e são descritas como psicotróficas, uma característica significativa para a contaminação de pescados, leite e carnes. Após a contaminação com *P. aeruginosa*, há a produção de aromas anormais (aldeídos, cetonas e ésteres) e aminas biogênicas, identificados nas intoxicações alimentares. Além disso, a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas termotolerantes reduzem a qualidade e vida de prateleira do produto processado (BRUCKNER et al., 2012).

A alicina é citada por autores para justificar a inibição da formação de biofilmes pelo OEAS (FARRAG et al., 2019). Devido as características hidrofóbicas, a alicina consegue facilmente penetrar na estrutura dos exopolissacarídeos (EPS) no biofilme e interagir com moléculas microbianas (MIRON et al., 2000; ZAINAL et al., 2021). Em níveis subinibitórios, este composto inibe a aderência, além de atuar regulando negativamente a expressão de genes do biofilme (WU et al., 2015; FARRAG et al., 2019). Registra-se que a alicina também inibe síntese de RNA e a biossíntese de lipídios, provocando danos à parede celular em muitas bactérias (FELDBERG et al., 1988; GHANNOUM, 1988; SUBBANNA; GOPENATH; BASALINGAPPA, 2020).

Resultados encontrados no presente trabalho, tiveram que a alicina é a segunda substância em maior concentração do OEAS, com 18,22%. Assim como apontado por diversos autores, a alicina poder ser indicada como um dos principais fatores na inibição da formação de biofilmes bacterianos, podendo atuar de forma sinérgica ou individual com os demais compostos do OEAS (MIRON et al., 2000; ZAINAL et al., 2021).

7 CONCLUSÃO

- Os óleos essenciais extraídos de *R. officinalis*, *A. sativum*, *Z. officinale* demonstraram ser ricos em compostos monoterpenos, sesquiterpenos e substâncias organossulfuradas, substâncias que apresentam diversas atividades biológicas;
- O óleo essencial de *R. officinalis* apresentou efeito satisfatório contra as células planctônicas das cepas testadas, possivelmente pela presença do 1,8-cineol, Borneol, Canfeno e Cânfora;
- Em testes com biofilmes, o óleo essencial de *R. officinalis* conseguiu inibir apenas o biofilme formado por *S. aureus*. Mesmo assim, os tratamentos com o 2xCIM e 4xCIM conseguiram ser mais efetivos em comparação ao antibiótico;
- O óleo essencial de *Z. officinale* conseguiu ter, em concentrações mínimas satisfatórias, efeitos bactericidas, bacteriostáticos e antibiofilme frente a quase todas as cepas testadas;
- Com exceção do biofilme formado por *P. aeruginosa*, o *Z. officinale* inibiu em 100% a formação dos biofilmes em pelo menos uma das concentrações subinibitórias utilizadas, apresentando diferença estatística do tratamento com o antibiótico.
- A alta concentração da Alicina pode estar relacionada com a expressiva atividade antibacteriana do óleo essencial de *Allium sativum* frente as bactérias *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*;
- O óleo essencial de *A. sativum* foi efetivo na inibição de todos os biofilmes, com índices chegando a mais de 70% de inibição, em pelo menos uma das concentrações testadas. E para o tratamento frente ao biofilme formado por *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, o *A. sativum*;
- O uso dos óleos essenciais de *Z. officinale* e *A. sativum* na prevenção da formação de biofilmes em alimentos demonstra o potencial que estes óleos apresentam na conservação de alimentos, visto a atividade satisfatória frente a bactérias e biofilmes envolvidos em contaminações alimentares, necessitando então, de estudos mais aprofundados que comprovem a sua efetividade.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho forneceu dados sobre o potencial dos óleos essenciais de planta condimentares contra bactérias, que são comumente encontradas como contaminantes de alimentos e que provocam ou envolvem graves infecções bacterianas. Com a proposta de desenvolver novas alternativas para a conservação de alimentos, utilizando os óleos essenciais, os resultados encontrados na presente pesquisa poderão servir para que pesquisadores avaliem a efetividade destes óleos essenciais em diferentes parâmetros, como na inibição de crescimento bacteriano em modelos alimentares e toxicidade do óleo essencial em modelos *in vivo*.

O desenvolvimento de alternativas para inibição e erradicação de bactérias será uma necessidade cada vez mais urgente. Os seguimentos nas áreas da química, bioquímica, farmacologia, informática e biologia, fornecem informações importantes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008). Por isso, pesquisas devem abranger a interdisciplinaridade, para que os dados cada vez mais completos e confiáveis sejam fornecidos, auxiliando na aprovação e comercialização de novos antibacterianos.

REFERÊNCIAS

- ACHINAS, S.; CHARALAMPOGIANNIS, N.; EUVERINK, G. J. W. A brief recap of microbial adhesion and biofilms. **Applied Sciences**, v. 9, n. 14, p. 2801, 2019.
- ACOSTA, R. G.; VARGAS, C. M. Mecanismos de resistência bacteriana. **Diagnóstico**, v. 57, n. 2, p. 82-86, 2018.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1th ed ed. Carol Stream, Ill: Allured Pub. Corp, 2017.
- AHMAD, I.; KHAN, M.S.A.; HUSAIN, F.M.; ZAHIN, M.; E SINGH, M. Bacterial quorum-sensing and its interference: methods and significance. **Microbes and Microbial Technology**, p.127-161, 2011.
- ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, M. D. S. V.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; SILVA, D. F.; MACEDO-COSTA, M. R. Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. Sobre microorganismos do biofilme dental. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 1, p. 21-5, 2010.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem**, v.49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALLCOCK, S.; YOUNG, E. H.; HOLMES, M.; GURDASANI, D.; DOUGAN, G.; SANDHU, M. S.; ...; TÖRÖK, M. E. Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities. **Global health, epidemiology and genomics**, v. 2, n. 4, p. 1-7, 2017.
- ALMEIDA, G. D.; GODOI, E. P.; SANTOS, E. C.; LIMA, L. R. P. D.; OLIVEIRA, M. E. D. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 34, n. 4, p. 487-492, 2013.
- ALNI, R. H.; GHORBAN, K.; DADMANESH, M. Combined effects of *Allium sativum* and *Cuminum cyminum* essential oils on planktonic and biofilm forms of *Salmonella* Typhimurium isolates. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 1-10, 2020.
- AL-SEREITI, M.R.; ABU-AMER, K.M., SEM, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J. Exp. Biol.** v.37, n. 2, p. 124–130, 1999.
- ANAND, U.; JACOBO-HERRERA, N.; ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
- ANDRADE JÚNIOR, F. P.; DE MEDEIROS LIMA, B. T.; ALVES, T. W. B.; DA SILVA MENEZES, M. E. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 1, p. 89-93, 2019.
- ANDRADE, J. M.; FAUSTINO, C.; GARCIA, C.; LADEIRAS, D.; REIS, C. P.; RIJO, P. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, 2018.
- ANG-LEE, M. K.; MOSS, J.; YUAN, C. S. Herbal medicines and perioperative care. **Jama**, v. 286, n. 2, p. 208-216, 2001.

ANGLES, E. Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana: ¿ hacia dónde vamos?. **Revista Medica Herediana**, v. 29, n. 1, p. 3-4, 2018.

ARANTES, V. P.; DOS SANTOS, L. F.; DA SILVA DINIZ, K.; DA SILVA, G. O.; COSTA, G. M. Estudo comparativo da atividade antibacteriana de extratos vegetais de *Senna spectabilis*, *Rosmarinus officinalis* e *Eugenia uniflora* frente à cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, 2016.

ARASU, M. V.; VIAYARAGHAVAN, P.; ILAVENIL, S.; AL-DHABI, N. A.; CHOI, K. C. Essential oil of four medicinal plants and protective properties in plum fruits against the spoilage bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 54-62, 2019.

ARAÚJO, E.C.; OLIVEIRA, R. A. G.; CORIOLANO, A. T.; ARAÚJO, E.C. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.

ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N. D.; BIGI, M. D. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2015.

AVCIOGLU, N. H.; SAHAL, G.; BILKAY, I. S. Antibiofilm Effects Of *Citrus limonum* And *Zingiber officinale* Oils On Biofilm Formation Of *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca* And *Klebsiella terrigena* Species. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 6, p. 61-67, 2016.

AYSE, N.; DUYGU, A.T.; HAKKÝ, A.I.; TANSEL, O.Y.; ÝSMET, D.G.; ISMAIL, K. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Zingiber officinalis* extracts, **FABAD J Pharm Sci**, v.33, n. 2, p. 77-86, 2008.

AZADPOUR, M.; AZADPOUR, N.; BAHMANI, M.; HASSANZADAZAR, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; NAGHDI, N. Antimicrobial effect of Ginger (*Zingiber officinale*) and mallow (*Malva sylvestris*) hydroalcoholic extracts on four pathogen bacteria. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 1, p. 181-187, 2016.

BAJALAN, I.; ROUZBAHANI, R.; PIRBALOUTI, A. G.; MAGGI, F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. **Industrial crops and products**, v. 10, n. 7, p. 305-311, 2017.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBEK, S.; AVERBEK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.

BAPTISTA, A. B. As bactérias multirresistentes hospitalares e as plantas medicinais. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 1-2, 2017

- BARRETO, A.M.C.; TOSCANO, B.A.F.; FORTES, R.C. Efeitos do gengibre (*Zingiber officinale*) em pacientes oncológicos tratados com quimioterapia. **Com. Ciências Saúde**, v. 22, n. 3, p. 257-270. 2011.
- BARTWAL, A.; MALL, R.; LOHANI, P.; GURU, S. K.; ARORA, S. Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **Journal of plant growth regulation**, v. 32, n. 1, p. 216-232, 2013.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.
- BAYAN, L.; KOULIVAND, P.H.; GORJI, A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1, 2014.
- BAYATI, S.A.L. Antibacterial effect of ethanolic extract of *Allium sativum* on biofilm forming *Staphylococcus aureus* which causes folliculitis. **Int. J. Curr. Microbiol. App**, v.7, n.1, p. 1904–1913, 2018.
- BAYDAR, H. A. S. A. N.; ÖZKAN, G.; ERBAŞ, S.; ALTINDAL, D. Yield, chemical composition and antioxidant properties of extracts and essential oils of sage and rosemary depending on seasonal variations. In: **I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs 826**. 2007. p. 383-390
- BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 65, p. 26-29, 1999.
- BEGUM, A.; SANDHYA, S.; VINOD, K. R.; REDDY, S.; BANJI, D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria**, v. 12, n. 1, 2013.
- BENDAOUD, H.; BOUAJILA, J.; RHOUMA, A.; SAVAGNAC, A.; ROMDHANE, M. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.89, n. 8, p. 1202-1297, 2009.
- BENKEBLIA, N.; LANZOTTI, V. *Allium* Thiosulfinates: Chemistry, Biological Properties and their Potential Utilization in Food Preservation. **Food**. v.1, n. 2; 193-201, 2007.
- BERGER, R.G. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: **Flavors and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing, and Sustainability**, Springer, Berlin, 88- 90, 2007.
- BETTS, J.W.; WAREHAM, D.W. In vitro activity of curcumin in combination with epigallocatechin gallate (EGCG) versus multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiol**. v. 14, n. 1, p. 1-5, 2014.
- BHARWAJ, M.; SINGH, B.R.; SINHA, D.K.; KUMAR, V.; PRASANNA, V.O.R.; VARAN, S.S.; NIRUPAMA, K.R.; PRUTHVISHREE, A.S.B.S. Potential of herbal drug and antibiotic combination therapy: a new approach to treat multidrug resistant bacteria. **Pharm Anal Acta**, v.7, n.11, 2016.
- BHATWALKAR, S. B.; GOUND, S. S.; MONDAL, R.; SRIVASTAVA, R. K.; ANUPAM, R. Anti-biofilm and antibacterial activity of *Allium sativum* against drug resistant shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from patient samples and food Sources. **Indian journal of microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171-179, 2019.

- BORGES, Á. D. L.; PONTE, G. D.; FEDERMAN NETO, A.; CARVALHO, I. Síntese de sulfadiazina e sulfadiazina de prata em escala semi-micro: prática experimental em síntese de fármacos. **Química Nova**, v. 28, p. 727-731, 2005.
- BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários De Plantas Secondary Plant Metabolites. **Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- BORGES, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; PEREIRA, A. C. M.; KEITA, H.; CARVALHO, J. C. T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of ethnopharmacology**, v. 229, p. 29-45, 2019.
- BORLINGHAUS, J.; ALBRECHT, F.; GRUHLKE, M.C.; NWACHUKWU, D.; SLUSARENKO, A.J. Allicin: chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12591-12618, 2014.
- BORTOLUZZI, M. M.; SCHMITT, V.; MAZUR, C. E. Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, p. 291-04, 2020.
- BOXALL, A. B.; JOHNSON, P.; SMITH, E. J.; SINCLAIR, C. J.; STUTT, E.; LEVY, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2288-2297, 2006.
- BRATMAN, S. **Guia prático de medicina alternativa: uma avaliação realista dos métodos alternativos de cura**. Rio de Janeiro: Campus, 1998.
- BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C., MARCELINO DOS SANTOS SILVA, P., FELIX DE OLIVEIRA, W., DE MOURA, M. C., VIANA PONTUAL, E., SOARES GOMES, F., ... & DOS SANTOS CORREIA, M. T. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.
- BRUCKNER, S.; ALBRECHT, A.; PETERSEN, B.; KREYENSCHMIDT, J. Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. **Journal of Food Quality**, v. 35, n. 5, p. 372-382, 2012.
- BUKAR, B.B.; DAYOM, D.W.; UGURU, M.O. The growing economic importance of medicinal plants and the need for developing countries to harness from it: A mini review. **IOSR Journal of Pharmacology**, v.6, p. 2250-3013, 2016.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3 p.223–253, 2004.
- BUSSMANN, R.W. Modern Trends in Applied Terrestrial Ecology. **Ethnobotany and Biodiversity Conservation**. p.345-362, 2002.
- BYLKA, W., MATLAWSKA, I., & PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Jana**, v. 7, n. 2, p. 24-31, 2004.
- CAIXETA, M. A.; BRAGA, A.; ALMEIDA, D.; PINTO, O.; SANTANA, E.; NAVES, P. Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019.
- CALDAS, F. F.; SILVA FILHO, J. P.; RODRIGUES, C. A. R.; DA SILVA, D. P. Atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* L.) frente a bactéria causadora de infecção do trato urinário. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 217-224, 2019.

- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. **Food control**, v. 54, p. 111-119, 2015.
- CARDOSO, E.S.; ROSSI, A.A.B.; PEDRI, E.C.M.; BISPO, R.B.; OLIVEIRA, U.A.; SILVA, V.P. Conhecimento e uso do gengibre por familiares de alunos de duas unidades escolares de Alta Floresta/MT. **GAIA SCIENTIA**, v. 12, n. 3, p.145-154. 2018.
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E.; CARDOSO, F. D. C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, p. 124-132, 2019.
- CARVALHO, A. C.; RIBEIRO, R. A.; ZAGO, S.; BONNAS, D. Formação e Resistência do Biofilme Microbiano em Indústrias Processadoras de Alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, p. 311-325, 2019.
- CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.
- CARVALHO, N. P. B. D.; SANTOS, A. N. D. S.; PINHEIRO, E. O.; LEAL, L. R. D. A. Potencial antioxidante e antimicrobiano de óleos essenciais de especiarias: uma revisão. **Hig. aliment**, p. 12-20, 2016.
- CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56-70, 2019.
- CEYLAN, O.; UĞUR, A.; SARAÇ, N.; OZCAN, F.; BAYGAR, T. The in vitro antibiofilm activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against multiple antibiotic resistant *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus* sp. **J. Food. Agric. Environ**, v. 12, p. 82-86, 2014.
- CHAKOTIYA, A. S.; TANWAR, A.; NARULA, A.; SHARMA, R. K. Zingiber officinale: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 254-260, 2017.
- CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Essential oils: A natural alternative to combat antibiotics resistance. **Antibiotic Resistance-Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**; Kon, K., Rai, M., Eds, p. 227-237, 2016.
- CHEN, C.; LIU, C. H.; CAI, J.; ZHANG, W.; QI, W. L.; WANG, Z.; YANG, Y. Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. **Food Control**, v. 86, p. 117-125, 2018.
- CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 212-229, 2011.
- CHEN, H.; WUBBOLTS, R. W.; HAAGSMAN, H. P.; VELDHUIZEN, E. J. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10446, 2018.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, 2008.

CITRON, D. M.; GOLDSTEIN, E. J.; MERRIAM, C. V.; LIPSKY, B. A.; ABRAMSON, M. A. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. **Journal of clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2819-2828, 2007.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 28th informational supplement, MS100-S28. CLSI, Pennsylvania, USA, 2018

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Orgs.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp. 2010.

COMISSAO PERMANENTE DA FARMACOPEIA PORTUGUESA. **Farmacopeia Portuguesa**. Ministério da Saúde, 7th Edition Lisbon, Portugal (2003).

CONSTANT J. M. C.; CONSTANT A.B. **Antibióticos e quimioterápicos antimicrobianos**. 2ª edição são Paulo: Sarvier, 2015

COPPO, E.; MARCHESE, A. Antibacterial activity of polyphenols. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 380-390, 2014.

CORRÊA, J. C. **Antibióticos no dia-a-dia**, 3a Ed., Rio de Janeiro: Livraria e Editora Rubio, 2004.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onion and garlic. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.12, p.609-625, 2007.

COSTA FIEBELKORN, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

COSTA, J. C. F. D.; HOSCHIED, J. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*, **Revista Fitos**, n.12, v.2, p.175-185, 2018.

COSTERTON, J.W. et al Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUCARELLA, C.; TORMO, M. Á.; KNECHT, E.; AMORENA, B.; LASA, Í.; FOSTER, T. J.; PENADÉS, J. R. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. **Infection and immunity**, v. 70, n. 6, p. 3180-3186, 2002.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; DOS SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

CUNHA, A.P., RIBEIRO, J.A., ROQUE, O.R. **Plantas Aromáticas em Portugal – Caracterização e Utilizações** (2ª Edição). Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia** (2ª Edição). Fundação Calouste Gulbenkian, 2006.

CUSHNIE, T. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 5, p. 377-386, 2014.

CUTLER, R.R.; WILSON, P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **British journal of biomedical Science**, v. 61, n.2, p.71-4, 2004.

CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK FILHO, V. E.; EVERTON, G. O. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Hydroalcoholic Extracts of *Zingiber officinale* (Ginger) and *Rosmarinus officinalis* (Rosemary). **Rev. Virtual Quim** 2019, v. 11, n. 1, p. 60-81, 2019.

DABAGUE, I. C. M.; DESCHAMPS, C.; MACHADO, M. P.; CÔCCO, L. C. Rendimento do óleo essencial de *Zingiber officinale* em resposta a diferentes processamentos e tempos de extração yield of *Zingiber officinale* essential oil in response to different processing methods and extraction times. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 11, p. 163-168, 2013.

DAS, A.; Dey, S.; Sahoo, R. K.; Sahoo, S.; Subudhi, E. Antibiofilm and Antibacterial Activity of Essential Oil Bearing *Zingiber officinale* Rosc. (Ginger) Rhizome Against Multi-drug Resistant Isolates. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 4, p. 1163-1171, 2019.

DAS, A.; DEY, S.; SAHOO, R. K.; SAHOO, S.; SUBUDHI, E. Antibiofilm and antibacterial activity of essential oil bearing *Zingiber officinale* Rosc.(Ginger) rhizome against multi-drug Resistant isolates. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 4, p. 1163-1171, 2019.

DAVISON, H. C.; WOOLHOUSE, M. E.; LOW, J. C. What is antibiotic resistance and how can we measure it?. **Trends in microbiology**, v. 8, n. 12, p. 554-559, 2000.

DELGADO, B.; FERNÁNDEZ, P. S.; PALOP, A.; PERIAGO, P. M. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 327-334, 2004.

DENYER, S. P.; HUGO, W. B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In S. P. Denyer, & W. B. Hugo (Eds.), Mechanisms of action of chemical biocides (pp. 171–188). **Society for Applied Bacteriology. Technical Series**, v. 27, p. 171-187, 1991.

DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 7, p. 1014-1021, 2014.

- DHANIK, J.; VERMA, A.; ARYA, N.; NAND, V. Chemical profiling and antioxidant activity of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe from two different altitudes of Uttarakhand. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 6, p. 1547-1556, 2017.
- DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930-936, 2015.
- DIGGLE, S. P.; CRUSZ, S. A.; CÁMARA, M. Quorum sensing. **Current Biology**, v. 17, n. 21, p. 907-R910, 2007.
- DOMINGOS, T. D. S.; BRAGA, E. M. Significado da massagem com aromaterapia em saúde mental. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, n. 6, p. 579-584, 2014.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- DOOLAEGE, E.H; RAES, K.; SMET, K.; ANDJELKOVIC, M.; VAN POUCKE, C.; DE SMET, S. Characterization of two unknown compounds in methanol extracts of rosemary oil. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 18, p. 7283-7. 2007.
- DOUGHARI JH. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In: *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Rao V (Ed.). **InTech, Rijeka, Croatia**, p.1–32, 2012.
- DUARTE, K. M. R.; PACHOAL, J. A. R.; GOMES, L. H. Imunoensaios e Zootecnia: Aplicações práticas. **Boletim de Indústria Animal**, v. 63, n. 2, p. 121-130, 2006.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n.1 p. 17, 2006.
- DZIRI, S.; CASABIANCA, H.; HANCHI, B.; HOSNI, K. Composition of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) as influenced by drying method. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 2, p. 91-96, 2014.
- E. D. BROWN AND G. D. WRIGHT, **Nature**, 2016, 529, 336–343. 2 A. Fleming, E. B. Chain and H. Florey, Sir Alexander Fleming- Nobel Lecture: Penicillin, Nobel Lectures, 1964.
- EFS (European Food Safety) et al. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 17, n. 12, 2019.
- ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras**. In: RIBEIRO, D. *Suma etnológica brasileira*. Petrópolis: Vozes, 1997.
- ELLMORE, G.; FELDBERG, R. Alliin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *American Journal of Botany*, v. 81, n. 1, p. 89-94, 1994.
- EL-SABER BATIHA, G.; MAGDY BESHBIHY, A.; G WASEF, L.; ELEWA, Y. H.; A AL-SAGAN, A.; EL-HACK, A.; PRASAD DEVKOTA, H. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. *Nutrients*, v. 12, n. 3, p. 872, 2020.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 6, p. 1015-1019, 2016.

ENDO, E. H., COSTA, G. M., MAKIMORI, R. Y., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., & DIAS FILHO, B. P. Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. **Journal of herbal medicine**, v. 14, p. 48-54, 2018.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FARIAS, M. R.; SANTOS, R. I. D.; FARIAS, M. R.; PUPO, G. D.; TRINDADE, M. C. N. D.; DUTRA, F. F. **Assistência Farmacêutica no Brasil-Política, Gestão e Clínica**. Vol. III. 2016.

FARIÑA, N. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 14, p. 04-05, 2016.

FARRAG, H. A.; HOSNY, A. E. D. M.; HAWAS, A. M.; HAGRAS, S. A.; HELMY, O. M. Potential efficacy of garlic lock therapy in combating biofilm and catheter-associated infections; experimental studies on an animal model with focus on toxicological aspects. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 6, p. 830-840, 2019.

FELDBERG, R.S.; CHANG, S.C.; KOTIK, A.N.; NADLER, M.; NEUWIRTH, Z.; SUNDSTROM, D.C.; THOMPSON, N.H. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 12, p. 1763-1768, 1988.

FELIX, A. L.M.; MEDEIROS, I. L.; DE MEDEIROS, F. D. *Allium sativum*: uma nova abordagem frente a resistência microbiana-uma revisão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 1, n. 1, p. 201-207, 2018.

FERNANDES, B. F.; GONÇALVES, H. R.; GUIMARÃES, M. R.; ALVES, A. A.; BIESKI, I. G. C. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v. 5, n. 9, p. 16-22 2019.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, I. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 225-230, 2014.

FIRMO, W. D. C. A.; DE MENEZES, V. D. J. M.; DE CASTRO PASSOS, C. E.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; ...; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 90-96, 2011.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá - PA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 757-768, 2015.

FONSECA, G. M.; PASSOS, T. C.; NINAHUAMAN, M. F. M. L.; CAROCI, A. S.; COSTA, L. S. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum*

Liliaceae) e de seu extrato aquoso. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, p. 679-684, 2014.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Artmed Editora, 2013.

FRANCO, J. M. P. L.; MENDES, R.; CABRAL, F.; MENEZES, C. D. A. O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Rev. Semana Acadêmica. Fortaleza**, v. 1, n. 72, p. 1-17, 2015.

FREIRE, F.; PEREIRA, C. A.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Antibiofilm activity in vitro of *Rosmarinus officinalis* and *Syzygium cumini* glycolic extracts on *Staphylococcus* spp. of dentistry interest. **Brazilian Dental Science**, v. 20, n. 2, p. 122-131, 2017.

FREITAS, A. V. L., DE AZEVEDO, R. A. B.; BISERRA, Y. Uses Of Medicinal Plants In Rio Grande Do Norte, Brazil. **Journal of Global Biosciences ISSN**, v. 3, n. 4, p. 749-762, 2014.

FREITAS, A. V. L.; COELHO, M. D. F. B.; MAIA, S. S. S.; DE AZEVEDO, R. A. B. Plantas medicinais: um estudo etnobotânico nos quintais do Sítio Cruz, São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 48, 2012.

FUJISAWA, H.; WATANABE, K. SUMA, K.; ORIGUCHI, K. MATSUFUJI, H.; SEKI, T.; ARIGA, T. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 9, p. 1948-1955, 2009.

FURLAN, M. R. Cultivo de plantas condimentares herbáceas. **Dossiê Técnico. CETEC. Belo Horizonte: Centro Tecnológico de Minas Gerais**, 2007.

GACA, A. O.; LEMOS, J. A. Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 3, pg 1-46 2019.

GAMBOGOU, B.; ANANI, K.; SIMPLICE, D. K.; YAOVI, A. A.; SIMPORE, J. Effect of Aqueous garlic extract on biofilm formation and antibiotic susceptibility of multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates in Togo. **Int. J. Adv. Multidiscip. Res**, v. 5, n. 7, p. 23-33, 2018.

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biologia)**, v. 2, n. 3, 2011.

GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; DE LA CRUZ, F. Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. **Mobile genetic elements**, v. 3, n. 1, p. e40438, 2013.

GAZIM, Z. C.; AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, G. A.; CORTEZ, D. A. G. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5509-5524, 2010.

GERHARDT, U. **Gewurze in der lebensmittelindustrie: eigenschaftentechnologienverwendng**. Hamburg: Beh's, 1990.

GHANNOUM, M.A. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). **Microbiology**, v. 134, n. 11, p. 2917-2924, 1988.

- GLOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, V.30, N. 2, p. 374-381, 2007.
- GOEL, N.; FATIMA, S. W.; KUMAR, S.; SINHA, R.; KHARE, S. K. Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. **Biotechnology Reports**, p. 6-13, 2021.
- GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D. G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, p. 129-136, 2014.
- GOTTFRIED, J. History Repeating? Avoiding a Return to the Pre- Antibiotic Age (2005 Third Year Paper), **Harvard University's DASH repository**; 2005.
- GOUVEIA, I. C. Nanobiotechnology: A new strategy to develop non-toxic antimicrobial textiles. de **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, A. Mendez-Vilas, Ed., Badajoz, Spain, Formatex Research Center, p. 407-414, 2010
- GOUVEIA, I. C.; SÁ, D.; HENRIQUES, M. Functionalization of wool with L-cysteine: Process characterization and assessment of antimicrobial activity and cytotoxicity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 2, p. 1352-1358, 2012.
- GRANDIS, R. A.; DE FATIMA MOCHETTI, H.; SANTINON, M. E.; PERINA, S.; RESENDE, F. A.; BAUAB, T. M.; NOGUEIRA, L. G. Avaliação da Atividade Antibacteriana do Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, 2015.
- GUIDO, R. V., ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos Químicos**, v. 2, n. 4, p. 24-36, 2008.
- GUILLAMÓN, E. Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 59, n. 3, p. 185-196, 2018.
- GUIMARÃES, A. C.; MEIRELES, L. M.; LEMOS, M. F.; GUIMARÃES, M. C. C.; ENDRINGER, D. C.; FRONZA, M.; SCHERER, R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GWYNNE, J.W.; SECREST, R.T. ANDERSON S. **Federal Trade Commission Economic Report on Antibiotics Manufacture**. Washington, DC, 1958.
- HA, D. G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. **Microbial Biofilms**, v. 3, n. 2, p. 301-317, 2015.
- HABTEMARIAM, S. The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. Evid. Based Complement. **Altern. Med.** v. 2016, n. 2, p. 68- 99, 2016.
- HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 111-124, 2006.

HARTANTYO, S. H. P.; CHAU, M. L.; KOH, T. H.; YAP, M.; YI, T.; CAO, D. Y. H.; ... NG, L. C. Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: virulence potential, antibiotic resistance, and risks to food safety. **Journal of food protection**, v. 83, n. 7, p. 1096-1103, 2020.

HARVEY, M.J. Onion and other cultivated Alliums. In: SMARTT & SIMONDS. **Evaluation of Crop Plant**. 2nd ed., London-England. 1995.

HASSAN, A.; USMAN, J.; KALEEM, F.; OMAIR, M.; KHALID, A.; IQBAL, M. Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing Gram positive and Gram-negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. **Malays J Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 57-60, 2011.

HERNÁNDEZ, M.D., et al., Óleos de *Rosmarinus officinalis* (*Rosmarinus officinalis* L.). **Óleos Essenciais na Conservação, Sabor e Segurança de Alimentos**. P. 677- 688, 2016.

HERSCH-MARTÍNEZ, P. Commercialization of wild medicinal plants from southwest puebla. **Economic Botany**, v. 49, n. 2, p. 197-206, 1995.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v.22, n. 4, p.273-292, 2005.

HONORATO, T. C.; DA SILVA, E. B.; DO NASCIMENTO, K. D. O.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 1, 2013.

HOUAISS. **Dicionário da Língua Portuguesa**. Editora Objetiva, 2009.

HRUDEY, S. E.; BACKER, L. C.; HUMPAGE, A. R.; KRASNER, S. W.; MICHAUD, D. S.; MOORE, L. E.; ... STANFORD, B. D. Evaluating evidence for association of human bladder cancer with drinking-water chlorination disinfection by-products. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 18, n. 5, p. 213-241, 2015.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 497-507, 2002.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P. S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070-1078, 2010.

ISAH, T. Stress and Defense Responses in Plant Secondary Metabolites Production. **Biological Research**, v. 52, n. 39, p. 52-39, 2019.

IZIDORO, M.; PRATES, A. R.; NEVES, C. S.; DE SOUZA, E. P.; LOSSOLLI, N. A. B.; BONFIM, F. P. G. Propriedades funcionais e organolépticas de plantas condimentares: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e2010614958-e2010614958, 2021.

JAKRIBETTU, R. P. et al. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Oils. Essential Oils In Food Preservation. **Flavor And Safety**, 447-454, 2016.

JARDAK, M.; Elloumi-Mseddi, J.; Aifa, S.; Mnif, S. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.

JÚNIOR, M. V.; DE SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

KANTH, M.K.; MEHTA, N.; CHATLI, M. K.; MALAV, O. P.; KUMAR, P.; WAGH, R. V.; PANWAR, H. In-vitro assessment of antimicrobial, antibiofilm and antioxidant potential of essential oil from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Journal of Animal Research**, v. 8, n. 6, p. 989-998, 2018.

KAPER J.B.; NATARO J.P.; MOBLEY H.L. Pathogenic Escherichia coli. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p.123–140, 2004.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p. 1-23, 2010.

KAYASHIMA, T.; MATSUBARA, K. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. Biosci. **Biotechnol. Biochem**, v. 76, p.115–119, 2012.

KHAMENEH, B.; DIAB, R.; GHAZVINI, K.; BAZZAZ, B. S. F. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32-42, 2016.

KIM, J. M.; MARSHALL, M. R.; CORNELL, J. A.; III, J. P.; WEI, C. I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1364-1368, 1995.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **plantas alimentícias não convencionais (panc) no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. pg. 768, 2014.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. **Informações agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1-24, 2007.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology & Conservation**, v. 5, n. 2, p.120-132, 2010.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010.

KRAMER, J. **Lebensmittel-mikrobiologie**. Stuttgart: Umer, 1997.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K. B. A review on pharmacological and phytochemical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 9, p. 2963-2966, 2011.

KUMAR, V.N.; MURTHY, P.S.; MANJUNATHA, J.R.; BETTADAIAH, B.K. Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of ginger and their derivatives. **Food chemistry**, v. 159, p. 451-457, 2014.

LANZOTTI, V.; SCALA, F.; BONANOMI, G. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*, v. 13, n. 4, p. 769-791, 2014.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510-543, 2014.

LEE, K; YOON, S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. **JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, V..27, n.6, p.1053-1064, 2017.

LEE, M.; PARK, H. Preparation of halloysite nanotubes coated with Eudragit for a controlled release of thyme essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 46, p. 1–7, 2015.

LEITE, JPV. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. 328 p.

LEONTIEV, R.; Hohaus, N.; Jacob, C.; Gruhlke, M. C.; Slusarenko, A. J. A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2018.

LEVIN, A. S.; BARONE, A. A.; PENÇO, J.; SANTOS, M. V.; MARINHO, I. S.; ARRUDA, E. A.; ... COSTA, S. F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 1008-1011, 1999.

LIAQAT, A.; ZAHOOOR, T.; ATIF RANDHAWA, M.; SHAHID, M. Characterization and antimicrobial potential of bioactive components of sonicated extract from garlic (*Allium sativum*) against foodborne pathogens. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 5, p. e13936, 2019.

LIMA, A.P.L.; GROSSO, E.S.B.; FERREIRA, G.; ANDRADE, M.C. Efeito antimicrobiano do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um Hospital Escola do Sul de Minas. **Revista Ciências em Saúde**, v.4, n. 2, p. 55-63, 2014.

LIMA, R. A.; BARROS, A. C. V.; ALMEIDA, K. P. C.; PANTOJA, T. M. A. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper tuberculatum* JACQ. (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **C&D-Revista Eletrônica da FAINOR**, v. 11, p. 316-334, 2018.

LIN, M. Y.; CHANG, F. J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive diseases and sciences**, v. 45, n. 8, p. 1617-1622, 2000.

LÓPEZ, E. I. C.; BALCÁZAR, M. F. H.; MENDOZA, J. M. R.; ORTIZ, A. D. R.; MELO, M. T. O.; PARRALES, R. S.; DELGADO, T. H. Antimicrobial activity of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 7, p. 1511-1524, 2017.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 512. 2002.

LORENZO, J.L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu; 2004.

LU, L.; HU, W.; TIAN, Z.; YUAN, D.; YI, G.; ZHOU, Y.; ... LI, M. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2019.

LUCINI, M. A. Alho roxo no Brasil: um pouco da história dos números desse nobre. **Revista Nosso Alho**, v. 1, n. 1, 2008.

LUEPKE, K. H.; SUDA, K. J.; BOUCHER, H.; RUSSO, R. L.; BONNEY, M. W.; HUNT, T. D.; MOHR III, J. F. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.

MACEDO JÚNIOR, A. M. Multirresistência bacteriana e a consequência do uso irracional dos antibióticos. **Scire Salutis**, v. 9, n. 2, p. 1-8, 2019.

MAGALHÃES, G. A evolução das espécies: da Natureza ao liberalismo econômico. **Revista de História Comparada**, v. 1, n. 2, p. 5, 2007.

MAGRYŚ, A.; OLENDER, A.; TCHÓRZEWSKA, D. Antibacterial properties of *Allium sativum* L. against the most emerging multidrug-resistant bacteria and its synergy with antibiotics. **Archives of microbiology**, p. 1-12, 2021.

MAJOLO, C.; NASCIMENTO, V.P.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Rev. bras. plantas med.** v.16, n.3, p.505-512, 2014.

MAO, Q. Q.; XU, X. Y.; CAO, S. Y.; GAN, R. Y.; CORKE, H.; LI, H. B. Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods**, v. 8, n. 6, p. 185, 2019.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre-and post-harvest conditions: A review. **Food chemistry**, v. 211, p. 41-50, 2016.

MC DERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **International journal of toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135-143, 2003.

MEKINIĆ, I. G.; SKROZA, D.; LJUBENKOV, I.; KRSTULOVIĆ, L.; MOŽINA, S. S.; KATALINIĆ, V. Phenolic acids profile, antioxidant and antibacterial activity of chamomile, common yarrow and immortelle (Asteraceae). **Natural product communications**, v. 9, n. 12, p. 193-122, 2014.

MELLO, M. B.; BOTREL, P. P.; TEIXEIRA, I. R. D. V.; FIGUEIREDO, F. C.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marruboides* no controle de *Zabrote ssubfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Revista Agrogeoambiental**, v. 6, n. 1, p. 79-86, 2014.

MELRO, J. C.; FONSECA, S. A.; SILVA, J. M.; FRANCO, S. P. B.; SOUZA, M. A., PIMENTEL, Y. F.; ... SANTOS, A. F. Ethnobotanical study of Medicinal plants used by the population assisted by the "Programa de Saúde da Família" (Family

Health Program) in Marechal Deodoro-AL, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 410-423, 2019.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; GOMES, C.; SANTOS, A. Papel dos biofilmes nas feridas crônicas. **Journal of aging and innovation**, v. 1, n. 3, p. 33-42, 2012.

MEOTTI, F. L.; DA SILVA, A. C. P.; GUMY, M. P.; DUARTE, A. F.; CARNEIRO, V. P. P.; BENEDETTI, V. P.; VELASQUEZ, L. G. Avaliação físico-química e microbiológica de fitoterápicos utilizados em uma farmácia municipal de manipulação. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e457-481, 2021.

MESOMO, M. C.; CORAZZA, M. L.; NDIAYE, P. M.; DALLA SANTA, O. R.; CARDOZO, L.; DE PAULA SCHEER, A. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal Of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44-49, 2013.

MIAO, J.; LIANG, Y.; CHEN, L.; WANG, W.; WANG, J.; LI, B. ...; XU, Z. Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: with focus on food safety. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 4, p. 12-35, 2017.

MIAO, J.; LIN, S.; SOTEYOME, T.; PETERS, B. M.; LI, Y.; CHEN, H.; ... SHIRTLIFF, M. E. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* under food heat processing conditions: first report on CML production within biofilm. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

MILLER, L. G.; PERDREAU-REMINGTON, F.; RIEG, G.; MEHDI, S.; PERLROTH, J.; BAYER, A. S.; ... SPELLBERG, B. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 14, p. 1445-1453, 2005.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 1, p. 18-24, 2014.

MIRON, T.; RABINKOV, A.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; WEINER, L. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1463, n. 1, p. 20-30, 2000.

MONTEBELLO, N.P. Condimentos, fundos e molhos. in Alquimia dos alimentos. Brasília: **SENAC**. p.393-432 2013.

MONTES, S. D. S.; SANTANA-NETA, L. G.; CRUZ, R. S. Óleos essenciais em embalagens para alimentos-Revisão de literatura de 2000 a 2012. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693**, v. 5, n. 1-2, p. 1, 2014.

MOTA, J.H.; NOCE, R.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M. D.; SOUZA, R. J. D. Análise da evolução da produção e relação risco-retorno para a cultura do alho,

no Brasil e regiões (1991 a 2000). **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.238-41, 2005.

MURRAY, C. J.; KING, G.; LOPEZ, A. D.; TOMIJIMA, N.; KRUG, E. G. Armed conflict as a public health problem. **Bmj**, v. 324, n. 7333, p. 346-349, 2002.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 8 ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2017.

NAGHIBI, F.; MOSADDEGH, M.; MOTAMED, S.M.; GHORBANI, A. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. **Iran. J. Pharm. Res.** P. 63–79, 2005.

NAKAGAWA, S.; HILLEBRAND, G. G.; NUNEZ, G. *Rosmarinus officinalis* L.(rosemary) extracts containing carnosic acid and carnosol are potent quorum sensing inhibitors of staphylococcus aureus virulence. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 149, 2020.

NANYINGI, M. O.; MBARIA, J. M.; LANYASUNYA, A. L.; WAGATE, C. G.; KOROS, K. B.; KABURIA, H. F.; ... OGARA, W. O. Ethnopharmacological survey of Samburu district, Kenya. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2008.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, 108-113, 2007.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A. D.; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. D. **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**, 2018.

NAVEED, M.; CHAUDHRY, Z.; BUKHARI, S. A.; MEER, B.; ASHRAF, H. Antibiotics resistance mechanism. In: Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment. **Elsevier**, v.1 p. 292-312, 2020.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NELSON, A. C.; KURSAR, T. A. Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. **Chemoecology**, v. 9, n. 2, p. 81-92, 1999.

NELSON, K. E.; PELL, A. N.; DOANE, P. H.; GINER-CHAVEZ, B. I.; SCHOFIELD, P. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 4, p. 1175-1194, 1997.

NEOPANE, P. H. P.; SHRESTHA, R.; UEHARA, O.; ABIKO, Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. **International journal of general medicine**, v. 11, p. 25, 2018.

NEPOMUCENO, R. 2014. **Viagem ao mundo das especiarias**. 6ed. Rio de Janeiro: Jose Olympio, p. 222 2014.

NERES, L. L. F. G.; NERES, J. C. I.; CARVALHO, A. V.; CERQUEIRA, F. B.; SANTANA, D. L.; PEREIRA, T. A.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de queijo artesanal. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 3, p. 20-29, 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NICÁCIO, G. L.; MOURA, S. C.; COSTA, J. V. D. J.; SENA, C. R.; CRUZ, T. B. F.; LOPES, G. N. M.; CECÍLIO, A. B. Breve revisão sobre as propriedades fitoterápicas do *Zingiber officinale* Roscoe—o gengibre. **Sinapse múltipla**, v. 7, n. 2, p. 74-80, 2018.

NIDADAVOLU, P.; AMOR, W.; TRAN, P.L.; DERTIEN, J.; COLMER-HAMOOD, J.A.; HAMOOD, A.N. Garlic ointment inhibits biofilm formation by bacterial pathogens from burn wounds. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. 5, p. 662-671, 2012.

NIETO, G.; ROS, G.; CASTILLO, J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 98, 2018.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?. **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 125-138, 2007.

NIKOLIĆ, M.; VASIĆ, S.; ĐURĐEVIĆ, J.; STEFANOVIĆ, O.; ČOMIĆ, L. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) ethanolic extract. **Kragujevac Journal of Science**, n. 36, p. 129-136, 2014.

NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food control**, v. 84, p. 312-320, 2018.

NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In: **New methods of food preservation**. Springer, Boston, MA, 1995.

OATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2-3, p. 155-162, 1997.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, C.J.; ARAÚJO, T.L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 93-105, 2007.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 2003.

OLIVEIRA, G. A.; SILVA, F. C. Cromatografia em papel: reflexão sobre uma atividade experimental para discussão do conceito de polaridade. **Química Nova na Escola, São Paulo**, v. 39, n. 2, p. 162-169, 2017.

OLIVEIRA, I N.; EVERTON, G. O.; FERREIRA, A. C. C.; DE SOUSA, I. B.; MOUCHREK, A. N.; TELES, A. M.; VICTOR FILHO, E. M. Óleo Essencial de

Alho (*Allium sativum*) como Antimicrobiano Frente a Cepas ATCC de *Escherichia coli* (25922) e *Staphylococcus aureus* (25923). **Revista Processos Químicos**, v. 12, n. 23, p. 99-102, 2018.

OLIVEIRA, J. C. A.; DA SILVA VEIGA, R. Impacto do uso do alecrim-*Rosmarinus officinalis* L.-para a saúde humana. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 12-12, 2019.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B. D.; CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

ORAZI, G.; O'TOOLE, G. A. "It takes a village": mechanisms underlying antimicrobial recalcitrance of polymicrobial biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 202, n. 1, p. 1-18 2019.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Barking, v.73, n.2, p.236-244, 2006.

OYEDEJI, O.O.; LAWAL, O.A.; SHODE, F.O.; OYEDIJI, A.O. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 1990-1998, 2009.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Alimentos funcionais: conceituação e importância na saúde humana. **Simpósio brasileiro sobre os benefícios da soja para a saúde humana**, v. 1, p. 37-40, 2001.

PANIZZA, S.T.; VEIGA, R.S.; ALMEIDA, M.C.; apud, LOPES, R.M. **Uso tradicional de plantas medicinais e fitoterápicos**. São Luís MA: Metha Ltda; 2012.

PARTRIDGE, S. R.; KWONG, S. M.; FIRTH, N.; JENSEN, S. O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1-61 2018.

PAULO, C. D. L.; BITTRICH, V.; SHEPHERD, G. J.; LOPES, A. V.; MARSAIOLI, A. J. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry**, v.56, p.443-452, 2001.

PAVELA, R. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* say larvae. **Parasitology research**, v. 114, n. 10, p. 3835-3853, 2015.

PEI, R. S.; ZHOU, F., JI; B. P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of food science**, v. 74, n. 7, p. 379-383, 2009.

PERCIVAL, S. L.; MALIC, S.; CRUZ, H.; WILLIAMS, D. W. Introduction to biofilms. In: **Biofilms and veterinary medicine**. p. 41-68. 2011

PEREIRA, A. A.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus e *Salmonella entérica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**, v. 44, n.11, p. 2022-2028, 2014.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. *Rosmarinus officinalis* (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **B.CEPPA**, v. 19, n. 2, 2001.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current science**, p. 1299-1307, 2003.

PRESCOTT, J. F.; BAGGOTT, J. D. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**, v. 3, p. 27-49, 2000.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. **Revista Fitos**, v.2, n. 3, p.39-53, 2006.

QUEIROZ, M. R. A.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; LIMA, T. S.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S.; CARELI, R. T. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.3, p.737-743, 2014.

RAHMANI, A. H. Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 125, 2014.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; ... FRIDLENDER, B. Plants and Human Health in the Twenty-First Century. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RATTHAWONGJIRAKUL, P.; THONGKERD, V. Fresh garlic extract inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation under chemopreventive and chemotherapeutic conditions. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** V. 38, n. 4, p. 381–389, 2016.

REIS, N. S.; SANTANA, N. B.; DE CARVALHO TAVARES, I. M.; LESSA, O. A.; DOS SANTOS, L. R.; PEREIRA, N. E.; ... FRANCO, M. Enzyme extraction by lab-scale hydrodistillation of ginger essential oil (*Zingiber officinale* Roscoe): chromatographic and micromorphological analyses. **Industrial Crops and Products**, v. 146, p. 112-210, 2020.

REITER, J.; HÜBBERS, A. M.; ALBRECHT, F.; LEICHERT, L. I. O.; SLUSARENKO, A. J. Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 1, p. 151-359, 2020.

RENDUELES, O.; GHIGO, J. M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 972-989, 2012.

RIBEIRO, D.S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. (*Rosmarinus officinalis* L.) como

modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p. 687-696, 2012.

RIBEIRO, E.; BRANDÃO, F.; DALMOLIN, T. V. Transferência horizontal de genes mediada pelo plasmídeo pCF10 em *Enterococcus faecalis*: impacto sobre a disseminação de linhagens multirresistentes e evolução da virulência. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 2066-2077, 2021.

RIBEIRO, L. H. L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 1733-1742, 2019.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MØRETRØ, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International journal of food microbiology**, v. 116, n. 3, p. 372-383, 2007.

RODRIGUES, F.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Diferentes condimentos vegetais: avaliação sensorial e de atividade antibacteriana em preparação alimentar com frango cozido. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 342-348, 2011.

RODRIGUES, M. L.; LIRA, R. K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, 2013.

ROSSI, C.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; CASACCIA, M.; MAGGIO, F.; PAPARELLA, A. Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1-20, 2020.

ROWLAND, I.; GIBSON, G.; HEINKEN, A.; SCOTT, K.; SWANN, J.; THIELE, I.; TUOHY, K. GUT microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 1, p. 1-24, 2018.

RYABUSHKINA, N. A. Synergism of metabolite action in plant responses to stresses. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, n. 4, p. 547-552, 2005.

S. STEIN, G. MALLARD, A. LEVITSKY, AND O. FATECY, NIST MS Library Database, **National Institute of Standards and Technology**, 1997.

SÁ AZEVEDO, R. R.; ALMEIDA, V. G. A.; SILVA, E. M. F.; DE LIRA SILVA, A.; DA SILVA GOMES, N. R.; DA SILVA MATIAS, T. M.; ... & DOS SANTOS, A. F. Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. **Revista Semente**, v. 6, n. 6, 2011.

SAAD, M.; LIMA, P. T. Acesso às terapias complementares cresce no SUS. **Einstein: Educ. Contin. Saúde**, v. 8, n. 1, p. 40-1, 2010.

SAKARIKOU, C.; KOSTOGLU, D.; SIMÕES, M.; GIAOURIS, E. Exploitation of plant extracts and phytochemicals against resistant *Salmonella* spp. in biofilms. **Food Research International**, v. 128, p. 108-806, 2020.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v.12, n.3, p.161-171, 2008.

SALEM, W. M.; EL-HAMED, D. S.; SAYED, W.; ELAMARY, R. Alterations in virulence and antibiotic resistant genes of multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 108, p. 91-100, 2017.

SAMPAIO, P. D. S.; SANCHO, L. G.; LAGO, R. F. D. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2018.

SANCHEZ, C. J.; MENDE, K.; BECKIUS, M. L.; AKERS, K. S.; ROMANO, D. R.; WENKE, J. C.; MURRAY, C. K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47, 2013.

SANDEL, M. K.; MCKILLIP, J. L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, n. 1, p. 5-10, 2004.

SANTOS, A. F. D. S. D. **Atividade de óleos essenciais sobre cepas de "S. aureus" associadas à mastite bovina: inibição do biofilme e ocorrência de hormesis**. 115F. TESE. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

SANTOS, A. M.; SANTANA, T. G. D. S. S.; SOUZA, L. M. V.; DE ARAUJO, B. S.; DE QUEIROZ, V. M.; DE OLIVEIRA REIS, I. A.; ... DOS SANTOS ESTEVAM, C. Prospecção de patentes biotecnológicas de óleo essencial e ação antifúngica. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 51871-51879, 2021.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. D. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; DA ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, N. 99, 2004.

SARKAR, S.; VAGENAS, D.; SCHEMBRI, M. A.; TOTSIKA, M. Biofilm formation by multidrug resistant *Escherichia coli* ST131 is dependent on type 1 fimbriae and assay conditions. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 3, 2016.

SATYAL, P.; CRAFT, J. D.; DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). **Foods**, v. 6, n. 8, p. 63, 2017.

SATYAL, P.; JONES, T. H.; LOPEZ, E. M.; MCFEETERS, R. L.; ALI, N. A. A.; MANSI, I.; ... SETZER, W. N. Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. **Foods**, v. 6, n. 3, p. 20, 2017.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2000.

SCHWARZ, S. T. E. F. A. N.; NOBLE, W. C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. **Veterinary dermatology**, v. 10, n. 3, p. 163-176, 1999.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary research**, v. 32, n. 3-4, p. 201-225, 2001.

ŞENER, N.; ÖZKINALI, S.; GÜR, M.; GÜNEY, K.; ÖZKAN, O. E.; KHALIFA, M. M. Determination of antimicrobial activity and chemical composition of pimento & ginger essential oil. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, V. 51, n. 3, p.230-234, 2017.

SERIO, A.; CHIARINI, M.; TETTAMANTI, E.; PAPARELLA, A. Electronic paramagnetic resonance investigation of the activity of *Origanum vulgare* L. essential oil on the *Listeria monocytogenes* membrane. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 2, p. 149-157, 2010.

SHAHWANY, A. W.; TAWFEEQ, Heba K.; HAMED, Shahad E. Antibacterial and anti-biofilm activity of three phenolic plant extracts and silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **J. Biomed. Biotechnol**, v. 4, p. 12-18, 2016.

SHANIDAR, SR. A Neanderthal flower burial in Northern Iraq. **Science** v. 190, p. 880-881. 1975

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, A. A.; BERGAMO, L.; DE CAMARGO, L. P.; FERNANDES, C.; MUSSATO, D.; CANAZART, D.; DE ABREU FILHO, B. A. Atividade microbiológica de óleos essenciais obtidos por arraste a vapor. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 3, p.33-39 2014.

SILVA, Á. D. L.; MONTEIRO, M. D. F. G.; DE SOUSA JÚNIOR, D. L.; MACÊDO, N. S.; SARAIVA, C. R. N.; DO NASCIMENTO SILVA-LEANDRO, M. K.; ...; LEANDRO, L. M. G. Atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Allium sativum* L. (Alho). **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 4, 2020.

SILVA, F. T.; DA CUNHA, K. F.; FONSECA, L. M.; ANTUNES, M. D.; EL HALAL, S. L. M.; FIORENTINI, Â. M.; ... DIAS, A. R. G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 107-115, 2018.

SILVA, I.; FRANCO, S.; MOLINARI, S.; CONEGERO, C.; MIRANDA, N. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Assoeste, 1995.

SILVA, J. F. M.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

SILVA, K. M.; BORTOLUZZI, R. L. C.; GOMES, J. P.; MANTOVANI. A Espécies bioativas em áreas úmidas do Planalto Catarinense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 483-493, 2013.

SILVA, M. D. A.; SANTOS, C. M.; SANTOS, V. H.; RHEIN, A. F. A. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, n. 30, v. 1, p. 173-181, 2013.

SILVA, M. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 257–262, 2009.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; SIMON, D. **O guia decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita**. Rio de Janeiro: Campus, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 18, Óleos voláteis. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

SIMÕES, M.; BENNETT, R.N.; E ROSA, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757. 2009.

SINGH, G.; KAPOOR, I.S.; SINGH, P.; DE HELUANI, C.S.; DE LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C.A. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigate ions on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food Chem. Toxicol**, v.46, n. 10, p. 3295-302, 2008.

SINGH, S. N.; MOSES, A. S.; DAVID, A. D. M. Antimicrobial activity of ginger and onion extracts against enteric pathogens. **J. Pharmacogn. Phytochem**, v. 7, p. 2653-6, 2018.

SINHA, S.; SANDHU, K.; BISHT, N.; NALIWAL, T.; SAINI, I.; KAUSHIK, P. Ascertaining the paradigm of secondary metabolism enhancement through gene level modification in therapeutic plants. **Journal of Young Pharmacists**, v. 11, n. 4, p. 337-343, 2019.

SIRTOLI, D. B.; COMARELLA, L. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 197-209, 2018.

SIVASOTHY, Y.; CHONG, W. K.; HAMID, A.; ELDEEN, I. M.; SULAIMAN, S. F.; AWANG, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. **Food chemistry**, v. 124, n. 2, p. 514-517, 2011.

SOUSA, C. P. D. The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. **Brazilian Archives of biology and Technology**, v. 51, p. 615-623, 2008.

SOUSA, J. P.; SARTURI, L.; DE ABREU, A. R.; DE SOUSA, T. A.; GERON, V. L. M. G. Breve relato sobre os efeitos terapêuticos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 44-53, 2019.

SOUSA, P. C. P.; DE PAULA ROCHA, M. V. A.; DE SOUSA, F. S. P.; NOGUEIRA, N. A. P. Utilização de antibacterianos em Unidade de Terapia Intensiva. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 18, 2015.

SOUSA, R. D.; SOUSA, J. D. Metabólitos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2017.

SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 135-142, 2006.

SOUZA, D. R.; RODRIGUES, E. C. A. M. Plantas medicinais: indicação de raizeiros para o tratamento de feridas. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 197-203, 2016.

SOUZA, E. M.; SANTOS, P. H. C.; PEIXOTO, A. R.; COCOZZA, F. D. M.; NETO, T. F. D. S. C. Óleos Essenciais De Plantas Medicinais: Produção E Tratamentos De Doenças Respiratórias (Comorbidades) Na Prevenção Aos Sintomas Da Covid-19 **Revista Brasileira De Agroecologia**, V. 15, n. 4, p.56-68, 2020.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. **Tecnológica**, v. 17, n. 2, p. 124-128, 2013.

SOUZA, N. D.; FONSECA, H. M.; ARAÚJO MADALENA, L. J. A Importância Da Formação Do Profissional De Enfermagem Sobre O Cuidado No Uso De Fitoterápicos E Plantas Medicinais: Uma Revisão Sistemática. **Multidebates**, v. 4, n. 6, p. 270-282, 2020.

SOUZA, S. M.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, A. Antibacterial activity of coumarins. **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, v. 60, n. 9-10, p. 693-700, 2005.

SPÉZIA, F. P.; SIEBERT, D.; TENFEN, A.; DE CORDOVA, C. M. M., ALBERTON, M. D.; GUEDES, A. Avaliação da atividade antibacteriana de plantas medicinais de uso popular: *Alternanthera brasiliana* (penicilina), *Plantago major* (tansagem), *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursi) e *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, p. 11-11, 2020.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SUBBANNA, S.; TS, G.; BASALINGAPPA, K.M. Biogenic Nanoparticles From *Allium sativum* And Its Bioactives Applications. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 7, n. 8, p. 212-232, 2020.

SULEIMAN, M. H. A. Prenylated flavonoids from the stem wood of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl.(Burseraceae). **Journal of King Saud University-Science**, v. 27, n. 1, p. 71-75, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TAN, B. K.; VANITHA, J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1423-1430, 2004.

TEGOS, G.; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3133-3141, 2002.

TEWARI, A.; JAIN, B., Dhamannapatil, P.S., Saxena, M.K. Biofilm resistance to antimicrobial agents and novel approaches to combat biofilm mediated resistance in bacteria. **EC Microbiol**, v. 3, p. 71-77, 2018.

TOMÁS-MENOR, L.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; MARTÍ, N.; SAURA, D.; MENÉNDEZ, J. A.; ... & MICOL, V. The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: An opportunity to improve the performance of antibiotics?. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 466-473, 2015.

TONIN, S. T.; LUCAS, D. C.; RADUNZ, A. F. O.; GILSON, Í. K.; DAL MAGRO, J.; RADUNZ, M.; ... RADUNZ, A. L. Feiras livres: um estudo de caso relacionado à disponibilidade de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2020.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. D.; TRAVASSOS. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TUROLLA, M. S. D. R.; NASCIMENTO, E. D. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VAN DUIJKEREN, E.; SCHINK, A. K.; ROBERTS, M. C.; WANG, Y.; SCHWARZ, S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 51-82, 2018.

VAN GROENIGEN, J. W.; HUYGENS, D.; BOECKX, P.; KUYPER, T. W.; LUBBERS, I. M.; RÜTTING, T.; GROFFMAN, P. M. The soil N cycle: new insights and key challenges. **Soil**, v. 1, n. 1, p. 235-256, 2015.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

VERHOEVEN, D. T.; GOLDBOHN, R. A.; VAN POPPEL, G.; VERHAGEN, H.; VAN DEN BRANDT, P. A. Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 5, n. 9, p. 733-748, 1996.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 539-545, 2000.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado- Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WHO. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções de ação: sumário executivo. Brasília, **OMS**; 2012.

WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. **World Health Organization**, Geneva. 2002 <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>

WIEDEMANN B.; HEISIG A.; HEISIG P. Uncomplicated Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance- Epidemiological and Mechanistic Aspects. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 341-352, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**, Geneve, 2007. (WHO.Fact sheet 237, revised march). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 16 Jan. 2021.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. **Natural product reports**, v. 34, n. 7, p. 694-701, 2017.

WU, X.; SANTOS, R.R.; FINK-GREMMELES, J. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. **Food science & nutrition**, v. 3, n. 2, p. 158-168, 2015.

XU, Z.; LI, L.; SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; LI, B.; PENG, Y., ... & SHI, L. Resistance Class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001–2006. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 714-718, 2011.

YAHYA, M.; SAIFUDDIN, N.; HAMID, A. *Zingiber officinale* ethanolic extract inhibits formation of pseudomonas aeruginosa biofilm. **Int J Pharm Bio Sci**, V. 3: n.1, p. 46-54, 2013.

YI, L.; JIN, M.; LI, J.; GRENIER, D.; WANG, Y. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Streptococcus suis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8649-8660, 2020.

ZAINAL, M.; ZAIN, N. M.; AMIN, I. M.; AHMAD, V. N. The antimicrobial and antibiofilm properties of allicin against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*—A therapeutic potential for denture stomatitis. **The Saudi dental journal**, v. 33, n. 2, p. 105-111, 2021.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016

ZAOUALI, Y.; BOUZAIN, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3144-3152, 2010.

9 ANEXOS

ANEXO 1- Cálculo de inibição do crescimento do biofilme formado pelas bactérias *E. coli* (B1), *S. aureus* (B2), *K. pneumoniae* (B3), *S. Typhimurium* (B4) e *P. aeruginosa* (B5) frente ao óleo de *Rosmarinus officinalis*, utilizando a equação de Santos (2016) após a Medição da densidade óptica (D.O)

B1	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,104	0,094	0,097	0,1	0,098	0,165	0,437	0,384	0,353	0,239
	0,086	0,093	0,093	0,101	0,101	0,109	0,108	0,261	0,279	0,215
	0,097	0,094	0,099	0,092	0,128	0,103	0,125	0,229	0,138	0,095
Média	0,0957	0,0937	0,0963	0,0977	0,1090	0,1257	0,2233	0,2913	0,2567	0,1830
EQUAÇÃO	1,4519	1,3292	1,4928	1,5746	2,2699	3,2924	9,2843	13,4560	11,3292	6,8098
% de inibição	-45,19	-32,92	-49,28	-57,46	-126,99	-229,24	-828,43	-1245,60	-1032,92	-580,98

B2	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O.	0,085	0,092	0,089	0,091	0,091	0,08	0,091	0,135	0,284	0,117
	0,084	0,092	0,091	0,09	0,092	0,133	0,091	0,126	0,254	0,126
	0,048	0,088	0,089	0,095	0,097	0,091	0,091	0,141	0,198	0,092
Média	0,0723	0,0907	0,0897	0,0920	0,0933	0,1013	0,0910	0,1340	0,2453	0,1117
EQUAÇÃO	0,0067	0,3733	0,3533	0,4000	0,4267	0,5867	0,3800	1,2400	3,4667	0,7933
% de inibição	99,33	62,67	64,67	60,00	57,33	41,33	62,00	-24,00	-246,67	20,67

B3	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,087	0,097	0,092	0,096	0,098	0,12	0,143	0,286	0,36	0,148
	0,1	0,1	0,097	0,098	0,095	0,14	0,12	0,286	0,249	0,175
	0,102	0,1	0,097	0,096	0,098	0,14	0,143	0,294	0,249	0,129
Média	0,0963	0,0990	0,0953	0,0967	0,0970	0,1333	0,1353	0,2887	0,2860	0,1507
EQUAÇÃO	2,2121	2,4545	2,1212	2,2424	2,2727	5,5758	5,7576	19,6970	19,4545	7,1515
% de inibição	-121,21	-145,45	-112,12	-124,24	-127,27	-457,58	-475,76	-1869,70	-1845,45	-615,15

B4	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,089	0,094	0,098	0,087	0,106	0,127	0,127	0,118	0,118	0,107
	0,089	0,094	0,088	0,09	0,09	0,127	0,127	0,136	0,122	0,095
	0,089	0,08	0,088	0,093	0,106	0,127	0,127	0,136	0,202	0,108
Média	0,0890	0,0893	0,0913	0,0900	0,1007	0,1270	0,1270	0,1300	0,1473	0,1033
EQUAÇÃO	0,6615	0,6744	0,7523	0,7004	1,1154	2,1401	2,1401	2,2568	2,9313	1,2192
% de inibição	33,85	32,56	24,77	29,96	-11,54	-114,01	-114,01	-125,68	-193,13	-21,92

B5	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,095	0,114	0,11	0,1	0,095	0,105	0,128	0,128	0,127	0,114
	0,098	0,093	0,092	0,111	0,094	0,117	0,115	0,133	0,16	0,129
	0,128	0,113	0,099	0,106	0,105	0,127	0,114	0,162	0,209	0,118
Média	10,6061	10,5051	8,5859	10,2020	7,8788	13,4343	14,2424	20,9091	28,2828	14,6465
EQUAÇÃO	1060,6061	1050,5051	858,5859	1020,2020	787,8788	1343,4343	1424,2424	2090,909	2828,282	1464,646
% de inibição	-960,61	-950,51	-758,59	-920,20	-687,88	-1243,43	-1324,24	-1990,91	-2728,28	-1364,65

ANEXO 2- Cálculo de inibição do crescimento do biofilme formado pelas bactérias *E. coli* (B1), *S. aureus* (B2), *K. pneumoniae* (B3), *S. Typhimurium* (B4) e *P. aeruginosa* (B5) frente ao óleo de *Zingiber officinale*, utilizando a equação de Santos (2016) após a Medição da densidade óptica (D.O)

B1	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,064	0,055	0,056	0,057	0,061	0,1	0,135	0,121	0,129	0,125
	0,048	0,06	0,052	0,059	0,056	0,075	0,098	0,092	0,107	0,083
	0,048	0,069	0,076	0,058	0,089	0,089	0,097	0,117	0,119	0,094
Média	0,0533	0,0613	0,0613	0,0580	0,0687	0,0880	0,1100	0,1100	0,1183	0,1007
EQUAÇÃO	-1,1452	-0,6544	-0,6544	-0,8589	-0,2045	0,9816	2,3313	2,3313	2,8425	1,7587
% de inibição	214,52	165,44	165,44	185,89	120,45	1,84	-133,13	-133,13	-184,25	-75,87

B2	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,05	0,058	0,058	0,081	0,062	0,062	0,084	0,077	0,081	0,086
	0,046	0,058	0,069	0,079	0,063	0,062	0,066	0,072	0,081	0,08
	0,052	0,072	0,058	0,055	0,063	0,058	0,066	0,077	0,078	0,08
Média	0,0493	0,0627	0,0617	0,0717	0,0627	0,0607	0,0720	0,0753	0,0800	0,0820
EQUAÇÃO	-45,3333	-18,6667	-20,6667	-0,6667	-18,6667	-22,6667	0,0000	6,6667	16,0000	20,0000
% de inibição	145,33	118,67	120,67	100,67	118,67	122,67	100,00	93,33	84,00	80,00

B3	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,055	0,053	0,058	0,055	0,062	0,061	0,067	0,082	0,076	0,069
	0,047	0,052	0,053	0,055	0,058	0,056	0,058	0,057	0,07	0,069
	0,077	0,07	0,066	0,068	0,06	0,063	0,06	0,08	0,078	0,091

Média	0,0597	0,0583	0,0590	0,0593	0,0600	0,0600	0,0617	0,0730	0,0747	0,0763
EQUAÇÃO	-1,1212	-1,2424	-1,1818	-1,1515	-1,0909	-1,0909	-0,9394	0,0909	0,2424	0,3939
% de inibição	212,12	224,24	218,18	215,15	209,09	209,09	193,94	90,91	75,76	60,61

B4	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,065	0,063	0,053	0,052	0,055	0,061	0,059	0,101	0,074	0,112
	0,059	0,063	0,049	0,053	0,055	0,056	0,059	0,101	0,103	0,112
	0,059	0,053	0,052	0,052	0,056	0,054	0,055	0,101	0,103	0,084
Média	0,0610	0,0597	0,0513	0,0523	0,0553	0,0570	0,0577	0,1010	0,0933	0,1027
EQUAÇÃO	-0,4280	-0,4799	-0,8042	-0,7652	-0,6485	-0,5837	-0,5577	1,1284	0,8301	1,1933
% de inibição	142,80	147,99	180,42	176,52	164,85	158,37	155,77	-12,84	16,99	-19,33

B5	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,054	0,056	0,053	0,062	0,059	0,059	0,081	0,082	0,079	0,077
	0,053	0,059	0,061	0,057	0,059	0,073	0,063	0,077	0,079	0,077
	0,055	0,056	0,061	0,058	0,059	0,073	0,081	0,077	0,079	0,077
Média	-5,4545	-4,5455	-4,1414	-3,9394	-3,9394	-1,1111	0,9091	2,0202	2,1212	1,5152
EQUAÇÃO	-545,4545	-454,5455	-414,1414	-393,9394	-393,9394	-111,1111	90,9091	202,0202	212,1212	151,5152
% de inibição	645,45	554,55	514,14	493,94	493,94	211,11	9,09	-102,02	-112,12	-51,52

ANEXO 3- Cálculo de inibição do crescimento do biofilme formado pelas bactérias *E. coli* (B1), *S. aureus* (B2), *K. pneumoniae* (B3), *S. Typhimurium* (B4) e *P. aeruginosa* (B5) frente ao óleo de *Allium sativum*, utilizando a equação de Santos (2016) após a Medição da densidade óptica (D.O).

B1	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,09	0,086	0,077	0,08	0,083	0,103	0,1	0,192	0,168	0,08
	0,113	0,075	0,076	0,073	0,088	0,095	0,1	0,098	0,097	0,161
	0,06	0,069	0,074	0,073	0,086	0,095	0,091	0,098	0,084	0,142
Média	0,9611	0,2863	0,2249	0,2045	0,8384	1,5746	1,5337	3,5174	2,7198	3,4151
EQUAÇÃO	96,1145	28,6299	22,4949	20,4499	83,8446	157,4642	153,3742	351,7382	271,9836	341,5133
% de inibição	3,89	71,37	77,51	79,55	16,16	-57,46	-53,37	-251,74	-171,98	-241,51

B2	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,067	0,071	0,07	0,07	0,071	0,075	0,096	0,096	0,101	0,094
	0,067	0,071	0,076	0,07	0,071	0,07	0,09	0,1	0,111	0,105
	0,067	0,074	0,073	0,07	0,071	0,075	0,108	0,096	0,102	0,094
Média	0,0670	0,0720	0,0730	0,0700	0,0710	0,0733	0,0980	0,0973	0,1047	0,0977
EQUAÇÃO	-0,1000	0,0000	0,0200	-0,0400	-0,0200	0,0267	0,5200	0,5067	0,6533	0,5133
% de inibição	110,00	100,00	98,00	104,00	102,00	97,33	48,00	49,33	34,67	48,67

B3	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,11	0,075	0,07	0,071	0,074	0,07	0,089	0,095	0,125	0,101
	0,082	0,065	0,081	0,087	0,073	0,069	0,094	0,093	0,105	0,088
	0,082	0,078	0,086	0,085	0,091	0,121	0,108	0,106	0,108	0,116
Média	1,7576	0,0606	0,6364	0,8182	0,6667	1,3333	2,2727	2,3636	3,6970	2,6970

EQUAÇÃO	175,7576	6,0606	63,6364	81,8182	66,6667	133,3333	227,2727	236,3636	369,6970	269,6970
% de inibição	-75,76	93,94	36,36	18,18	33,33	-33,33	-127,27	-136,36	-269,70	-169,70

B4	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,073	0,074	0,069	0,065	0,092	0,087	0,108	0,128	0,102	0,108
	0,073	0,071	0,073	0,07	0,07	0,091	0,096	0,106	0,116	0,115
	0,073	0,071	0,073	0,07	0,07	0,091	0,096	0,106	0,116	0,115
Média	0,0730	0,0720	0,0717	0,0683	0,0773	0,0897	0,1000	0,1133	0,1113	0,1127
EQUAÇÃO	0,0389	0,0000	-0,0130	-0,1427	0,2075	0,6874	1,0895	1,6083	1,5305	1,5824
% de inibição	96,11	100,00	101,30	114,27	79,25	31,26	-8,95	-60,83	-53,05	-58,24

B5	258 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
D.O	0,077	0,07	0,066	0,067	0,062	0,092	0,101	0,101	0,103	0,103
	0,077	0,07	0,067	0,061	0,06	0,092	0,085	0,106	0,115	0,103
	0,077	0,07	0,067	0,061	0,06	0,092	0,101	0,101	0,115	0,103
Média	0,1946	-0,0778	-0,2075	-0,3502	-0,4410	0,7782	0,9209	1,1933	1,5175	1,2062
EQUAÇÃO	19,4553	-7,7821	-20,7523	-35,0195	-44,0986	77,8210	92,0882	119,3256	151,7510	120,6226
% de inibição	80,54	107,78	120,75	135,02	144,10	22,18	7,91	-19,33	-51,75	-20,62