UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTE DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FELIPE DE SOUSA FERREIRA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DA INFLORESCÊNCIA DA *ETLINGERA ELATIOR* E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS E FÚNGICOS HUMANOS.

Recife
2018

FELIPE DE SOUSA FERREIRA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DA INFLORESCÊNCIA DA *ETLINGERA ELATIOR* E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS E FÚNGICOS HUMANOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profª. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Recife
2018

Catalogação na fonte
Bibliotecária Elaine Freitas CRB4-1790

G383e Ferreira, Felipe de Sousa
Estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial da inflorescência da etlingera elatior e seus constituintes majoritários frente a patógenos bacterianos e fúngicos humanos. / Felipe de Sousa Ferreira . – 2018.
61f. : fig., tab.

Orientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2018.
Inclui referências e apêndices.

1. Química Orgânica. 2. Óleo essencial. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Biofilme I. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz (Orientadora). II. Título.

547 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-64

FELIPE DE SOUSA FERREIRA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DA INFLORESCÊNCIA DA ETLINGERA ELATIR E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS E FÚNGICOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Maiara Celine de Moura
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Geanne Karla Novais Santos
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho as minhas grandes heroínas, minha mãe Maria e minha avó Antonieta, por todo apoio e paciência que tiveram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por ter me dado saúde e força nesta jornada desafiadora que é a pós-graduação.

Agradeço a minha mãe Maria e minha avó Antonieta, que me deram todo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

A minha orientadora, Professora Daniela Navarro pela oportunidade e confiança durante todas as etapas desta pesquisa. Grato pela sua orientação e por compartilhar de seu conhecimento e ideias durante todo o processo de elaboração deste trabalho.

Ao Professor Thiago pela co-orientação e suporte dado na realização desta pesquisa.

A Maiara por todo apoio, paciência e compartilhamento de ideias para realização dos testes.

A Kamilla Dutra e Camila (camilinha) pela amizade e todo apoio dado no início e durante toda a pesquisa.

Agradeço aos meus amigos e colegas que tive o prazer de conhecer no departamento; pelo apoio dado durante toda jornada e por fazerem parte da minha formação e que irão continuar presentes em minha vida. Por todos divertidíssimos momentos e tardes de estudos.

A toda família do Laboratório de Ecologia Química pelos momentos de aprendizado e descontração.

A família UFM pela amizade e por todos os momentos de trocas de experiências, aprendizagem e descontração.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte desta caminhada e que proporcionaram o conhecimento necessário para minha formação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

RESUMO

O aumento da resistência de microrganismos patogênicos aos biocidas tem sido enfrentado como um problema de saúde pública em nível mundial. Este cenário torna-se ainda mais desafiador, uma vez que o uso generalizado de drogas comerciais no tratamento de infecções causadas por patógenos favorece a resistência microbiana, tornando ineficaz a ação destes medicamentos. A busca por novas ferramentas para se combater a problemática de resistência microbiana tem se tornado constante. Nesse contexto, a busca por novos compostos com propriedade antimicrobiana torna-se uma alternativa no controle microbiano. Neste trabalho, os ensaios para determinação das concentrações mínimas inibitória (CMI), bactericida (CMB) e fungicida (CMF) foram realizadas através de diluições sucessivas da solução do óleo e de seus constituintes majoritários. As amostras testadas demonstraram ação frente *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, com valores de CMI e CMB de 124, 31 e 62 µg / mL para óleo essencial, dodecanal e 1-dodecanol, respectivamente. Apenas o óleo essencial apresentou atividade bacteriostática contra frente uma cepa resistente à drogas (por exemplo ceftazidima) *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA-262 quando usado a 4mg/mL. Para as leveduras do gênero *Candida*, o dodecanal apresentou propriedade fungistática contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na concentração de 60 mg/mL e fungicida contra *C. albicans* na mesma concentração. O 1-dodecanol apresentou unicamente atividade fungistática contra *C. albicans* na concentração de 60 mg/mL. O óleo essencial não apresentou atividade fungistatíca frente as espécies de *Candidas* testadas. A inibição do biofilme microbiano foi observada para o óleo e seus constituintes majoritários, onde o dodecanal apresentou uma inibição significativa na formação de biofilme de *S. aureus*, *C. albicans* e *C. tropicalis* e o 1-dodecanol inibiu formação de biofilme contra *S. aureus* e *C. albicans*. O óleo essencial conseguiu inibir o biofilme das duas cepas bacterianas estudadas, *S.aureus* e *P. aeruginosa*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. Atividade antimicrobiana. Biofilme. Etlingera elatior.

ABSTRACT

The Increase of the resistance of pathogenic microorganisms to the biocides has been faced as a public health problem in world level. This scenery becomes still more challenging, once the widespread use of commercial drugs in the treatment of pathogen infections favors microbial resistance, turning ineffective the action of these drugs. The search for new tools to combat the problem of microbial resistance has become constant. In this context, the search for new compounds with antimicrobial property becomes an alternative in the microbial control. In this work, the assays for determination of the minimum inhibitory (MIC), bactericidal (MBC) and fungicide (MFC) concentrations were carried by successive dilutions of the oil solution and its major constituents. The samples tested showed action against *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, with MIC and MBC values of 124, 31 and 62 µg / mL for essential oil, dodecanal and 1-dodecanol, respectively. Only the essential oil presented bacteriostatic activity against a drug resistant strain (eg. ceftazidime) *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA-262 when used at 4mg / mL. For yeasts of the genus *Candida*, the dodecanal presented fungistatic properties against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in the concentration of 60 mg / mL and fungicide against *C. albicans* in the same concentration. The 1-dodecanol only presented activity fungistatic against *C. albicans* in the concentration of 60 mg / mL. The essential oil had no fungistatic activity against the tested *Candida* species. The Inhibition of the microbial biofilm was observed for the oil and its major constituents, where the dodecanal presented a significant inhibition in the biofilm formation of *S. aureus*, *C. albicans* and *C. tropicalis* and the 1-dodecanol inhibited biofilm formation against *S. aureus* and *C. albicans*. The essential oil was able to inhibit the biofilm of the two bacterial strains studied, *S. au*reus and *P. aeruginosa*.

Key words: Essential oil. Antimicrobial activity. Biofilm. Etlingera elatior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de formação do Biofilme. 17
Figura 2 – Arranjo em aspecto cacho de uvas, comum em algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, principalmente ao *S.aureus*. 18
Figura 3 – *Pseudomonas aeruginosa*, em sua forma bastão característica desta espécie, visualizada em microscopia eletrônica.....20
Figura 4 – Partes características das plantas das espécies da Família Zingiberaceae. Inflorescência de *Alpinia Pupurata* (A), folhagens e pseudocaules de *Alpinia zerumbet* 'Variegata' (B) e rizoma de *Zingiber officinale* (C). 24
Figura 5 – Aparelho do tipo Clevenger modificado, utilizado no processo de hidrodestilação.. 29
Figura 6 – Inflorescências da variedade vermelha da *E. elatior*... 30
Figura 7 – Óleo essencial durante o processo de extração, a seta indica o óleo sobre o hidrolato (subproduto obtido no processo de hidrodestilação.31
Figura 8 – Aspecto visual do óleo essencial da inflorescência de *E.elatior* refrigerado(A, fotografado o fundo do frasco) e em temperatura ambiente (B).. 38
Figura 9 – Estrutura do dodecanal (a) e 1-dodecanol (b). 39
Figura 10 – Efeito do óleo essencial da inflorescência de E.elatior na formação do crescimento e biofilme bacteriano das cepas de P.aeruginosa UFPEDA 262 (A) e S.aureus UFPEDA 02 (B). 45
Figura 11 – Efeito do dodecanal na formação do biofilme e crescimento bacteriano da cepa não resistente de *S.aureus* UFPEDA-02. 47
Figura 12 – Efeito do dodecanal na formação de biofilmes e crescimento das das leveduras *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B), *C.glabrata* (C) e *C.parapsilosis* (D). 48
Figura 13 – Efeito do 1-dodecanol na formação de biofilmes e no crescimento microbiano de cepas de *S. aureus* (A) e *Candida albicans* (B).....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial da inflorescência da *E. elatior*. 38

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial da *E.elatior* e de seus compostosmajoritários. 41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMH – Ágar Muller Hinton

AMR – Antimicrobial Resistance

ASD – Ágar Sabourand-Dextrose

CG – Cromatografia Gasosa

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMF – Concentração Mínima Fungicida

CMH – Caldo Muller Hinton

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CSD – Caldo Sabourand-Dextrose

D.O – Densidade Ótica

DMSO – Dimetilsufóxido

I.R – Índice de Retenção

OE – Óleo Essencial

OMS – Organização Mundial de Saúde

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS 15
1.2 BIOFILME 16
1.3 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA 18
1.3.1 *Staphylococcus aureus* 18
1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa* 19
1.3.3 *Candida* 21
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS 22
1.4.1 Métodos de Extração de Óleos Essenciais 23
1.5 FAMÍLIA ZINGIBERACEAE 23
1.5.1 Óleo Essencial De *E. Elatior* (Jack) R.M. Smith 25
2 OBJETIVOS 27
2.1 OBJETIVO GERAL 27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27
3 METODOLOGIA 28
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 28
3.1.1 Triturador Elétrico 28
3.1.2 Aparelhagem extratora 28
3.1.3 Análise de CG-EM e CG 29
3.2 METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS 30
3.2.1 Amostra Vegetal 30
3.2.2 Extração do Óleo essencial 30
3.2.3 Caracterização Química do Óleo essencial 31
3.2.4 Obtenção dos Compostos Majoritários 33
3.2.5 Microrganismos 33
3.2.6 Bioensaios antimicrobianos 34
3.2.6.1 Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias, Bactericidas e Fungicidas 34
3.2.6.2 Ensaio para Determinação de Atividade Antibiofilme 35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

4.1 EXTRAÇÃO, CARACTERÍSTICAS E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL....37
4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA INFLORESCÊNCIA DA *E. ELATIOR*....38
4.3 BIOENSAIOS ANTIMICROBIANOS....40
4.3.1 Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), Bactericidas (CMB) e Fungicidas (CMF)....40
4.3.2 Determinação da Atividade Antibiofilme....43
5 CONCLUSÃO....52
6 PERSPECTIVAS....53
REFERÊNCIAS....54

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Microrganismos são definidos como organismos unicelulares ou pluricelulares (como algumas espécies de fungos, algas e protozoários) que apresentam tamanho na escala micrométrica (10^{-6} m), existindo em sua forma individual ou em micro colônias (TORTORA et al., 2012).

Estes organismos podem ser classificados de acordo com a sua capacidade de causarem ou transmitirem doenças ao hospedeiro. Microrganismos não patogênicos foram estabelecidos como aqueles que promovem alterações benéficas à saúde de seus hospedeiros, podendo os mesmos existirem como hóspedes, mas não beneficiar ou causar qualquer problema. Os microrganismos patogênicos ou patógenos são definidos como aqueles capazes de causar doenças a seus hospedeiros, onde competem como principais agentes algumas espécies de bactérias, fungos, vírus e protozoários (BIRON e CASADEVALL, 2010).

Os agentes patogênicos apresentam relevância nas áreas de saúde pública no que tange as infecções causadas por estes microrganismos. Atualmente, um dos grandes desafios na área de microbiologia médica é buscar formas de controlar a incidência de patógenos resistentes a biocidas (WHO, 2016).

A resistência antimicrobiana (em inglês AMR – Antimicrobial Resistance) ocorre quando microrganismos são expostos continuadamente a biocidas, dessa forma esses agentes causadores de doenças conseguem alterar sua estrutura celular tornando a ação antimicrobiana aos medicamentos ineficaz (WHO, 2012). Segundo Michael e colaboradores (2014) a intensa aplicação de antimicrobianos proporciona uma forte pressão seletiva e polarizada que promove de forma gradativa fortes respostas adaptativas aos microrganismos. Esta situação se intensifica pela diminuição do número de antibióticos desenvolvidos e aprovados para uso clínico, uma vez que os medicamentos existentes se tornam menos eficazes, e a consequente busca por novos agentes antimicrobianos demanda de um prazo maior de estudos (DONADIO et al., 2010).

Para Myles (2003), a carência de antimicrobianos eficazes na prevenção e tratamento de infecções, culmina no aumento significativo no custo de tratamentos existentes, o que porventura deve estimular pesquisas na busca de novos compostos antimicrobianos menos tóxicos e menos suscetíveis a induzir a resistência de microrganismos. Novas moléculas bioativas com atividade antimicrobiana tem sido investigadas constantemente, não só do ponto de vista médico, mas também para aplicações farmacêuticas, alimentares e industriais.

1.2 BIOFILME

O biofilme pode ser caracterizado como sendo um complexo sistema biológico constituído por agregados de células, estando estas embutidas em uma matriz adesiva polimérica hidratada, viabilizando a aderência em superfícies bióticas ou abióticas (NIKOLAEV e PLAKUNOV, 2007). Os biofilmes podem existir como aglomerados mais ou menos conexos, em camada única ou multicamadas (WATNICK, 2000). Quando compostos por várias camadas celulares, apresentam canais que possibilitam o fluxo de líquido, dispersão de nutrientes e a remoção de elementos residuais (STOODLEY, 2002).

Do ponto de vista médico as infecções causadas por biofilmes apresentam grande relevância, pois ao se fixarem em utensílios hospitalares, em alimentos e até em algumas partes do corpo humano, os microrganismos presentes no biofilme causam infecções em tecidos, no trato urinário e infecções desencadeadas por dispositivos médicos contaminados, como cateteres vasculares o que pode levar a consequente rejeição de próteses e implantes por exemplo (MENOITA ET AL., 2012). Os patógenos em seus biofilmes tornam-se protegidos da ação externa de biocidas, diminuindo a eficiência dos mesmos, uma vez que estes antimicrobianos não conseguem penetrar e chegar até os microrganismos devido à presença da matriz polimérica, produzida na formação do biofilme, tornando as infecções causadas por biofilmes mais persistentes (HOIBY et al., 2011).

O ciclo de formação do biofilme (Figura 1) tem início a partir da adesão de moléculas às superfícies naturais ou artificiais (etapa I). Os resquícios lipídicos, proteicos e até de carboidratos, provenientes de materiais de origem orgânica, tem importância

fundamental na formação da camada condicionante, sendo esta essencial no desenvolvimento do biofilme (TRACHOO, 2003).

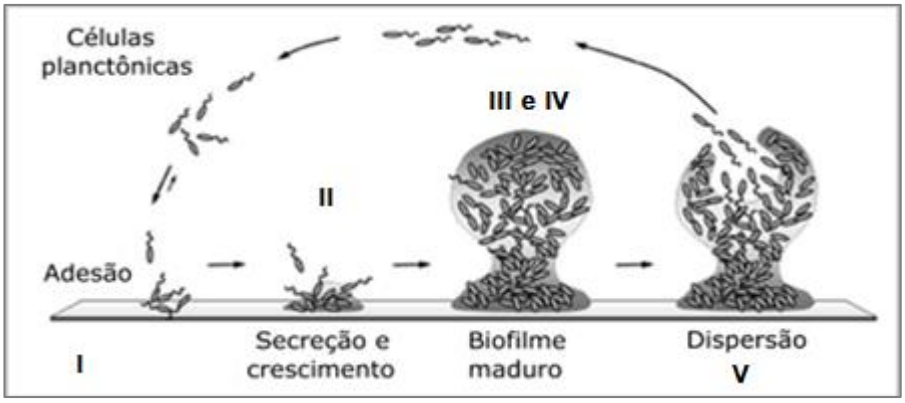

Figura 1 – Ciclo de formação do Biofilme, adaptada de: http://www.usp.br/agen/?p=226558, data de acesso: 17/11/2017.

Ao incorporar-se na superfície de equipamentos e utensílios, estes resquícios tornam-se centros de contaminação, onde posteriormente ocorre a adesão de células não-sesseis oriundas do meio líquido na superfície sólida, que dar-se-á através de sinais externos ao meio, como mudança na concentração de nutrientes, pH e temperatura da superfície de contato, sendo este considerado o primeiro estágio na formação do biofilme (CHMIELESWSKI e FRANK, 2003).Nesta etapa (indica na figura 1 como etapa I), a aderência é considerada reversível, pois as interações entre os microrganismos e a superfície de contato (substrato) são fracas (WATNICK e KOLTER, 2000).

No segundo estágio (II) ocorre a fixação considerada irreversível, onde as interações entre o substrato com os microrganismos tornam-se mais fortes, devido à formação e produção das substâncias poliméricas. Nesta etapa ocorre também a diminuição da mobilidade, que está relacionada com a formação de camadas, aumentando desta forma a rigidez do sistema (APARNA e YADAV, 2008).

A primeira maturação, terceiro estágio (III), é caracterizada pela formação de micro colônias provenientes da etapa de formação da matriz polimérica. No quarto estágio, segunda maturação (IV), o biofilme está completamente formado alcançando

seu tamanho e espessuras finais; apresentando uma estrutura abstrusa com a presença de canais e poros, estabelecendo-se em um arranjo tridimensional. A partir deste estágio é possível especificar morfologicamente o biofilme, atentando-se para suas propriedades como tamanho e forma (STOODLEY et al., 2002). O quinto e último estágio (V) no ciclo de formação do biofilme é caracterizado pela liberação celular de microrganismos ao meio (APARNA e YADAV, 2008).

1.3 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são microrganismos gram-positivos pertencentes à família Micrococcaceae. Essas bactérias se apresentam em arranjos diversificados, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados de forma irregular (com aspecto semelhante a um cacho de uvas). Isso acontece devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares, sendo este último comum para *Staphylococcus aureus* (Figura 2) (TRABULSI e ALTHERTHU,2005; KONEMAN. *et al*., 2001).

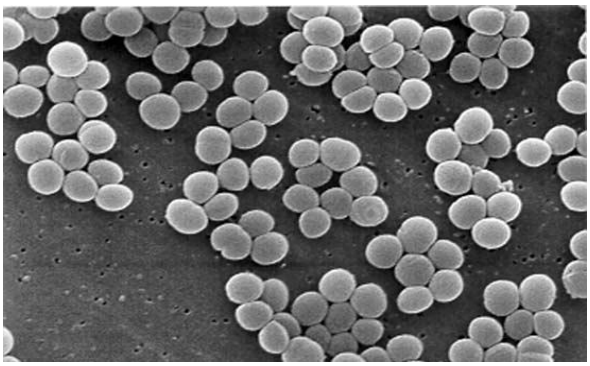

Figura 2 – Arranjo em aspecto cacho de uvas, comum em algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, principalmente ao *S.aureus*, adaptado de: https://www.britannica.com/science/Staphylococcus-aureus , data de acesso: 15/11/2017.

O gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo a espécie *S. aureus* uma das mais importantes do ponto de vista médico, por ser um agente patogênico que

causa infecções comunitárias, como, endocardite, síndrome de choque tóxico, septicemia, dentre outras (SANTOS et al., 2007).

S. aureus mostra-se como um agente patogênico de alta relevância devido a sua capacidade adaptativa, que leva ao aumento da resistência aos antibióticos (Lowy, 1998). Este patógeno possui também a capacidade de formar biofilme, geralmente se fixando em superfícies metálicas, sendo este um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares, uma vez que esses microrganismos podem contaminar os aparelhos metálicos utilizados nesses ambientes (DAVIS, 2005).

As infecções causadas por este patógeno não se limitam em uma zona de ação específica, podendo ocorrer em outros locais do corpo humano, onde, de acordo com a localização e propriedades, recebem diferentes nomenclaturas, como foliculite (infecção do folículo piloso), furúnculos (infecção localizada na região cervical posterior-pescoço) e hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas) (BRAUNWALD *et al*., 2002; SCHECHTER e MARANGONI ., 1998).

Essa espécie apresenta uma alta capacidade adaptativa, assim como mecanismos complexos de proliferação no hospedeiro, o que confere a esta cepa um alto potencial infeccioso (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). Outros fatores que aumentam a eficiência deste microrganismo, do ponto de vista de suas capacidades de resistência e de propagação, está relacionado com a produção de estruturas moleculares, como enzimas, a citar as β-lactamases, a proteína ligadora de penicilina (PBP- protein binding penicilin) seguida de modificações na capacidade de ligação das PBPs e algumas toxinas (IWATSUKI et al., 2006; WENZEL e EDMOND .,1998).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* são gram-negativos pertencentes à família *Pseudomonadaceae,* apresentando este gênero 200 espécies e 18 subespécies. Estas cepas apresentam-se como bacilos, aeróbios e móveis, de forma isolada, aos pares ou em curtas cadeias, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* um dos principais patógenos deste gênero (Figura 3) (GYLES et al., 2010).

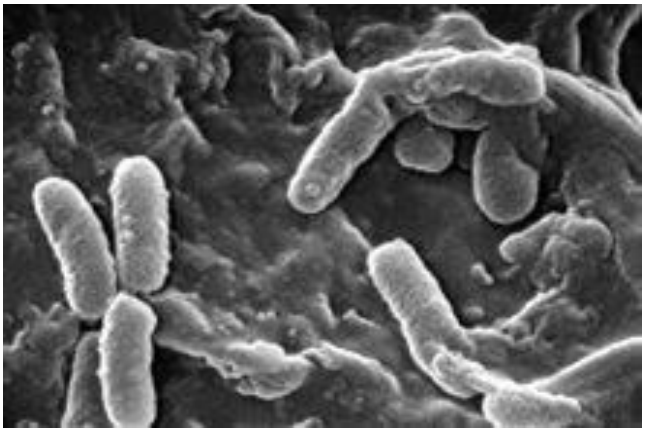

Figura 3 – *Pseudomonas aeruginosa*, em sua forma bastão característica desta espécie, visualizada em microscopia eletrônica, adaptada de: https://et.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa, data de acesso: 15/11/2017.

A proliferação da *P. aerugionosa* é propicia por ser uma bactéria de fácil adaptação ao meio, podendo a mesma ser encontrada no solo, em corpos d'água e também em ambientes hospitalares. Este microrganismo está em raras ocorrências presente na microbiota normal de humanos e a prevalência de colonização em pessoas saudáveis é relativamente baixa (FRENCH e PHILLIPS, 1996).

P.aeruginosa possui alta relevância médica, por se tratar de um patógeno humano, também é um microrganismo formador de biofilme, permitindo fixar-se em estruturas de ventilação mecânica e em aparelhos hospitalares (como cateteres e drenos). A presença de biofilmes de *P.aeruginosa* leva a ocorrência de infecções nosocomiais, que estão se tornando cada vez mais frequentes, tendo como principais alvos pacientes debilitados ou que apresenta baixa imunidade, o que caracteriza esta espécie como um patógeno oportunista (TORTORA et al., 2012; LYCZAK et al., 2000). As principais infecções associadas a este patógeno são pneumonia hospitalar, infecções do trato urinário, infecções pós-cirúrgicas e bacteremia (GOMEZ et al, 1998).

Outro fator que confere a *P.aerugionosa* ser um patógeno de importância é sua capacidade adaptativa frente aos antibióticos, permitindo que esta bactéria torne-se

resistente aos mesmos (CLOETE, 2003). Esta espécie apresenta mecanismos complexos que auxiliam em sua resistência frente aos antimicrobianos, como por exemplo, diminuição da permeabilidade da membrana externa e os sistemas de efluxo, sendo estes últimos capazes de remover agentes antimicrobianos de sua estrutura celular, dentre outros (LI et al, 2000).

1.3.3 *Candida*

O gênero *Candida* é caracterizado por se apresentar como leveduras, exibindo cerca de 200 espécies, das quais se destacam , *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida lusitaniae*, por possuírem relevância médica devido às infecções que acometem em seus hospedeiros, a citar candidíase (HSUEH et al., 2005).

A candidíase é uma infecção causada pelos microrganismos pertencentes ao gênero *Candida*, tendo esta na maioria dos casos origem endógena, ou seja, desenvolve-se ou se reproduz no interior de um hospedeiro preferencialmente debilitado (HOLLENBACH, 2008). Estas leveduras possuem a capacidade de invadir e posteriormente colonizar tecidos e órgãos acometidos, sendo este seu principal fator de virulência (BROWN et al., 2007).

Dependendo do local onde a infecção se desenvolve e da imunidade do hospedeiro, a mesma pode ser classificada como sendo uma infecção ou candidíase sistêmica, que acometem principalmente pacientes pré-debilitados, podendo os patógenos se proliferarem por meio das vias circulatórias, percorrendo toda a circulação sendo capaz de se instalarem em diferentes órgãos do corpo. A segunda forma é a infecção superficial que se instaura principalmente na superfície da pele e mucosas (JAYATILAKE e SAMARANAYAKE 2010).

Os patógenos deste gênero apresentam mecanismos importantes de proliferação para sua sobrevivência ocasionando desta forma infecções em seus hospedeiros (TORTORA et al., 2012). Os mecanismos relacionam-se com a fixação a superfície do hospedeiro ou de materiais, capacidade de formação de estruturas com funcionalidade de adaptação ao meio e a produção de enzimas atuantes em meio aquoso (VARGAS et al., 2000).

As *Candidas* devido aos seus mecanismos de adesão podem se fixar em diferentes superfícies, estendendo-se para materiais inorgânicos, como por exemplo, utensílios hospitalares, podendo levar a formação de biofilmes em sua superfície, o que vem a facilitar a propagação destes patógenos e, por conseguinte sua contaminação (ANVISA, 2004; DAGDEVIREN., et al. 2005).

Devido a estes fatores de patogenicidade, estas espécies são classificadas como agentes patogênicos oportunistas, sendo as mesmas responsáveis por cerca de 10% das causas de infecções nosocomiais (HOSSAIN et al., 2003). A *C. albicans* é relatada como sendo a mais comum nas infecções causadas pelas leveduras deste gênero, posteriormente tem-se de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (ANVISA, 2004).

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são componentes que integram os metabolitos secundários das plantas, ou seja, fazem parte do sistema não primal destes organismos, possuindo funções de proteção contra elementos externos às plantas. Os óleos essenciais referem-se a uma mistura complexa de compostos lipossolúveis, voláteis, aromáticos e com baixa ou ausência de viscosidade, podendo conter em sua composição cerca de 100 ou até mais componentes (AZAMBUJA, 2012; SIMÕES, 2010).

A formação de óleos essenciais não se restringe a uma única parte do vegetal, podendo toda a planta possuir estoque desta mistura de voláteis, entretanto a composição química pode variar de acordo com a zona de formação. Fatores como localidade, tipo de solo e o período de plantio e colheita também podem alterar a composição química dos óleos essenciais provenientes de uma mesma espécie (PAULUS et al., 2013; TAVEIRA et al., 2003; LEAL et al., 2001).

A constituição química dos óleos essenciais apresenta uma variedade de classes funcionais, a citar hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e alguns compostos contendo enxofre em sua estrutura (SIMÕES, 2010). A mis-

tura destes voláteis não se apresenta de forma uniforme, possuindo diferentes concentrações para cada composto, onde um único ou grupo destes constituintes são considerados o composto(s) majoritário(s), os demais constituintes do óleo são minoritários, apresentando-se em baixas concentrações chegando em nível de traços (BRIELMAN et al, 2006).

1.4.1 Métodos de extração de óleos essenciais

A extração de óleos essenciais pode ser realizada por diversas técnicas, a citar: infusão, enfleurage, prensagem, arraste a vapor, extração por solventes e CO_2 supercrítico (CERPA et al.,2008; SIMÕES, 2010). A escolha por qual método será realizada a retirada de óleo essencial do material vegetal tem como critérios as partes da planta em que se quer extrair assim como o tipo de produto final pretendido, considerando suas características (CASSEL et al., 2009; SILVEIRA et al., 2012).

Dentre as técnicas por arraste de vapor a hidrodestilação é bastante difundida, devido aos rendimentos razoáveis obtidos após a extração, assim como seu manuseio acessível (CHAVEZ, 2007). Esta técnica se fundamenta na imersão de material vegetal, podendo o mesmo estar inteiro ou triturado, em água destilada posteriormente aquecida, onde o vapor d'água formado arrastará o óleo essencial, pois este último apresenta uma pressão de vapor maior que a da água. Em geral nesta técnica é utilizado um extrator do tipo Clevenger modificado (SILVA et al., 2016; SARTOR, 2009).

1.5 FAMÍLIA ZINGIBERACEAE

A Família Zingiberaceae, constituída por cerca de 1.220 espécies divididas em 53 gêneros, caracteriza-se por serem plantas de pequeno e médio porte, perenes ou

não, aromáticas, com folhagens emergindo diretamente do solo e exibindo pseudo-caules com até 3m de altura; apresentam inflorescências em alguns espécimes, assim como caules subterrâneos capazes de acumular substâncias nutritivas, sendo estas estruturas denominadas de rizomas (Figura 4) (IBRAHIM et al., 2007; KRESS et al., 2002;).

As espécies desta família em geral são utilizadas na medicina tradicional em países asiáticos, onde se usam com frequência os rizomas e folhas para o tratamento de inflamações (TUSHAR et al., 2010). Os rizomas também são empregados na culinária local destes países, sendo consumidos crus ou cozidos e utilizados como condimentos na aromatização de alimentos (VASALA, 2001).

Alpinia galanga, *Curcuma longa*, *Etlingera elatior, Alpinia Pupurata* e *Zingiber officinale*, são algumas das espécies comumente difundidas em seus países de origem quanto em outras localidades, devido a sua fácil adaptação, sendo os mesmas utilizadas como aditivos e aromatizantes na indústria de alimentos e bebida (VASALA, 2001; MAAS-VAN e MAAS, 2003).

Figura 4 – Partes características das plantas das espécies da Família Zingiberaceae. Inflorescência de *Alpinia Pupurata* (A), folhagens e pseudocaules de *Alpinia zerumbet* 'Variegata' (B) e rizoma de *Zingiber officinale* (C), adaptadas de: http://www.oleosessenciais.org.

Os óleos essenciais de muitas espécies da Família Zingiberaceae apresentam atividades biológicas significativas, como atividades antioxidante, antimicrobianas, inseticidas, larvicidas e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2016; UD-DAULA et al., 2016; SANTOS et al., 2012; CHEIKH-ALI et al., 2011; CHAN et al., 2011).

1.5.1 Óleo essencial de *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith

A *E.elatior*, conhecida popularmente como bastão-do-imperador ou gengibre-tocha, é uma planta de origem asiática, que gradualmente está difundindo-se pelo Brasil devido ao seu aspecto peculiar sendo utilizada como uma planta ornamental (PATRO, 2014; LOGES, 2005). Esta espécie apresenta uma variação de cores com relação a sua inflorescência, indo de um tom branco mesclado ao rosa claro, passando por um rosa escuro indo a um tom avermelhado, denominadas respectivamente como porcelana, *Pink Torch* e *Red Torch* (MENDEZ, 2014; LOGES, 2008).

O óleo essencial dessa espécie pode ser extraído de diferentes partes da planta, a citar o rizoma, folhas, caules e inflorescências. Entretanto composição química torna-se diversificada de acordo com a parte da planta a ser extraída (CHAN et al., 2007; JAAFAR et al., 2007).

Segundo Habsah e col. (2005) o óleo essencial do rizoma da *E. elatior* demonstrou atividade antitumoral, assim como alguns de seus constituintes. É relatada por pesquisadores atividades, a citar: antioxidante, antibacteriana, antifúngica, deterrente e larvicida para *Aedes aegypti* de óleos essenciais de partes desta planta, bem como de óleos extraídos da planta por inteira (SILVA et al., 2016; WIJEKOON et al., 2013; SUNSANTI et al., 2013; CHAN et al., 2011; ABDELWAHAB et al., 2010).

A partir do exposto abordado acerca da problemática microbiana, buscou-se estudar as possíveis atividades biológicas do óleo essencial da *E.elatior* no que tange seu potencial como um inibidor/biocida natural frente aos biocidas sintéticos comerciais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme do óleo essencial da inflorescência da *E. elatior* e de seus compostos majoritários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo essencial da inflorescência da *E. elatior* através da técnica de hidrodestilação;
- Identificar e quantificar os componentes presentes no óleo essencial de *E. elatior* pelas técnicas de Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) e Cromatografia a gás (CG), respectivamente;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial da *E.elatior* e seus componentes majoritários através de testes para obtenção das concentrações mínimas inibitórias (CMI), bactericida (CMB) e fungicida (CMF) frente a patógenos não-resistente e resistentes à antimicrobianos;
- Avaliar o potencial antibiofilme das amostras ativas do óleo essencial da *E.elatior* e de seus componentes majoritários;

3 METODOLOGIA

A presente pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Química Fundamental (Laboratório de Ecologia Química e Laboratório de Cromatografia) e no Departamento de Bioquímica e Fisiologia (Laboratório de Bioquímica de Proteínas), ambos localizados na Universidade Federal de Pernambuco.

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Triturador Elétrico

Para a liquidificação das inflorescências foi utilizado um triturador elétrico da marca Oster®, modelo 4655-057.

3.1.2 Aparelhagem extratora

O óleo essencial foi extraído utilizando-se um extrator do tipo Clevenger modificado (Figura 5), estando o mesmo conectado a um balão de fundo redondo com capacidade para 5L, onde uma manta aquecedora da marca QUIMIC®, modelo Q321A28 foi usada como fonte de calor e um condensador, tendo este como função o resfriamento.

Figura 5 – Aparelho do tipo Clevenger modificado, utilizado no processo de hidrodestilação. Fonte: Própria.

3.1.3 Análise de CG-EM e CG

Posteriormente a extração do óleo essencial, o mesmo foi analisado através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas baseada em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG-EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), munido de uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm, 0.25 µm espessura da película). A quantificação dos constituintes deu-se através de análise por CG (Trace GC Ultra; Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com um detector de ionização por chama (DIC) (Thermo Scientific, Milão, Itália) e uma coluna capilar de sílica fundida VB-5 (ValcoBond 30 m × 0,25 mm Id: espessura do filme: 0,25 mm) (Valco Instruments Company Inc., Houston, TX, EUA).

3.2 METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Amostra Vegetal

As inflorescências da espécie *E. elatior* (Jack) R.M Smith da variedade vermelha (Figura 6) foram obtidas comercialmente por Florix Flora Tropical (Recife/Pernambuco). Após a coleta e entrega da amostra vegetal, a mesma foi mantida em água por um período de 24 horas até o início da extração.

Figura 6 – Inflorescências da variedade vermelha da *E. elatior*. Fonte: Própria.

3.2.2 Extração do Óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Foram utilizadas 525 g de inflorescências frescas (14 no total) da variedade vermelha.

A hidrodestilação foi à técnica utilizada para promover a extração do óleo essencial. A amostra vegetal foi triturada em 500 mL de água destilada, por cerca de 1

minuto e meio. Posteriormente a amostra foi transferida para um balão de fundo redondo (5 L), onde foi acrescido 2L de água destilada e colocado em uma manta de aquecimento mantida numa faixa de temperatura de 160-170 ºC. O balão foi mantido conectado ao aparelho do tipo Clevenger e um condensador. Este processo foi conduzido durante 3 horas, coletando-se ao final o óleo (Figura 7) e em seguida tratando-o com sulfato de sódio anidro P.A para retirada de resquícios de água oriunda do processo. O óleo foi então mantido em geladeira (temperatura de -5 ºC) até a realização da análise da composição química e dos bioensaios. O rendimento do óleo essencial foi então calculado a partir da massa de óleo obtida pela massa vegetal utilizada.

Figura 7 – Óleo essencial durante o processo de extração, a seta indica o óleo sobre o hidrolato (subproduto obtido no processo de hidrodestilação). Fonte: Própria

3.2.3 Caracterização química do óleo essencial

A caracterização química dos componentes que constituem o óleo essencial, assim como a quantificação dos mesmos, foi realizada no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química Fundamental da UFPE, empregou-se as técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) (Agilent

Technologies, Palo Alto, EUA) e Cromatografia Gasosa (CG) (Trace GC Ultra; Thermo Scientific, Milão, Itália) equipado com um detector de ionização de chama .

Incialmente foi analisada uma alíquota de 1μL de solução de óleo essencial à concentração de 1700 ppm em modo *split*, com razão de 1:50. Em seguida, analisou-se 1μL em modo *split* 1:50 de uma mistura hexânica, preparada com padrões comerciais Sigma-Aldrich®, de hidrocarbonetos: C9-C30. E por fim, uma mistura de 0,2μL do óleo essencial e 0,8μL da mistura de padrões de hidrocarbonetos em modo *splitless*.

A temperatura do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas foi ajustada em 60 °C durante 3 minutos e em seguida elevamos gradativamente em 2,5 °C min^{-1} até a temperatura final de 240 °C, mantendo-a fixa por 10 minutos. O fluxo de gás hélio esteve condicionado a pressão constante de 100 kPa. A interface do espectrômetro de massas foi estabelecida em 200 °C, onde os espectros foram registrados através da técnica de impacto eletrônico de 70 elétrons Volts (em modo EI) apresentando 0,5 $scan^{-s}$ de *m/z* 35-350 de velocidade de escaneamento.

A temperatura inicial do cromatógrafo a gás, utilizado na quantificação, foi fixada em 40 °C, mantida durante 2 min, e posteriormente aumentada para 230°C a 4°C/min e então mantida durante 5 min. As temperaturas do injetor e do detector de ionização por chamas foram ajustadas para 250 °C e 280 °C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1 L/min e pressão de entrada de 30 psi.

Através dos tempos de retenção dos compostos presentes no óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e da combinação do óleo/ padrões foram calculados os índices de retenção (I.R) para cada espécie química do óleo, utilizando-se para tal, a equação de Van Den Dool e Kratz, dada a seguir (VAN DEN DOLL e DEC. KRATZ,1963).

$$I.R. = 100 \cdot i \cdot \frac{(trx - trhA)}{(trhD - trhA)} + 100 \cdot N$$

Nesta equação os termos: **trX** se refere ao tempo de retenção do composto/amostra X em questão; **trhA** é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes da amostra/composto X; **trhD** é definido como sendo o tempo do hidrocarboneto eluído após X; os termos **i** e **N** referem-se respectivamente, a diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem anterior e posteriormente a amostra/composto e ao número de carbonos presentes no hidrocarboneto que elui antes da amostra/composto X.

Todos os tempos de retenção utilizados no cálculo, anteriormente apresentado, são obtidos experimentalmente. Os valores calculados obtidos para os I.R. de cada composto foram relacionados com aqueles disponíveis na biblioteca do CG/EM, MassFinder 4, NIST08 e com os descritos por Adams (2009), onde foi possível identificar os componentes presentes no óleo essencial. A quantificação das proporções de cada composto presente no óleo foi obtida através da área relativa de cada pico cromatográfico do cromatograma em CG sob as mesmas condições descritas para as análises de CG-EM.

3.2.4 Obtenção dos compostos majoritários

Os compostos majoritários do óleo essencial, dodecanal (lauraldeído-CAS:112-54-9) com grau de pureza de 95% e 1-dodecanol (álcool láurico- CAS:112-53-8) com pureza de 98%, foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich®.

3.2.5 Microrganismos

As cepas bacterianas de *P. aeruginosa* UFPEDA - 416 (não resistente), *P. aeruginosa* UFPEDA -262 (resistente à meropenem, imipenem e ceftazidima), *S. aureus* UFPEDA-02 (não resistente) e *S. aureus* UFPEDA-672 (cultura de sangue - resistente a oxacilina) foram obtidas da coleção de cultura (WDCM-114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As Leveduras do gênero *Candida*, *C. albicans* (URM 5901), *C. glabrata* (URM 4246), *C. tropicalis* (URM 6551) e *C. parapsilosis* (URM 6345) foram adquiridas da coleção de cultura da Universidade de

Micologia do Recife, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Os microrganismos foram conservados a -80° C em leite em pó esterilizado (10% v / v de glicerol). Para a posterior realização dos bioensaios, os microrganismos foram cultivados em Agar Mueller Hinton (AMH) a 37° C para bactérias e em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) a 28 ° C para as leveduras e, em seguida, as colônias foram suspensas numa solução de cloreto de sódio estéril 0,9% para obter uma suspensão equivalente a 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colônias por ml, ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm.(densidade óptica a 600 ηm ou D.O.600), para a determinação da concentração mínima inibitória (10^6 UFC/mL) e dos ensaios de antibiofilme (10^8 UFC/mL).

3.2.6 Bioensaios antimicrobianos

3.2.6.1 Determinação das concentrações mínimas inibitórias, bactericidas e fungicidas.

Os bioensaios para obtenção das concentrações mínimas inibitórias foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços (8x12) e as amostras foram diluídas em 5% de DMSO. Inicialmente foram adicionados 80 µL de água destilada estéril no segundo e quarto poço em diante até o décimo segundo poço da fileira, e em seguida, 80 µL de soluções do óleo essencial e compostos majoritários do óleo (concentração inicial de 16mg/mL para bactérias e 60 mg/mL para *Candidas*) foram adicionados no terceiro e quarto poços, a partir desse último foi realizada uma micro diluição em série (metade da concentração anterior para cada poço) até o final de cada fileira o segundo poço correspondeu ao controle de crescimento máximo, 100%, o que compreende as células dos microrganismos não tratadas).

Foram adicionados 40 µL de caldo Mueller Hinton (CMH), para bactérias e caldo Sabouraud Dextrose (CSD) para fungos em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µL do meio de cultura apropriado aos testes com bactérias

ou fungos, servindo como controle de esterilidade. Por fim a suspensão bacteriana/fúngica, (80 µl; 10^6 CFU / ml) foi adicionada do segundo até o décimo segundo poço.

Após a etapa de adição do meio de cultura e dos microrganismos nas microplacas, estas foram incubadas durante 24 horas a 37°C para as bactérias e 28°C para as leveduras. A densidade ótica foi medida no tempo zero e após 24 horas usando um leitor de microplacas. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração da amostra capaz de promover uma redução maior ou igual 50% na densidade óptica, em comparação com o controle de crescimento de 100%.

As concentrações mínimas bactericidas (CMB) e fungicidas (CMF) foram determinadas a partir da CMI, onde alíquotas de 20 µL dos poços correspondentes às concentrações das soluções do óleo essencial e de seus compostos majoritários que foram maiores ou iguais a CMI foram inoculadas em placas de Petri contendo AMH e ASD, que foram incubadas durante 24 h a 37° C e 28° C, respectivamente.

As CMB e CMF refletem à menor concentração capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Os bioensaios relatados trataram-se de três experimentos realizados de forma independente onde os mesmos ocorreram em triplicata.

3.2.6.2 Ensaio para determinação de atividade antibiofilme

A metodologia adaptada por Trentin e colaboradores (2011), foi implementada na realização dos ensaios de crescimento e inibição de biofilmes. Em microplacas de poliestireno de 96 poços (8x12) adicionou-se a cada poço 40 µL de CMH ou CSD e 80 µL da suspensão bacteriana ou fúngica (10^8 UFC / mL em NaCl a 0,9%), bem como 80 µl de água Ultrapura Milli-Q (para o controle negativo) e 80 µl do óleo essencial e de seus compostos majoritários. Foram utilizadas as seguintes faixas de concentrações, determinadas anteriormente através dos testes CMI, CMB e CMF: 4 - 0,03 mg / ml para bactérias e 60 -0,47 mg / ml para leveduras, em DMSO 5%.

Foram utilizados os antibióticos, ampicilina e tetraciclina (80 µl a 8 µg / ml) para cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente, e o antifúngico fluconazol (80 µl a 64 µg / ml) contra espécies de *Candida*, como controles positivos.

A densidade óptica a 600 ηm foi determinada no início da incubação, ocorrida a 37° C ou 28° C durante 24 horas, e após esse período. Posteriormente, o conteúdo dos poços foi retirado (células não aderidas) e os poços foram lavados seguidamente três vezes com uma solução de cloreto de sódio a 0,9%. As células bacterianas e fúngicas aderidas à superfície de poliestireno foram fixadas com metanol absoluto durante 30 minutos seguida da fixação a calor em 50 °C ao longo de 60 minutos.

A camada de biofilme foi marcada com uma solução de cristal violeta 0,4% (p / v) durante 25 minutos a 25ºC. Posteriormente, as placas foram lavadas com água, e o cristal violeta foi solubilizado com etanol absoluto a mancha unida ao biofilme foi solubilizada com etanol, durante 15 minutos e a densidade ótica foi medida a 570 ηm. Assim como os ensaios para determinação das concentrações mínimas inibitórias, bactericidas e fungicidas, foram realizados experimentos independentes e em triplicatas.

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas através do teste T, considerando como valores significativos aqueles em que $p<0,05$ entre tratamento e controle (células não tratadas).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO, CARACTERÍSTICAS E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

Segundo Silva (2012), em geral a extração do óleo essencial das inflorescências da espécie *E. elatior* é conduzida durante 3 horas (tempo padrão utilizado durante uma hidrodestilação); entretanto após a segunda hora do processo de extração, a quantidade de óleo produzida é praticamente inalterada, ou seja, a produção do mesmo é mínima no decorrer da última hora, fato este evidenciado durante a extração no laboratório.

Conseguiu-se ao término do processo 0,375 g de óleo essencial, sendo este valor relativo a um rendimento de 0,060% (m/m). O rendimento do óleo essencial da inflorescência, aqui obtido, é coerente com aquele reportado na literatura (SILVA, 2016; ABDELWAHAB et al., 2010; JAAFAR et al., 2007).

As características físicas do óleo deram-se a partir de suas propriedades organolépticas durante e após sua extração. O toque olfativo floral foi bastante pronunciado e marcante mesmo no início do processo de extração. Outra característica interessante, observada do produto obtido é a mudança de coloração. Em temperatura igual ou acima da ambiente (27°C), o óleo é transparente com aspecto líquido. Em temperatura menor que a ambiente, o óleo apresentou uma coloração branca, apresentando uma consistência meio sólida (Figura 8). Essas nuances de coloração se devem ao fato de na constituição química do óleo estar presente uma porcentagem maior de hidrocarboneto de cadeia longa (long chain).

Figura 8 – Aspecto visual do óleo essencial da inflorescência de *E.elatior* refrigerado (A, fotografado o fundo do frasco) e em temperatura ambiente (B). Fonte: Própria.

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA INFLORESCÊNCIA DA *E. ELATIOR*

Através da análise por CG/EM e CG foram identificados e quantificados vinte e três componentes que constituem a amostra de óleo essencial estudada (94,68% da composição total do óleo) (tabela 1), apresentando com uma maior proporção os constituintes dodecanal (58,31%) e 1-dodecanol (20,33%) figura 9.

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial da inflorescência da *E. elatior*.

Nº	Composto	Índice de Retenção **(Calculado)**	Índice de Retenção **(Literatura)** [a]	**%** [b]
1	α-Pineno	931	939	2,66
2	β-Pineno	974	979	0,25
3	β-Mirceno	991	990	0,14
4	Limoneno	1028	1029	0,07
5	β-(*Z*)-Ocimeno	1039	1037	0,09
6	β-(*E*)-Ocimeno	1049	1050	0,12
7	Terpinoleno	1088	1088	0,03
8	α-Termineol	1191	1188	0,05
9	n-Decanal	1206	1201	2,52
10	n-Decanol	1273	1269	0,26
11	2-Undecanona	1294	1294	0,16
12	Metyl myrtenate	1298	1294	0,06
13	n-Undecanal	1308	1306	0,11

14	α- Copaeno	1378	1380	0,09
15	Dodecanal	1411	1408	58,31
16	β -(E)-Cariofileno	1422	1419	4,21
17	α-Cariofileno	1456	1452	0,36
18	β -(E)-Farnesene	1458	1454	2,46
19	1- Dodecanol	1476	1470	20,33
20	2-Tridecanona	1497	1495	0,36
21	δ-Cadineno	1526	1523	0,21
22	Ácido dodecanoíco	1565	1566	0,43
23	Tetradecanal	1613	1611	1,40
	Total			**94.68**

[a] Índices de retenção obtidos de Adams (ADAMS ,2009); [b] Contribuição percentual na composição do óleo.

De acordo com o exposto na tabela, os compostos majoritários, ou seja, aqueles que apresentaram maior proporção foram os constituintes dodecanal (58,31%) e 1-dodecanol (20,33%) figura 9.

(A) **(B)**

Figura 9 – Estrutura do dodecanal (a) e 1-dodecanol(b).

É observado na estrutura dos majoritários que os mesmos são compostos de cadeias carbônicas longas (long chain) o que os fazem apresentar características de ceras (SOLOMONS e FRYHLE,2012). Essa análise explica o fato de em temperaturas menores que a ambiente (27º C) o óleo se solidificar e apresentar a coloração branca observada neste estudo, uma vez que o dodecanal e o 1-dodecanol correspondem a quase 80% da composição química do óleo essencial.

Outros estudos revelaram a identificação de 20 a 43 constituintes no óleo essencial da inflorescência de *E. elatior*, entretanto os compostos dodecanal, 1-dodecanol e α-pineno estiveram presentes em quantidades apreciáveis (ABDELWAHAB et al., 2010; JAAFAR et al., 2007). Como os locais e períodos de obtenção do material

vegetal se diferem, é esperado que a constituição química do óleo essencial, aqui estudado, varie qualitativa e quantitativamente com aqueles obtidos em pesquisas anteriores realizadas por outros pesquisadores.

O clima e a temperatura numa região de cultivo são fatores bastante peculiares no que diz respeito a sua influência em causar variações na constituição química de um óleo essencial (PAULUS et al., 2013; TAVEIRA et al., 2003). A correlação entre os fatores citados com composição do óleo pode ser considerada ao se comparar a composição e o rendimento do óleo da inflorescência de *E.elatior*, variedade vermelha, obtido neste trabalho com aquela obtida por Silva e col. (2016), em que um número maior de constituintes foi observado no trabalho de Silva ,43 compostos foram identificados.

Tendo em vista que o fornecedor do material vegetal foi o mesmo em ambos os trabalhos, o fator variante pode ser o clima, uma vez que as inflorescências, utilizadas nesta pesquisa, foram provenientes durante o período de chuvas da região. Entretanto os compostos majoritários para ambos os óleos relatados, foram os mesmos (dodecanal ,1-dodecanol e α-Pineno), tendo apresentado mais de 80% da composição química total do óleo para os dois trabalhos.

4.3 BIOENSAIOS ANTIMICROBIANOS

4.3.1 Concentrações mínimas inibitórias (CMI), bactericidas (CMB) e fungicidas (CMF)

O óleo essencial da inflorescência de *E. elatior* e seus compostos majoritários, dodecanal e 1-dodecanol, foram testados frente a cepas padrão e resistentes a antibióticos do gênero *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, respectivamente, tendo por finalidade a obtenção das CMI e CMB.

Após o período de 24 horas do início dos testes relatados na seção 3.2.6.1, foi observado que as três amostras estudadas demonstraram ação bacteriostática contra a cepa não resistente de *S.aureus* (tabela 2). Os valores obtidos do CMI e CMB foram os mesmos, sendo esses relativamente baixos, correspondendo à 0,124, 0,062 e 0,031 mg/mL.

Em um estudo semelhante em que foram utilizadas outras cepas bacterianas, Wijekoon e colaboradores (2013) evidenciaram que os compostos majoritários presentes no óleo essencial da inflorescência da *E. elatior*, aqui estudados, dodecanal e o 1-dodecanol, também apresentaram excelentes atividades antimicrobianas, do ponto de vista bacteriostático e bactericida.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial da *E.elatior* e de seus compostos majoritários.

	Valores de CMI,CMB e CMF		
Microrganismos	**Óleo essencial**	**1-Dodecanol**	**Dodecanal**
Staphylococcus aureus (padrão)	0,124 mg / mL *	0,062 mg / mL *	0,031 mg / mL*
Staphylococcus aureus (resistente)	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa (padrão)	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa (resistente)	4 mg/ mL *	-	-
Candida albicans	-	60 mg/ mL *	60 mg / mL *
Candida tropicalis	-	-	60 mg / mL *
Candida glabrata	-	-	60 mg / mL *
Candida parapsilosis	-	-	60 mg / mL *

- Negativo, não apresentou atividade inibitória na faixa de concentração testada (bactérias 0,031-4 mg/mL e fungos 0,47 - 60 mg/mL).

***** Os valores das CMB e CMF foram iguais às CMI.

Kabara e colaboradores (1972) realizaram um estudo avaliando a ação antimicrobiana de ácidos graxos em cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas. No estudo em questão, os autores mostraram que o ácido láurico (ácido dodecanóico), presente no óleo essencial da *E.elatior* usado neste trabalho em baixa concentração,

consegue inibir bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*, aqui estudada. Os mesmos autores ainda relataram que houve um aumento na eficácia da ação antimicrobiana (atividade bacteriostática) ao se utilizar derivados de ácido graxos, em particular os derivados do ácido láurico, como o dodecanal e o 1-dodecanol. Isso vem a corroborar o potencial destes compostos como antimicrobianos, pelos resultados obtidos experimentalmente por esta pesquisa.

Com relação à cepa resistente de *P.aeruginosa*, somente o óleo essencial apresentou efeito inibitório, exibindo uma CMI de 4 mg/mL, entretanto não foi evidenciada qualquer ação bactericida frente a esta cepa. Os compostos majoritários não foram eficazes no que se refere à inibição e consequente atividade bactericida frente a *P. aeruginosa*. Por ser uma complexa mistura de compostos voláteis, o óleo essencial da *E.elatior* apresentou uma atividade inibitória que seus compostos majoritários, separadamente não demonstraram. Desta forma, um efeito sinérgico entre os constituintes do óleo pode ter auxiliado na atividade bacteriostática evidenciada.

Os óleos essenciais apresentam uma variedade de mecanismos para interagir com a membrana celular de microrganismos, promovendo a sua entrada no interior das mesmas. Segundo Kon e Rai (2012), a composição química multicomponente e os complexos mecanismos de ação dos óleos essenciais lhes dão vantagens sobre os antimicrobianos tradicionais e de seus compostos isoladamente, que em geral, apresentam ações mais singulares sobre as estruturas bacterianas.

Matasyoh e colaboradores (2009) relataram que a eficácia da ação dos óleos essenciais em inibir ou matar microrganismos está no fato da susceptibilidade que os constituintes do óleo possuem em penetrar na membrana celular e também nas estruturas celulares. Ao penetrar a barreira celular dos microrganismos, os constituintes do óleo podem destruir esta barreira e levar a perda do controle quimiosmótico.

O CMI e CMF também foram determinados para o óleo essencial e seus constituintes majoritários contra algumas espécies de leveduras do gênero *Candida*, com a finalidade de se avaliar a ação antifúngica desses compostos. O óleo essencial não apresentou propriedades inibitórias, ou seja, fungistáticas. Entretanto o composto dodecanal exibiu um efeito inibitório significativo frente a todas as espécies de *Candida* testadas (tabela 2).

O composto 1-dodecanol a 60 mg/mL apresentou atividade fungistática (mas não fungicida) contra *C. albicans*. Uma pesquisa realizada por Kubo e colaboradores (1993) destaca a atividade antimicrobiana do 1-dodecanol, pois analisou-se que álcoois alifáticos e compostos estruturalmente simples apresentam uma maior disponibilidade, ou seja, podem se ligar a sítios em estruturas celulares devido à ausência de impedimento estérico, o que confere aos mesmos bons resultados para testes antimicrobianos. O estudo ainda revelou que álcoois alifáticos de cadeias C_{12} e C_{13} apresentaram melhores resultados no que se refere a atividades inibitórias.

Apenas o dodecanal apresentou ação fungicida na concentração de 60 mg/mL, unicamente contra *C. albicans* (CMF de 60 mg/mL). Por se tratarem de organismos mais complexos que as bactérias, as leveduras apresentam uma membrana celular diferente, resistindo à ação de compostos externos podendo impedir a entrada dos mesmos no interior da célula, evitando o vazamento de conteúdo celular (ALMEIDA et al., 2012; AMARAL e BARA., 2005).

4.3.2 Determinação da atividade antibiofilme

Os ensaios da atividade de inibição do biofilme foram realizados para as amostras em que foram previamente determinados os valores da CMI. Os efeitos da resposta na formação do biofilme e no crescimento microbiano, para estes testes, foram avaliados por meio de ensaio com cristal violeta e densidade ótica a 600 nm, respectivamente. Os valores obtidos para o controle corresponderam a 100% de formação de biofilme ou crescimento bacteriano/fúngico.

Desta forma, o óleo essencial foi testado contra as cepas de *P. aeruginosa* UFPEDA-262 e *S. aureus* UFPEDA-02 (Figura 10). Os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento bacteriano e a formação do biofilme para ambas as cepas testadas. Para *P. aeruginosa* 262, observou-se uma ação bacteriostática, em até 30% de inibição em todas as concentrações avaliadas (0,03-4 mg / mL) em comparação com 59% do efeito do antibiótico (tetraciclina) na concentração de 8 µg/mL. O óleo apresentou melhor eficiência na redução do desenvolvimento do biofilme (cerca de 40%, em 4mg/mL), enquanto que a tetraciclina não inibiu o crescimento do biofilme (Figura 10A).

Para *S. aureus* UFPEDA-02, o óleo reduziu (ou atuou) de forma significativa no crescimento bacteriano bem como na formação do biofilme (Figura 10B). Após o tratamento com óleo essencial em uma faixa de concentração que variou de 0,03 a 4 mg/ mL, foi observada uma redução do crescimento bacteriano, de 19 a 53%, e uma diminuição da formação de biofilme de mais de 50% em todas as concentrações testadas, em relação ao controle (células não tratadas).

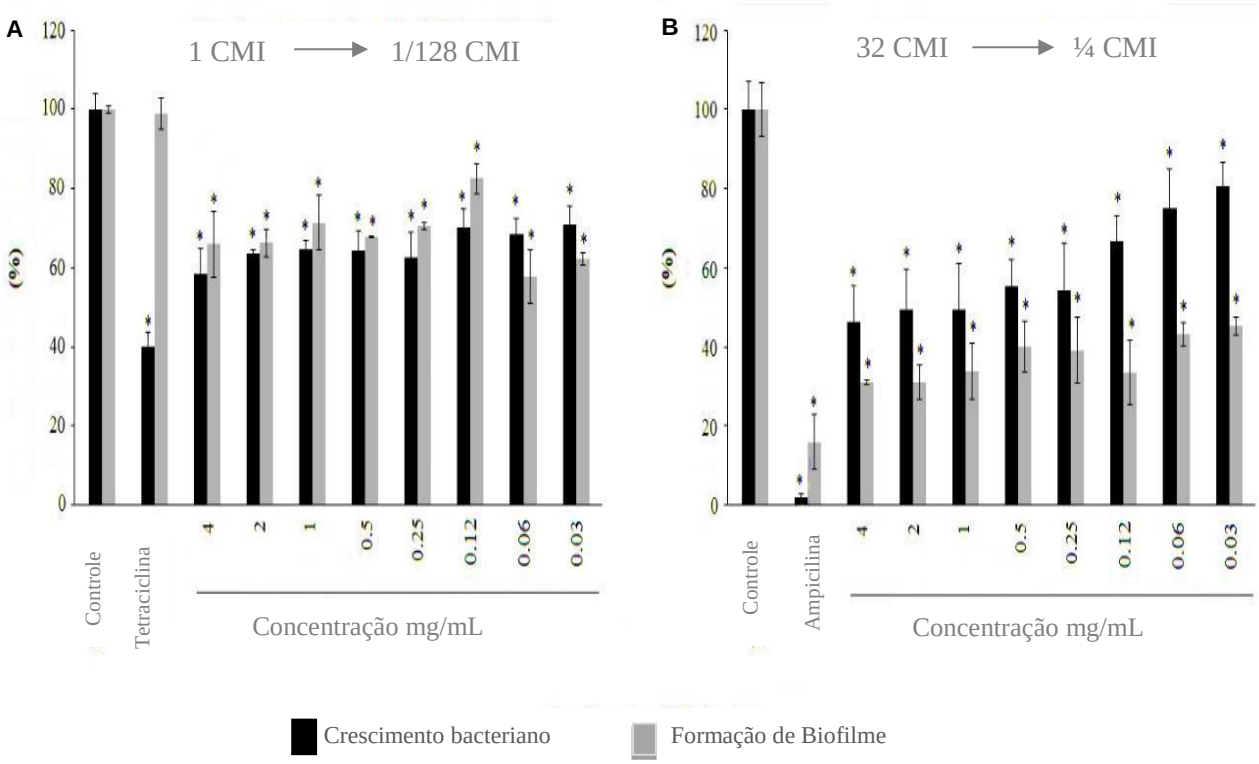

Figura 10 – Efeito do óleo essencial da inflorescência de *E.elatior* na formação do crescimento e biofilme bacteriano das cepas de *P.aeruginosa* UFPEDA 262 (A) e *S.aureus* UFPEDA 02 (B). (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e controle (células não tratadas).

A crescente exposição de biocidas sintéticos não metabolizados no ambiente leva a uma crescente preocupação com o desenvolvimento de microrganismos resistentes, como discutido anteriormente, o que porventura vem causando um significativo desgaste fármaco-econômico (BERENDONK et al., 2015). Antimicrobianos naturais

apresentam-se como uma alternativa neste contexto, uma vez que os mesmos são menos suscetíveis a induzir a resistência, limitando o surgimento e propagação de microrganismos.

Como observado nos resultados, o óleo essencial apresentou uma ação inibitória considerável frente ao crescimento e formação de biofilmes dos microrganismos patogênicos estudados, o que converge com as inúmeras pesquisas acerca do potencial dos óleos essenciais apresentarem ação sanificante (BUDZYÑSKA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; NOSTRO et al., 2007).

O dodecanal foi avaliado acerca de sua atividade antibiofilme contra uma cepa de *S. aureus* UFPEDA-02 e todas as espécies de *Candida* utilizadas neste estudo (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*). Este constituinte majoritário do óleo essencial reduziu o crescimento bacteriano da *S. aureus* não resistente (Figura 10), *C. albicans* (Figura 11A) e *C. tropicalis* (Figura 11B), nas concentrações mais altas de 4mg/mL do composto para a cepa bacteriana e 60 mg/mL para as leveduras. Nesse ensaio constatou-se uma inibição de crescimento de 86%, 92% e 50% para as respectivas espécies. Efeito inibitório não foi considerado para *C. albicans* em concentrações mais baixas (0,93 e 0,47 mg/mL).

O fluconazol a 64 µg/mL mostrou capacidade semelhante para inibir o crescimento de *C. tropicalis* (aproximadamente 50%), o que evidencia o efeito similar de ação inibitória entre o dodecanal e o medicamento comercialmente mais utilizado no tratamento de candidiase, fluconazol.

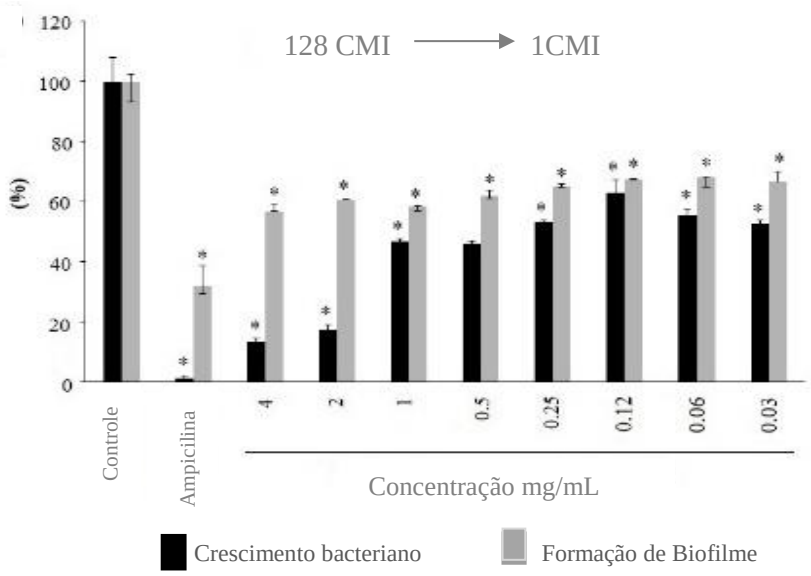

Figura 11 – Efeito do dodecanal na formação do biofilme e crescimento bacteriano da cepa não resistente de *S.aureus* UFPEDA-02. (*) indica diferença significativa (p <0,05) entre tratamento e controle (células não tratadas).

A inibição do crescimento microbiano para *C. glabrata* (Figura 12C) e *C. parapsilosis* (Figura 12D) foi mínima, não excedendo 20% da inibição após o tratamento com dodecanal. O fluconazol, a 64 µg/mL, também não apresentou muita eficácia contra *C. parapsilosis,* entretanto demonstrou eficiência contra *C. glabrata* inibindo 11% e 44% do crescimento, respectivamente.

1 CMI ⟶ 1/128 CMI

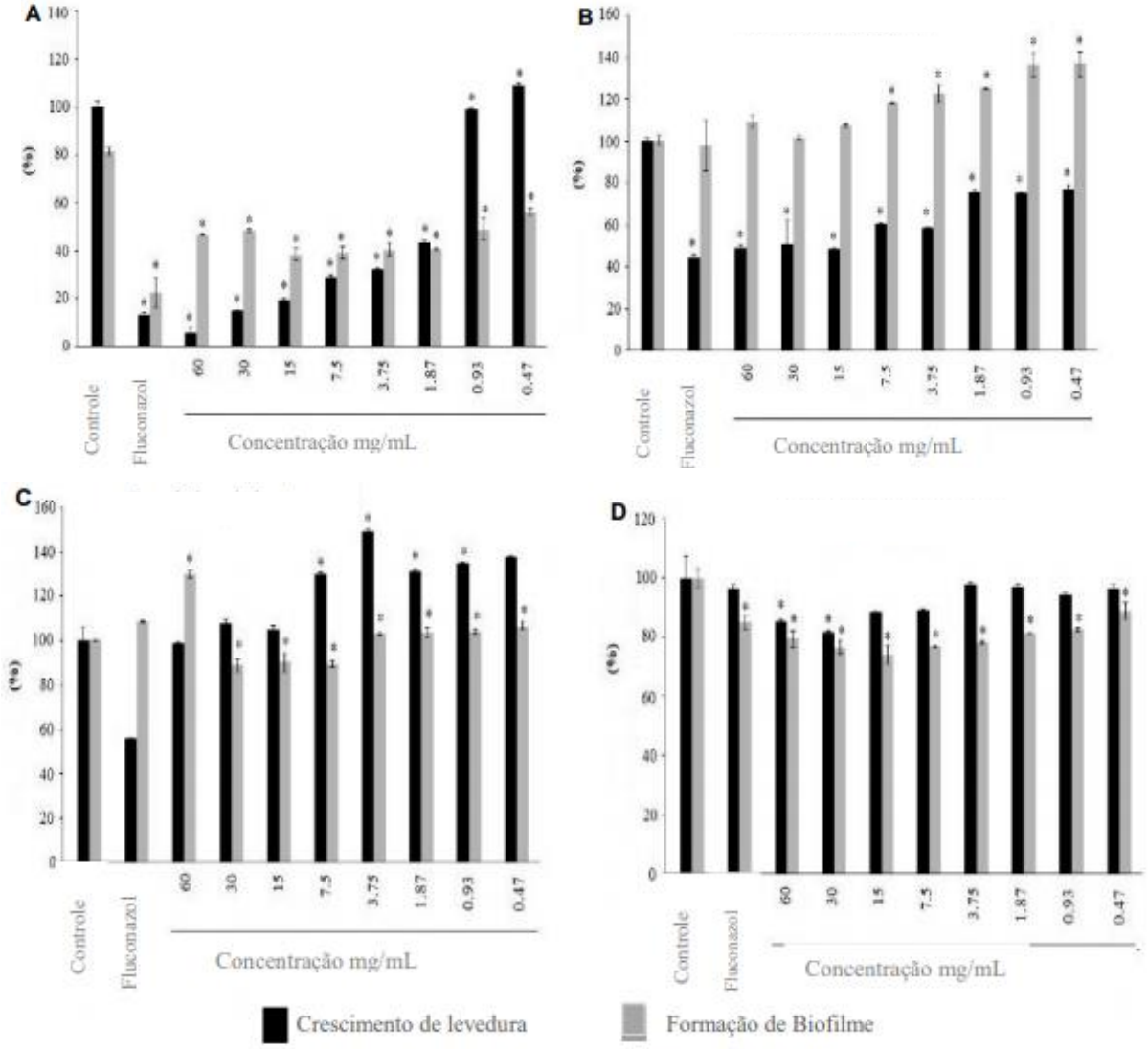

Figura 12 – Efeito do dodecanal na formação de biofilmes e crescimento microbiano das leveduras *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B), *C.glabrata* (C) e *C. parapsilosis* (D). (*) indica diferença significativa (p <0,05) entre tratamento e controle (células não tratadas).

Com relação à formação de biofilme, o dodecanal foi avaliado frente os microrganismos *S. aureus* UFPEDA-02 e *C. albicans* variando de 0,03-4 mg/mL e 0,47-60 mg/mL, respectivamente. Para essas espécies, o efeito antibiofilme foi superior a 30% atingindo 53%, sendo os melhores resultados quando a 4 mg/mL para bactéria (43%)

e 15 mg/mL para levedura (53%). É observada que a inibição do biofilme para o dodecanal (15 mg/mL) é semelhante àquela do fluconazol (64 µg/mL), que apresentou inibição de não mais de 70% do biofilme para as espécies estudadas.

Os resultados obtidos para *C. tropicalis* (Figura 12B), o dodecanal quando a 0,47-7,5 mg/mL estimula o crescimento do biofilme e na faixa de concentrações de 15-60 mg/mL não houve alteração. Para *C*. *glabrata* (Figura 12C), quando a 60 mg/mL também houve aumento da formação do biofilme, assim como nas concentrações de 0,47 a 3,75 mg/mL. Foi observado que para *C. glabrata* quando a 30,15 e 7,5 mg/mL houve diminuição do biofilme. Para *C. parapsilosis* (Figura 12D) foi observado uma significativa diminuição da formação do biofilme em todas as faixas de concentrações analisadas. De forma geral os resultados foram significativos, para células microbianas tratadas com dodecanal quando comparadas aquelas tratadas com fluconazol (64 µg/mL) que estimulou a formação do biofilme.

Para o composto 1-dodecanol também foi avaliada a atividade antibiofilme frente aos microrganismos *S. aureus* UFPEDA-02 e *C. albicans* (Figura 13). Observou-se inibição do crescimento de *S. aureus* após o tratamento com 1-dodecanol, principalmente na concentração de a 4 mg/mL, onde se constatou de 70% de inibição (Figura 13A) em comparação com as células não tratadas.

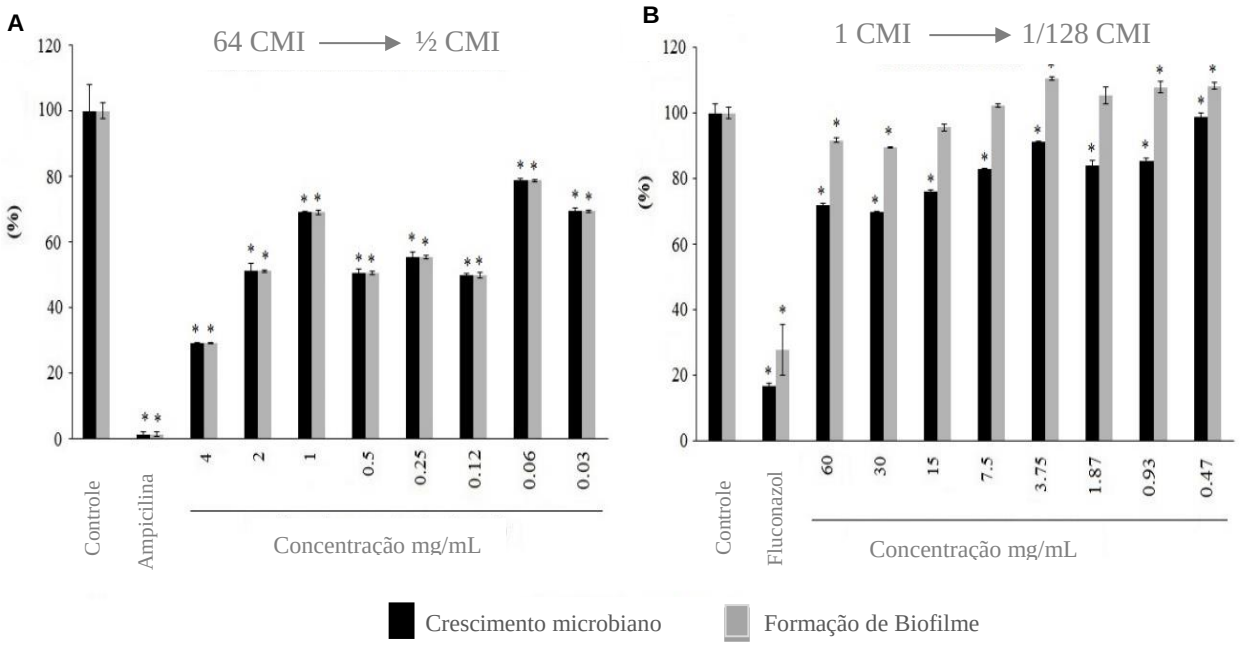

Figura 13 – Efeito do 1-dodecanol na formação de biofilmes e no crescimento microbiano de cepas de *S. aureus* (A) e *Candida albicans* (B). (*) indica diferença significativa (p <0,05) entre tratamento e controle (células não tratadas).

Estes resultados corroboram com aqueles relatados anteriormente por Kubo e col. (1993), devido à alta disponibilidade e estrutura relativamente simples deste composto. Similarmente, após o tratamento com o 1-dodecanol, o crescimento de *C. albicans* foi afetado, mas em menor grau, atingindo 30% de inibição quando utilizada uma concentração de 30 mg / mL (Figura 12B). O fluconazol apresentou um percentual de inibição de 80% do crescimento desta levedura após o período de incubação de 24 horas.

A formação do biofilme de *S. aureus* foi impedida após o uso do 1-dodecanol em todas as concentrações mensuradas, atingindo aproximadamente 70% de inibição de formação, quando utilizado em uma faixa de concentração de 0,12- 4 mg / mL. Este efeito só foi menor para aquele observado com o uso de ampicilina (8 µg/mL). Entre-

tanto, o 1-dodecanol não inibiu de forma expressiva (30 - 60 mg/mL) o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, quando comparado com a ação do fluconazol que inibiu 70%.

5 CONCLUSÃO

Através do estudo realizado foi possível observar a composição química do óleo essencial da inflorescência da *E.elatior* e compara-lo com a composição descrita na literatura, onde foi constada a semelhança química dos constituintes majoritários do óleo aqui estudado com o obtido por outros pesquisadores. Foram observados os potenciais antimicrobianos e antibiofilmes do óleo essencial e seus compostos majoritários frente a patógenos humanos de relevância.

O óleo essencial da *E.elatior* apresentou atividade inibitória no crescimento bacteriano de uma cepa resistente de *P.aeruginosa* e *S.aureus*, sendo esta ultima não resistente. Foi constatado também que o óleo apresentou uma ação bactericida contra a cepa de *S.aureus*.

Os compostos majoritários do óleo essencial, dodecanal e 1-dodecanol, exibiram atividades antimicrobianas de ação bacteriostática e bactericida, assim como ação inibitória para as leveduras. Entretanto, apenas o dodecanal apresentou atividade fungicida. O óleo essencial e ambos os compostos majoritários apresentaram atividade antibiofilme contra bactérias, mas apenas o dodecanal apresentou atividade antibiofilme expressiva contra as espécies de Candidas.

Em suma, o óleo essencial da inflorescência da *E. elatior*, assim como seus compostos majoritários, no que se refere às propriedades antibacterianas e antifúngicas, se mostraram eficientes, visto os seus potenciais como possíveis agentes antimicrobianos e antibiofilmes, por terem apresentado bons resultados para as atividades biológicas analisadas.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar a extração do extrato da inflorescência da *E.elatior* em meio aquoso e etanólico, para realização de um estudo de suas atividades antimicrobianas;
- Identificar os constituintes presentes nos extratos aquosos e etanólicos da inflorescência da *E*. *elatior*;
- Identificar os componentes ativos dos extratos aquoso e etanólico;
- Realizar ensaios de bomba de efluxo bacteriano para o óleo essencial da inflorescência e seus compostos majoritários;
- Realizar testes citotóxicos nas faixas de concentração obtidas nas CMI,CMB e CMF para o óleo essencial e seus constituintes majoritários.

REFERÊNCIAS

1. ABDELWAHAB, S. I. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of the essential oils of Etlingera elatior and Cinnamomum pubescens Kochummen. **J. Sci. Food Agric***.* v.90**,** p.2682–2688, 2010.
2. ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; 4th ed. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009.
3. ALMEIDA, L.F.D. *et al*. E.O. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de Candida albicans isoladas de pacientes HIV positivos. **Rev. Bras. Pl. Med**. v.14, 649-655, 2012.
4. AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.5-8, 2005.
5. ANVISA, Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 06 de março de 2017.
6. APARNA, M.S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Braz.J. Infect.Dis**. v.12, p.526-30, 2008.
7. AZAMBUJA,W. O que são óleos essenciais?. 2005. Disponível em: <http://www.oleosessenciais.org/o-que-sao-oleos-essenciais/>. Acesso em: 15de novembro de 2017.

8. BERENDONK, T.U. et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nat Rev Microbiol**. v.13, p.310-17, 2005.

9. BIRON, C, A.; CASADEVALL, A. On immunologists and microbiologists: ground zero in the battle for interdisciplinary knowledge. **M.Bio**. v.1, p.1-4,2010.

10. BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna**. 15. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 2002.

11. BRIELMAN, H. L. et al. **Natural products from Plants**. 2. ed. Boca Raton: CRC,2006.

12. BROWN, A, J.; ODDS, F.C.; GOW, N.A. Infection-related gene expression in Candida albicans. **Curr Opin Microbiol**. V.10, p.307-313, 2007.

13. BUDZYÑSKA, A. et al. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their Major Components. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, p.35- 41, 2011.

14. CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p.171-176, 2009.

15. CERPA, M. G. et al. Modelling steam distillation of essential oils: aplication to lavandin super oil. **AIChE Journal**, v.54, p.909-917, 2008.

16. CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; OMAR, M. Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. **Food Chem**. v.104, p.1586- 1593, 2007.

17. CHAN, E.W.C. et al. Antioxidant and Antibacterial Properties of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Etlingera elatior* (Zingiberaceae). **Pharmacognosy Journal**. v.3, p. 54-61, 2011.

18. CHAVEZ, M.G.C. Hidrodestilation de aceites esenciales: modelado y caracterizacion. Tese de Doutorado.Universidade de Valladolid, Valladolid, 2007.

19. Cheikh-Ali,Z. et al. Composition, and Antimicrobial and Remarkable Antiprotozoal Activities of the Essential Oil of Rhizomes of Aframomum sceptrum K. Schum. (Zingiberaceae). **Chem. Biodivers**. V.8, p.658-667, 2011.
20. CHMIELESWSKI, R.A.N.; FRANK J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.22-30, 2003.
21. CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration e Biodegradation**. v.51, p.277-282, 2003.
22. DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical species of hospitalised patients. **Mycoses**, v.48: 321-326, 2005.
23. DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Int Med J**. v. 35, p. 79-96, 2005.
24. DONADIO, S. et al. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. **J. Antibiot**. v.63**,** p.423-430, 2010.
25. FRENCH, G.L.; PHILLIPS, I. Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. In: Mayhall CG. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996.
26. GOMEZ, L.C. et al. Infecciones por *Pseudomonas* spp. **Medicine**, v.7, p. 3629-3633, 1998.
27. GYLES, C.L. et al. Pseudomonas. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition.Ames: Wiley-Blackwell, 2010.
28. HABSAH, M. et al. Antitumor promotingand cytotoxic constituents of *Etlinger aelatior*. **Malaysian JMed Sci**. v.12, p.6-12, 2005.
29. HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v.3, p. 55-65, 2011.

30. HOLLENBACH, E. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. **Mycoses**, v.51, p.25-45, 2008.

31. HOSSAIN, H. et al. Clonal identity of Candida albicans in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol and Immunol**.v.18, p. 302-308, 2003.

32. Hsueh, P.R. et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans* , and *Aspergillus* Species from Taiwan: Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan Program Data from 2003. **Antimicrob. Agents Chemother***.* v. 49, p.512 -517, 2005.

33. IBRAHIM, H.; KHALID, N.; HUSSIN, K. Cultivated gingers of Peninsular Malaysia: utilization, profiles and micropropagation. **Gard Bull Sing**. v.59:71-88, 2007.

34. IWATSUKI, K. *et al*. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **J Dermatol Sci**. v. 42, p. 203-14, 2006.

35. JAAFAR, F.M. et al. Analysis of essential oils of leaves, stems, flowers and rhizomes of *Etlingera elatior* (Jack) RM Smith. **Malaysian J Anal Sci**. v.11, p.269-273, 2007.

36. JAYATILAKE, J.A.M.S.; SAMARANAYAKE, L.P. 2010. Experimental superficial candidiasis on tissue models. **Mycoses**, v.53, p.285-295, 2010.

37. KABARA, J.J. et al. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agentes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.2, p.23-28, 1972.

38. KON, K.V.; RAI, M.K. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bactéria. **Expert Rev. Anti Infect. Ther**. v.10, p.775-790, 2012.

39. KONEMAN, E. *et al*. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

40. KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; WILLIAMS, K. J. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1682-1696.

41. KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Antibacterial activity of long - chain alcohols against *Streptococcus mutans*. **J. Agrlc. Food Chem**. v.41, p.2447-2450, 1993.

42. LEAL, T.C.A.B. et al. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Revista Ceres**, v.48, p.445-453, 2001.

43. LI, X.Z.; BARRE, N.; POOLE, K. Influence of the MexA-MexBoprM multidrug efflux system on expression of the MexCMexD- oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother**.v.46, p.885-93, 2000.

44. LOGES, V. et al. Potencial de mercado de bastão-do-imperador e sorvetão. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.14, p.15-22 ,2008.

45. LOGES, V. et al. Floriculture research in Pernambuco-Brazil. **Acta Horticulturae**, v.683, p.345–350, 2005.

46. LOWY, F.D. Is *Staphylococcus aureus* an intracelular pathogen. **Trends Microbiol**. v. 8, p. 341-344, 1998.

47. LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, p.1051-1060, 2000.

48. MAAS-VAN, K.H.; MAAS, P.J.M. Zingiberaceae: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica de São Paulo**, v. 3, p.349-351, 2003.

49. MATASYOH, J.C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v.113, p.526-529, 2009.
50. MENDEZ, A. Variedades de Etlingera elatior o bastón del emperador, jengibre antorcha, torch ginger,ginger flower, 2000. Disponível em: < http://verdyflores.blogspot.com.br/2014/04/variedades-de-etlingera-elatior-o.html>. Acesso em: 05 de março de 2017.
51. MICHAEL, C.A.; DOMINEY-HOWES. D.; LABBATE, M. The antibiotic resistance crisis: causes, consequences, and management. **Front Public Health**, v.2 p.140-145, 2014.
52. MYLES, D. C.; Novel biologically active natural and unnatural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.627-633, 2003.
53. NIKOLAEV, Y.A.; PlAKUNOV, V.K. Biofilm -“city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Mikrobiologiia**, v.76, p.149-163, 2007.
54. NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519-523, 2007.
55. OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon sp.* essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p.549-553, 2010.
56. PATRO, R. Bastão-do-imperador - Etlingera elatior, 2014. Disponível em: <https://www.jardineiro.net/plantas/bastao-do-imperador-etlingera-elatior.html>. Acesso em: 05 de março de 2017.
57. PAULUS, D. et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.31, p.203-209, 2013.

58. SANTOS, A.L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med***.* **Lab***.* v.43, p.413-423, 2007.

59. SANTOS, G.K.N. et al. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Ind. Crops Prod***.* v.40, p.254–260, 2012.

60. SARTOR, R.B. Modelagem, Simulação e Otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 99.f, 2009.

61. SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. *Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

62. SILVA, P.C.B. Caracterização química, atividade larvicida e deterrente de oviposição do óleo essencial da inflorescência do Bastão do Imperador (Etlingeraelatior) frente à Aedes aegypti. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 103.f, 2012.

63. SILVA, P.C.B. et al. Evaluation of the activity of the essential oil from an ornamental flower against aedes aegypti: Electrophysiology, molecular dynamics and behavioral assays. **PLoS ONE**, v.11, p.1-15, 2016.

64. SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e analise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 2038- 2052, 2012.

65. SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010.

66. Solomons, T.W. G., Fryhle, C.B. Química Orgânica (Vol. 2), 10.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

67. STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol**. v.56, p.187-209, 2002.

68. SUSANTI, D. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of Malaysian Etlingera elatior (Jack) RM Smith flowers. **J. Essent. Oil Bear. Plant**. v.16, 294-299, 2013.

69. TAVEIRA, F.S.N. et al. Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.69-75, 2003.

70. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

71. TRABULSI, L. R.; ALTHERTHU M, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2005.

72. TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin J Sci and Technol**. v.25, p. 807-815, 2003.

73. TRENTI, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis*planktonic and biofilm lifestyles. **J. Ethnopharmacology**. v.137, p.327-335, 2011.

74. TUSHAR. et al. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. **J. Ethnopharmacol**. v. 132, p.286-96, 2010.

75. UD-DAULA, A.F.M.S. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etlingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M.Sm. **Industrial Crops and Products**, v.84, p.189-198 ,2016.

76. VAN DEN DOOL, H.; DEC.KRATZ, A. Generalization of the retetion index system including linearlinear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11,p.463-471, 1963.

77. Vargas, K. et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of Candida albicans from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. **J Clin Microbiol**. v. 38, p.3595–3607, 2000.

78. VASALA, P.A. Ginger. In: Peter KV, Editor. *Handbook of Herbs and Spices*. 1.ed. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. and CRC, 2001.

79. VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-387, 2005.

80. WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **J Bacteriol**. v.182, p.2675-2679, 2000.

81. WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. **Clin Infect Dis**, v. 27, p. 245-51, 1998.

82. WHO, A crescente ameaça da resistência antimicrobiana, 2017. Disponível em: <http://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf>. Acesso em: 06 de março de 2017.

83. WHO, Antimicrobial resistance**.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acessado em: 11/12/2016.

84. WIJEKOON, M.M.J.O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil and solvent extracts of torch ginger inflorescence (*etlingera elatior* jack.). **International Journal of Food Properties**, v.16, p.1200–1210, 2013.