

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA
TESE DE DOUTORADO

BRUNO SOUZA DOS SANTOS

**ANÁLISE PROTEÔMICA E ULTRAESTRUTURAL DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA EM RESPOSTA AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syagrus
coronata* (MART.) BECC. (ARECACEAE)**

Recife

2018

BRUNO SOUZA DOS SANTOS

**ANÁLISE PROTEÔMICA E ULTRAESTRUTURAL DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA EM RESPOSTA AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syagrus
coronata* (MART.) BECC. (ARECACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dra. Patricia Maria Guedes Paiva

Co-orientadora: Prof. Dra. Marcia Vanusa da Silva

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

S237a Santos, Bruno Souza

Análise proteômica e ultraestrutural de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina em resposta ao óleo essencial de *Syagrus coronata* (Mart.) BECC. (Arecaceae) / Bruno Souza Santos. – Recife, 2018.

102 f. : il.

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Maria Guedes Paiva.

Coorientadora: Prof. Dra. Marcia Vanusa da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2018.

Inclui referências.

1. Estafilococos 2. Drogas – Resistências em micro-organismos I. Paiva, Patricia Maria Guedes (Orientadora). II. Silva, Marcia Vanusa da (Coorientadora). III. Título.

579.353

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 368

BRUNO SOUZA DOS SANTOS

**ANÁLISE PROTEÔMICA E ULTRAESTRUTURAL DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA EM RESPOSTA AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syagrus
coronata* (MART.) BECC. (ARECACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado em:09/05/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Patricia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Luís Claudio Nascimento da Silva
Centro Universitário de Maranhão - UNICEUMA

Prof. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Este trabalho é dedicado aos meus pais.
Pois não tiveram essa oportunidade

AGRADECIMENTOS

Foi um percurso longo e laborioso para concluir mais esta etapa, contudo foi de grande valia para meu crescimento pessoal e profissional, quem diria que o menino da mustardinha iria chegar até aqui...

A Deus que me encoraja e me guia para prosseguir a caminhada sem fraquejar mesmo frente a grandes obstáculos

A minha orientadora Prof. Dra. Patricia Maria Guedes Paiva, por aceitar esse desafio, pelo ensinamento, paciência, apoio e por sempre ter acreditado no nosso trabalho

A minha co-orientadora Prof. Dra. Marcia Vanusa, pela oportunidade e por todo aprendizado adquirido. Por sempre me tratar com muito respeito, confiança e carinho. Por ser, além de uma grande profissional, uma pessoa humana e amiga, muito querida para mim

Ao Prof. Luis Claudio Nascimento pelos ensinamentos, apoio e constante ajuda nos experimentos, por ter sido fundamental para a concretização deste trabalho

A Clóvis Macedo pela amizade e por compartilhar parte dos seus conhecimentos e disponibilidade de ajudar nos experimentos

Ao Prof. Thiago Henrique Napoleão por sempre estar disponível para ajudar nas dúvidas e correções dos trabalhos

Ao Prof. Alexandre Macedo pela ajuda nos experimentos de microscopia

Aos membros da banca examinadora pela presença e colaboração

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial, Livia, Mariana, Hortência, Priscila, Sivonoide, Amanda, José Adelson Junior, Túlio, Clarissa,

A todos do Laboratório de Produtos Naturais, em especial, Ana Santana, Cibebe, Paula flor, Bruna, Bruno, Robson, Seu João

A coleção de microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, em especial a Prof. Dra. Magali, Prof. Dra. Glaucia, Marcela pela disponibilidade e concessão das linhagens bacterianas

A Prof. Dra. Glicia Calazans por compartilhar seus conhecimentos e dicas sempre com palavras motivadoras

A Universidade Federal de Pernambuco por toda minha formação repleta de excelentes momentos de aprendizagem e realizações

A FACEPE pela concessão da bolsa, CNPq e CAPES pelo financiamento de projetos que apoiaram a realização deste trabalho

A Fabricio Pereira por estar sempre ao meu lado, aguentando minhas angustias, choro, mas sempre compartilhando meus objetivos, e incentivando-me a prosseguir e ir sempre um pouco mais além

A todos que de certa forma contribuíram para a finalização deste trabalho

À imprevisibilidade da vida, que por meio de várias escolhas e oportunidades, permitiu esse momento

“O que fazer para ser grande: ser estudioso, ser correto, ser virtuoso”
Monteiro Lobato

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente a metilicina (MRSA) é atualmente um problema de saúde pública por ser capaz de provocar infecções de pele e tecidos moles, pneumonia, endocardite e sepse. A bactéria é altamente patogênica ao homem por produzir fatores de virulência e ser resistente a antibióticos utilizados na clínica. Produtos naturais tem sido alvos de pesquisas na busca por agentes com atividade antibacteriana sobre *S. aureus*. Este estudo determinou a ação antibacteriana do óleo essencial de *Syagrus coronata* (SCEO) sobre *S. aureus* e investigou a expressão de proteínas na bactéria tratada com o óleo. A análise dos constituintes revelou que SCEO contém 11 compostos sendo os ácidos octanóico, dodecanóico e decanóico e o γ -eudesmol os majoritários. SCEO apresentou atividade antibacteriana sobre 20 linhagens de *S. aureus* com concentração inibitória mínima variando de 156 $\mu\text{g/mL}$ a 625 $\mu\text{g/mL}$ e concentração bactericida mínima de 312 $\mu\text{g/mL}$ a 1250 $\mu\text{g/mL}$. SCEO também reduziu a viabilidade celular do biofilme pré-formado de *S. aureus*. Análise do biofilme de *S. aureus* por microscopia eletrônica de varredura revelou que SCEO alterou a estrutura do mesmo com diminuição significativa no número de células e aumento da matriz extracelular. Estudo *in vivo* usando *Galleria mellonella* revelou que SCEO nas concentrações de 15,6 mg/kg e 31,2 mg/kg não alterou a taxa de sobrevivência e o desenvolvimento larval ocorreu de maneira similar ao observado para as larvas não tratadas. A inoculação de *S. aureus* promoveu 100% de mortalidade das larvas de *G. mellonella* em 3 dias e o tratamento com SCEO com única dose de 31,2 mg/kg resultou em sobrevivência de 60% após 4 dias de infecção. O estudo também demonstrou que a contaminação bacteriana na hemolinfa de *G. mellonella* não tratadas foi de 6 Log CFU/mL, 8 Log CFU/mL e 9 Log CFU/mL em 1, 2 e 3 dias após a infecção, respectivamente e o que SCEO na concentração de 31,2 mg/kg reduziu a carga bacteriana para 4 Log CFU/mL, 5 Log CFU/mL e 5 Log CFU/mL em 1, 2 e 3 dias após a infecção, respectivamente. A análise do proteoma de *S. aureus* tratado com SCEO revelou diversas proteínas diferencialmente expressas. Em conclusão, SCEO é um agente antibacteriano sobre linhagens de *S. aureus* e a ação *in vivo* revelou que SCEO é um potencial candidato ao desenvolvimento de medicamentos para tratamento antibacteriano, inclusive envolvendo o biofilme de *S. aureus*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Produtos naturais. Antimicrobiano. *Syagrus*.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is currently a public health problem because it is capable of causing skin and soft tissue infections, pneumonia, endocarditis, and sepsis. The bacterium is highly pathogenic to man by producing virulence factors and being resistant to antibiotics used in the clinic. Natural products have been the targets of research in the search for agents with antibacterial activity on *S. aureus*. This study determined the antibacterial action of the essential oil of *Syagrus coronata* (SCEO) on *S. aureus* and investigated the expression of proteins in the bacteria treated with the oil. The analysis of the constituents revealed that SCEO contains 11 compounds being the octanoic, dodecanoic and decanoic acids and the γ -eudesmol the majorities. SCEO presented antibacterial activity on 20 strains of *S. aureus* with minimal inhibitory concentration varying from 156 $\mu\text{g/mL}$ to 625 $\mu\text{g/mL}$ and a minimum bactericidal concentration of 312 $\mu\text{g/mL}$ to 1250 $\mu\text{g/mL}$. SCEO also reduced the cellular viability of the preformed *S. aureus* biofilm. Analysis of the *S. aureus* biofilm by scanning electron microscopy revealed that SCEO altered the structure of the same with significant decrease in the number of cells and increase of the extracellular matrix. *In vivo* study using *Galleria mellonella* revealed that SCEO at concentrations of 15.6 mg/kg and 31.2 mg/kg did not change the survival rate and larval development occurred in a manner similar to that observed for untreated larvae. *S. aureus* inoculation promoted 100% mortality of *G. mellonella* larvae in 3 days and SCEO treatment with a single dose of 31.2 mg/kg resulted in 60% survival after 4 days of infection. The study also showed that the bacterial contamination in untreated *G. mellonella* hemolymph was 6 Log CFU/mL, 8 Log CFU/mL and 9 Log CFU/mL at 1, 2 and 3 days post-infection, respectively. SCEO at the concentration of 31.2 mg/kg reduced the bacterial load to 4 Log CFU/mL, 5 Log CFU/mL and 5 Log CFU/mL at 1, 2 and 3 days post infection, respectively. Analysis of the SCEO -treated *S. aureus* proteome revealed several differentially expressed proteins. In conclusion, SCEO is an antibacterial agent on *S. aureus* strains and *in vivo* action has shown that SCEO is a potential candidate for the development of antibacterial treatment drugs, including *S. aureus* biofilm.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Natural products. Antimicrobial. *Syagrus*

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Ciclo de formação de biofilme.....25

ARTIGO 1 - APPLICATION OF OMICS TECHNOLOGIES FOR EVALUATION OF ANTIBACTERIAL MECHANISMS OF ACTION OF PLANT-DERIVED PRODUCT

Figure 1. Overview of applications of “omics technologies” to evaluate the mechanisms of action of natural antimicrobials (NAM).....40

ARTIGO 2 - ANTI-STAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF *Syagrus coronata* ESSENTIAL OIL: BIOFILM ERADICATION AND IN VIVO ACTION ON *Galleria mellonella* INFECTION MODEL

Figure 1 - Effect of the *Syagrus coronata* essential oil (SCEO) on biomass and cell viability in *S. aureus* UFPEDA-02 biofilm.....74

Figure 2 – SEM images of biofilms formed by *S. aureus* UFPEDA-02.....75

Figure 3 - Effects of SCEO on *Galleria mellonella* larvae infected with *S. aureus* UFPEDA-02.....76

ARTIGO 3 - CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DE *Staphylococcus aureus* TRATADO COM ÓLEO VOLÁTIL DE *Syagrus coronata*

Figura 1 – Curva de crescimento celular de MRSA e MSSA tratados e não tratados.....85

Figura 2 – Padrão de eletroforese bidimensional das proteínas de MSSA tratado e não tratado(A e B) e MRSA tratado e não tratado(C e D).....86

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - APPLICATION OF OMICS TECHNOLOGIES FOR EVALUATION OF ANTIBACTERIAL MECHANISMS OF ACTION OF PLANT-DERIVED PRODUCT

Table 1 - Plant-derived products with mechanisms of action evaluated by “omics technologies”	41
--	----

ARTIGO 2 - ANTI-STAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF *Syagrus coronata* ESSENTIAL OIL: BIOFILM ERADICATION AND IN VIVO ACTION ON *Galleria mellonella* INFECTION MODEL

Table 1 - Identification of constituents of the essential oil of <i>Syagrus coronata</i>	77
Table 2 - Isolation source, phenotypic evaluation and biofilm formation ability of <i>S. aureus</i> isolates used in this study.....	78
Table 3 - Antibiotic resistance profile of <i>S. aureus</i> isolates and antibacterial activity of <i>Syagrus coronata</i> essential oil (SCEO)	79

ARTIGO 3 - CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DE *Staphylococcus aureus* TRATADO COM ÓLEO VOLÁTIL DE *Syagrus coronata*

Tabela 1 - Lista de proteínas diferencialmente expressas identificadas por MALDI-TOF.....	88
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (do inglês, methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
SCEO	Óleo essencial de <i>Syagrus coronata</i>
CFU	Unidade formadora de colônia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> adquirido na comunidade
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> adquirido em hospital
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec) - cassete estafilocócico de resistência que contém o gene mec
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
FDA	Food Drug Administration
EPS	Substância polimérica extracelular
CWA	Conjunto de proteínas ancoradas na parede celular bacteriana
MALDI-TOF	Técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo. (do inglês, <i>Matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>)
2-DE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
iTRAQ	Marcador isobárico para quantificação absoluta e relativa de proteínas (do inglês, <i>isobaric tags for relative and absolute quantification</i>)
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.1.1	Aspectos gerais.....	17
2.1.2	Resistência a antimicrobianos.....	19
2.1.3	Biofilme bacteriano.....	24
2.2	PLANTAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	27
2.2.1	Óleos essenciais.....	28
2.3	<i>Syagrus coronata</i>	30
2.4	PROTEÔMICA.....	32
3	ARTIGO 1 – APPLICATION OF OMICS TECHNOLOGIES FOR EVALUATION OF ANTIBACTERIAL MECHANISMS OF ACTION OF PLANT-DERIVED PRODUCT.....	37
4	ARTIGO 2 - ANTI-STAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF <i>Syagrus coronata</i> ESSENTIAL OIL: BIOFILM ERADICATION AND IN VIVO ACTION ON <i>Galleria mellonella</i> INFECTION MODEL.....	50
5	ARTIGO 3 - CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DE <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> TRATADO COM ÓLEO VOLÁTIL DE <i>Syagrus coronata</i>.....	81
6	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A resistência de microrganismos aos antibióticos é um problema crescente em saúde pública, sendo considerado como um fenômeno emergente mundial, que levou ao aumento do desenvolvimento de infecções adquiridas no ambiente hospitalar e comunitário por patógenos multirresistentes. Dentre esses, destaca-se o *Staphylococcus aureus* pela sua prevalência na etiologia de infecções e alta versatilidade em tornar-se resistente a antibioticoterapia (ALMEIDA et al., 2007; CHEW et al., 2018).

Trata-se de uma bactéria que coloniza o ser humano e está presente no trato respiratório, em particular na cavidade nasal, em cerca de 60% da população em geral, onde permanece sem causar doenças em condições normais, podendo tornar-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade (GELLATI et al., 2009).

Este microrganismo é um agente que pode produzir uma gama de infecções, desde cutâneas superficiais a infecções de partes moles e osteoarticulares, como abscessos profundos, celulites, infecção de feridas cirúrgicas e osteomielites, das quais é o agente mais frequentemente isolado, podendo alcançar situações de gravidade extrema, com risco de morte. É também agente de sepses, pneumonias, endocardites e infecções do sistema nervoso central. Algumas cepas causam doenças mediadas por toxinas, como infecções alimentares, síndrome do choque tóxico e síndrome escarlatiniforme (MONECKE et al., 2011).

Na década de 1940, iniciou-se o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* com penicilina com excelente eficácia terapêutica, porém apenas um ano após a implementação deste antibiótico foram identificadas linhagens resistentes a penicilina. A introdução de meticilina, uma penicilina semissintética, em 1960, marcou um grande avanço no tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à penicilina, no entanto, a primeira linhagem de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi descrita, em 1961, apenas alguns meses depois do início da utilização clínica do antibiótico (HARKINS et al., 2017).

Como descrito acima, *S. aureus* desenvolveu mecanismos de resistência em um curto período de tempo, a taxa de resistência não acompanhou a criação ou descoberta de novos antibióticos, o que torna importante avaliar alternativas terapêuticas derivadas de várias fontes. Nesse cenário, as plantas representam uma fonte rica em moléculas com atividade antibacteriana e modificadoras da resistência antibiótica, algumas já descritas na literatura e muitas outras ainda desconhecidas e pouco exploradas, é estimado que apenas de 15 a 17% do total de espécies de vegetais superiores conhecidas foram estudadas quanto a sua utilização

medicinal (BARROS, 2008). A falha dos antibióticos existentes no tratamento de infecções causados por microorganismos multi-droga resistentes tem impulsionado a busca por novos compostos e tratamentos alternativos, em especial, os produtos derivados de plantas como os óleos essenciais, produtos odoríferos e voláteis do metabolismo secundário de plantas, que têm sido amplamente aplicados na medicina popular como agentes antimicrobianos (ADUKWU et al, 2016).

A Caatinga, região de grande biodiversidade localizada no Nordeste do Brasil, configura-se como um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do mundo (MAIA, 2004). Diante desse enorme potencial botânico e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de microrganismos, é importante realizar estudos que viabilize um maior conhecimento de espécies endêmicas da região como a *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.

Desta forma, este trabalho se propõe a investigar a ação do óleo essencial de *S. coronata* sobre MRSA por abordagem proteômica e microscopia eletrônica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar as alterações da morfologia celular e da expressão protéica em *Staphylococcus aureus* resistente a metilina induzidas pela presença de concentrações sub-letais do óleo essencial e suas frações de *Syagrus coronata* (Mart.) Becc a fim de compreender seus mecanismos de ação antimicrobiana

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair óleos essenciais das sementes de *S. coronata*, através da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger;
- Quantificar e identificar os compostos químicos dos óleos essenciais extraídos das sementes de *S. coronata*, usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS);
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*, com isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, dos óleos essenciais de *S. coronata*, através da técnica de microdiluição seriada em caldo;
- Extrair e quantificar proteínas de MRSA tratado com óleo essencial de *Syagrus coronata*

- Realizar análise comparativa do padrão de expressão diferencial de proteínas de MRSA e caracterizar as proteínas isoladas por seqüenciamento de aminoácidos

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Aspectos gerais

S. aureus são cocos Gram-positivos, não móveis, não esporulados, anaeróbios facultativos e membro da família Staphylococcaceae, da ordem Bacillales e da classe Bacilli. Mais de 30 espécies de *Staphylococcus* são patogênicas, e *S. aureus* é a mais virulenta entre elas. Sua célula mede de 0,5 a 1,5 μm e é naturalmente disposta em cachos ou cachos de uvas (LOWY, 2011). A maioria das linhagens de *S. aureus* são capsuladas e são mais virulentas do que a forma acapsular, devido a capacidade do polissacarídeo capsular de facilitar a adesão da bactéria às células hospedeiras e por aumentar sua resistência à depuração realizada pelas defesas imunológicas inatas do hospedeiro e por inibição da fagocitose (PARK, GERBER E LEE, 2014, THAKKER et al., 1998).

S. aureus forma colônias lisas, médias a grandes, e amarelas em sua maioria. Em meio ágar sangue, as colônias são maiores do que aquelas em ágar nutriente e a maioria das cepas são beta-hemolíticas (TILLE, 2015). Além disso, *S. aureus* pode crescer em agar MacConkey, agar sal manitol e meio com altas concentrações de sal (TILLE, 2015). *S. aureus* é capaz de uma sobrevivência prolongada em superfícies ambientais em condições variadas, ampla gama de temperatura (7 a 48°C) e pH (4 a 10), entretanto, sua temperatura ideal de crescimento é de 35 a 37°C e o pH ideal é de 7 a 7,5 (LOWY, 2011).

As células bacterianas são destruídas pelo calor, mas a toxina produzida por elas é extremamente resistente ao calor, pode suportar temperatura de 60°C em 30 minutos, que pode resultar em intoxicação alimentar e síndrome de choque tóxico (STEWART, 2003).

As propriedades bioquímicas de *S. aureus* são caracterizadas pela fermentação de vários açúcares como glicose, sacarose, lactose, maltose e manitol. Além disso, ele pode hidrolisar a úreia, reduzir os nitratos a nitritos, liquefazer a gelatina e produzir DNases. É positivo para catalase, proteína A, mas negativo para oxidase, e esta é uma das características que podem ser utilizadas para diferenciar *Staphylococcus* e *Streptococcus*. A coagulase positiva é outra característica para diferenciar entre *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo, como *S. epidermidis* e *S. capitis* (LOWY, 2011; TILLE, 2013).

S. aureus causa uma ampla gama de doenças em diferentes partes do corpo devido à sua capacidade de colonizar e crescer em diversos tipos de tecidos hospedeiros. A mucosa nasal e a pele são os locais mais frequentes que *S. aureus* coloniza como um organismo comensal

inofensivo (TONG, 2015), mas também pode ser encontrado em vários locais do corpo, como as axilas, a vagina e o trato gastrointestinal (GOULD et al., 2012). Aproximadamente 20-25% da população humana são portadores desse microrganismo de longo prazo e 75-80% são portadores intermitentes ou não portadores de *S. aureus* (KLUYTMANS et al., 1997; FOSTER 2004; DALL'ANTONIA et al. 2005).

No entanto, a taxa é maior entre pacientes com diabetes insulino-dependente (Lipsky et al., 1987), pacientes infectados pelo HIV (Sissolak et al., 2002) e pacientes submetidos a hemodiálise (Kirmani et al., 1978) ou condições de danos na pele (Williams et al., 1998). As pequenas infecções cutâneas causadas por *S. aureus* incluem carbúnculos, furúnculos, impetigo, queimaduras, infecções no local cirúrgico e infecções de feridas em geral. As infecções mais graves como sinusite, amigdalite, osteomielite, pneumonite, endocardite, meningite e bacteremia ocorrem quando *S. aureus* entra no corpo através de um corte ou ferida de abertura (Mandal et al., 2002). Além disso, ao liberar as toxinas no alimento ou na corrente sanguínea, *S. aureus* também pode causar intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (Chi et al., 2006, Hennekinne et al., 2012).

Os dados clínicos indicaram que *S. aureus* é a principal causa de infecções do trato respiratório inferior e infecções do local cirúrgico (Richards et al., 1999) e a segunda principal causa de bacteremia nosocomial (Wisplinghoff et al., 2004), pneumonia e infecções cardiovasculares (Richards et al., 1999). É também a principal causa de artrite séptica primária e osteomielite em todas as idades, exceto os recém-nascidos (Lew e Waldvogel, 1997). No entanto, em um estudo global que abrange 100 hospitais no Canadá, EUA, América Latina, Europa e Pacífico Ocidental, *S. aureus* foi demonstrado como a causa mais prevalente de infecção hospitalar nosocomial, infecções de pele e tecido mole e pneumonia (Diekema et al., 2001).

As infecções por *S. aureus* geralmente são desenvolvidas em humanos por auto-infecção - indivíduos infectados com suas próprias linhagens de colonização (Sangvik et al., 2011). No entanto, os indivíduos podem adquirir *S. aureus* de outros indivíduos infectados através de transmissão direta da pele para a pele e secreções nasais ou de exposições ambientais, como condições úmidas, locais públicos e falta de higiene (Williams, 1963). A propagação de infecções por *S. aureus* na comunidade que envolve os clones de CA-MRSA (MRSA adquirido na comunidade), enquanto que os clones de HA-MRSA (MRSA associado ao hospital) dominam os estabelecimentos de saúde e representam um enorme custo financeiro e uma ameaça de infecção grave para pacientes e comunidade (Klein et al., 2007).

A contaminação de *S. aureus* no ambiente em hospitais (como ventiladores e bordas de cama em unidade de terapia intensiva) é conhecida como o principal reservatório para transmissão de cruzamento entre pacientes, dispositivos médicos e pessoal de saúde (Cohen, 2007). O controle das infecções por HA-MRSA é bem administrado em profissionais de saúde que são potenciais portadores de HA-MRSA. No entanto, os pacientes, em particular se imunocomprometidos, têm maior risco de infecção (30-60%) e permanece quase impossível limpar ou controlar a bactéria invasora (Cohen, 2007).

Em um estudo nos EUA, as taxas de mortalidade por infecções por HA-MRSA e CA-MRSA foram semelhantes, mas as hospitalizações associadas a *S. aureus* resultaram em aproximadamente o dobro do tempo de permanência e os custos médicos por paciente (Rubin et al., 1999). A infecção por HA-MRSA é globalmente alarmante porque vários clones de HA-MRSA se espalharam pelo mundo e causaram a alta taxa de morbidade e mortalidade. De fato, um estudo de 2007 em EUA estimou que o número de óbitos devido a infecções por HA-MRSA em 2005 foi de 17.000, o que superou aqueles de AIDS (Klein et al., 2007). O custo do tratamento de pacientes com MRSA é estimado entre US \$ 4 bilhões a US\$ 30 bilhões por ano para a economia dos EUA (Lodise e McKinnon, 2007). Um estudo canadense afirmou que o custo financeiro do MRSA no Canadá variou de US\$ 40 a US \$ 59 milhões em 2000 (Goetghebeur et al., 2007).

Embora o HA-MRSA seja uma preocupação óbvia recentemente, as infecções por CA-MRSA foram relatadas com aumento da prevalência (Klevens et al., 2006; Maree et al., 2007). Um estudo realizado em departamentos de emergência em 11 cidades nos EUA descobriu que 78% dos isolados eram MRSA, e entre estes, 98% eram a cepa CA MRSA USA300, uma das cepas mais comuns de MRSA (Moran et al., 2006).

S. aureus também é conhecido por colonizar e infectar animais de estimação e gado (Morgan, 2008). A infecção por *S. aureus* em seres humanos é sempre uma preocupação importante, mas os animais infectados com *S. aureus* (especialmente MRSA) podem ser os reservatórios importantes para a colonização humana, levando a uma pandemia potencial (Weese, 2010).

2.1.2 Resistência a antimicrobianos

A resistência bacteriana a antimicrobianos tem um enorme impacto negativo em diversos setores da sociedade, levam ao aumento das taxas de mortalidade, de morbidade e

dos custos com tratamentos. Neste cenário, a má utilização dos antibióticos, seja de forma excessiva ou incorreta, na medicina humana, veterinária e na agricultura tem contribuído para o surgimento global de bactérias patogênicas de alta resistência (PASTOR-SÁNCHEZ, R., 2006; RODRÍGUEZ- ROJAS et al., 2013).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ocorrer de formas diversas, incluindo a alteração do seu sítio de ação, alterações na permeabilidade celular e de efluxo e transferência horizontal de genes de resistência (RODRÍGUEZ- ROJAS, et al., 2013). Além da resistência inata que algumas bactérias possuem a determinados antimicrobianos, observa-se que a resistência bacteriana também pode ser transferida por mecanismos diversos, como resistência por mutações ou aquisição de genes de resistência por conjugação, transdução, transformação ou uma combinação desses mecanismos (GIEDRAITIENĖ et al. 2011).

Os mecanismos de transferência podem estabelecer-se entre micro-organismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (LUCENA et al., 2015). As bactérias resistentes a 3 ou mais classes de fármacos antimicrobianos são definidas como bactérias multirresistentes (MDR) (TENOVER, 2006).

Na era pré-penicilina, a mortalidade de pacientes com bacteremia causada por *S. aureus* excedia os 80% (AHMAD et al., 2018). A introdução da penicilina, em 1941, na prática clínica melhorou drasticamente o prognóstico de pacientes infectados com este patógeno (AHMAD et al., 2018). No entanto, um ano depois, em 1942, os primeiros estafilococos resistentes à penicilina foram reportados, primeiramente no ambiente hospital e posteriormente na comunidade (AHMAD et al., 2018). No final da década de 1960, mais de 80% dos isolados de estafilococos eram resistentes à penicilina devido a produção de β -lactamase, codificada por plasmídeo adquirido, capaz de hidrolisar e destruir a molécula de penicilina antes de atingir o alvo intracelular (LOWY, 2003).

Meticilina, inicialmente nomeada de celbenin, foi a primeira penicilina semi-sintética estável a β -lactamase que foi introduzida na prática clínica em 1960. Entretanto, em 1961, os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes a metilina foram reportados na Inglaterra e chamados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) (LOWY, 2003). Essa resistência se deve ao gene *mecA*, que codifica a proteína de ligação a penicilina 2a(PBP2a), uma proteína bifuncional transglicolilase-transpeptidase que participa da síntese do peptidoglicano com baixa afinidade a antimicrobianos β -lactâmicos (WALSH et al, 2016).

O gene *mecA* está localizado no elemento genético móvel localizado dentro do genoma cromossômico do *Staphylococcus* denominado SCCmec (Staphylococcal Cassette

Chromosome mec) (ROLO et al., 2017). O SCCmec tem sido descrito como uma "ilha de resistência" devido à tendência de acumulação de múltiplos genes de resistência antimicrobiana e em alguns casos genes de virulência nessa região (ROLO et al., 2017; SHORE E COLEMAN, 2013). O SCCmec também pode conter um ou mais genes de recombinase (*ccr*) que codificam enzimas responsáveis pela integração e excisão específica de sítios do próprio elemento SCCmec, conduzindo a diferentes tipos de SCCmec (ROLO et al., 2017; SHORE E COLEMAN, 2013).

Em adição a resistência a metilina, MRSA pode também ser resistente a diferentes classes de agentes antimicrobianos, incluindo e mais comumente, fluoroquinolonas, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, tetraciclina e aminoglicosídeos (FOSTER, 2017). Resistência a glicopeptídeos, oxazolidinonas, lipoglicopeptídeos e gliciliclinas também tem sido reportadas (FOSTER, 2017).

Um dos fenótipos de resistência mais comuns encontrados em *S. aureus* é a resistência a fluoroquinolonas, particularmente entre linhagens associadas aos hospitais (PANTOSTI et al., 2007). Fluoroquinolonas atuam interferindo com topoisomerasas, classe de enzimas responsáveis pelo desenrolamento do DNA, afetando a sua replicação (FOSTER, 2017). As mutações pontuais na região determinante da resistência à quinolona (QRDR) da topoisomerase IV e da DNA girase levam à resistência à fluoroquinolona em *S. aureus* (HOOPER e JACOBY, 2015). Em geral, a substituição de um único aminoácido pode elevar o MIC das fluoroquinolonas em 8 a 16 vezes (ANDERSSON E HUGHES, 2014). Além disso, as concentrações subinibitórias de quinolonas induzem a resposta SOS e elevam a taxa de mutação (NAGEL et al., 2011).

Os isolados clínicos que são altamente resistentes às fluoroquinolonas muitas vezes superexpressam as bombas de efluxo codificadas cromossomicamente por genes *norA*, *norB* ou *norC* (HOOPER E JACOBY, 2015). O gene *norA* realiza o efluxo de fluoroquinolonas com as moléculas hidrofílicas como norfloxacin e ciprofloxacina, enquanto *norB* e *norC* visam drogas hidrofóbicas, como sparfloxacina e moxifloxacina (FOSTER, 2017).

S. aureus também adquiriu resistência de largo espectro aos macrolídeos (por exemplo, eritromicina), lincosamida (por exemplo, clindamicina) e estreptogramina B - coletivamente denominados resistência a MLSB (LECLERCQ, 2002). A metilação do sítio alvo do antimicrobiano no ribossomo leva a esta ampla resistência cruzada e é conferida por uma série de genes *erm* (eritromicina ribossomo metilase) (FEßLER, 2018).

O *ermA* ligado ao transposon é frequente entre as linhagens de MRSA enquanto o *ermC* ligado ao plasmídeo está mais intimamente associado às linhagens de MSSA (LECLERCQ, 2002). Um novo plasmídeo multi-resistência que transporta *ermT* foi relatado em MRSA ST398 de origem suína (GÓMEZ-SANZ et al., 2013). A resistência aos antimicrobianos de macrolídeos e estreptogramina B também pode ser adquirida via plasmidial por uma bomba de efluxo codificada pelo gene *msrA*, que tem sido detectado em linhagens de MRSA USA300 associados a comunidade (GLASER, 2016). Além disso, a aquisição de *lnuA* confere resistência a apenas lincosamidas, embora este mecanismo seja incomum em *S. aureus* (LECLERCQ 2002).

Outra classe de antimicrobianos a que *S. aureus* adquiriu ampla resistência são as tetraciclina. Os antimicrobianos de tetraciclina inibem a síntese de proteínas em bactérias por ligação à subunidade ribossômica 30S durante a tradução bloqueando assim o tRNA (NGUYEN et al.,2014). Um complexo entre tetraciclina e Mg^{2+} forma ligações com seis resíduos diferentes no 16S rRNA e a ligação estável de aa-tRNA é interrompida e dissociada (NGUYEN et al.,2014).

A resistência às tetraciclina está presente em algumas linhagens de *S. aureus* e é particularmente prevalente entre o MRSA associado ao gado, que provavelmente é uma consequência do uso generalizado de tetraciclina na alimentação bovina (KREASUKON et al., 2012; STEGGER et al., 2013). A resistência às tetraciclina pode ocorrer através de dois mecanismos: proteção do ribossomo contra tetraciclina conferido pelos genes *tetO* e *tetM* adquiridos por via plasmidial ou efluxo ativo de tetraciclina conferido pelos genes *tetK* e *tetL* (associado cromossômico ou transposon) (PANTOSTI et al., 2007).

Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (por exemplo, gentamicina, amicacina, canamicina, neomicina e estreptomicina) são utilizados para tratar infecções estafilocócicas, uma vez que estes agentes exercem um efeito sinérgico quando utilizados em combinação com outros antimicrobianos tais como vancomicina e penicilina (CHANDRIKA E GARNEAU-TSODIKOVA,2018, SERIO, 2017). Os aminoglicosídeos agem alterando a síntese protéica durante a tradução e, embora diferentes aminoglicosídeos atuem em locais distintos, o resultado, em geral, é similar, uma proteína defeituosa ou truncada.

A resistência aos aminoglicosídeos geralmente resulta da aquisição via plasmidial de genes que codificam enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, no entanto, existem outros mecanismos que incluem a modificação do sitio alvo no ribossomo e alterações na permeabilidade celular (CHANDRIKA E GARNEAU-TSODIKOVA,2018). O uso

terapêutico dessa classe de antibiótico é limitado, devido a efeitos tóxicos (nefrotoxicidade e ototoxicidade), além da redução da eficácia clínica da terapia devido a resistência generalizada entre as linhagens de MRSA (HU et al., 2015, SERIO et al., 2017).

Um dos antimicrobianos mais importantes usados no tratamento das infecções por MRSA são os glicopeptídeos. Os glicopeptídeos se ligam à acil-D-alanil-D-alanina do peptidoglicano, bloqueando assim a síntese da parede celular. O tratamento das infecções estafilocócicas multirresistentes tinham uma alternativa terapêutica com eficácia com o uso dos antimicrobianos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) por mais de 40 anos (SAKOULAS E MOELLERING, 2008). No entanto, em 1997, o primeiro isolado clínico de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) foi relatado (HIRAMATSU et al., 1997). Posteriormente, foi identificado *S. aureus* altamente resistente à vancomicina (VRSA) nos Estados Unidos em 2002 (CDC, 2002).

As infecções causadas por VISA e VRSA são raras e apenas foram relatadas esporadicamente sem casos secundários (MOELLERING, 2012). Essas linhagens são ainda susceptíveis a vários agentes antimicrobianos (ceftarolina, daptomicina, linezolid, minociclina, trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina e tigeciclina) (SARAVOLATZ et al., 2012) e sua patogenicidade é atenuada à medida que a produção de fatores de virulência parece ser inibida pelos mecanismos responsáveis pela resistência à vancomicina (PELEG et al., 2009).

No entanto, um relatório alarmante de pesquisadores no Brasil mostra que a cepa mais comum de CA-MRSA (ST8/USA300) recentemente adquiriu resistência à vancomicina sem perda de patogenicidade (ROSSI et al., 2014). A resistência à vancomicina intermediária é conferida por uma parede celular engrossada, enquanto a resistência completa à vancomicina é conferida pelo operon *vanA* (PANTOSTI et al., 2007). WEIGEL et al. (2003) demonstram que a VRSA provavelmente adquiriu um plasmídeo que transporta o operon *vanA* de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) através da transferência horizontal de genes.

Apesar da alarmante resistência de MRSA a vários antimicrobianos, ainda existem várias alternativas antigas e novas que são eficazes no tratamento de infecções estafilocócicas, embora os efeitos colaterais tóxicos e o custo desses antimicrobianos alternativos sejam indesejáveis (RIVERA E BOUCHER, 2011). Alguns dos antimicrobianos eficazes utilizados para tratar infecções por MRSA multirresistentes incluem rifampicina, daptomicina, linezolid, tigeciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e quinupristina-dalfopristina (OKSUZ E GURLER, 2013).

Além disso, nos últimos anos a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a telavancina (lipoglicopeptídeo) em 2009 (GOLDBERG et al., 2010), ceftarolin (cefalosporina) e dalbavancin (lipoglicopeptídeo) para uso no tratamento de infecções por *S. aureus*., incluindo MRSA (RIVERA E BOUCHER, 2011). O tratamento de infecções por MRSA frequentemente emprega uma combinação sinérgica desses antimicrobianos, mas certas combinações podem reduzir a eficácia terapêutica (Moellering, 2012). Vários novos agentes anti-estafilocócicos também estão sendo explorados (Moellering, 2012), incluindo a tedizolid (um antimicrobiano oxazolidinona) que foi recentemente aprovado por um comitê consultivo da FDA para o tratamento de infecções por MRSA (IROLSTON et al., 2018). No entanto, mais pesquisas e desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas para infecções por MRSA são necessárias.

2.1.3 Biofilme bacteriano

Os biofilmes são caracterizados por múltiplas camadas heterogêneas de células únicas e micro-colônias sésseis, que estão envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (DONLAN E COSTERTON, 2002). Esta matriz é principalmente composta de polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) e proteínas, juntamente com materiais genéticos extracelulares (como DNA extracelular) (OTTO, 2008).

Essas camadas cobrem e se encaixam em um substrato ou interface persistentemente (DONLAN E COSTERTON, 2002) e, assim, estabelece um bloco recalcitrante para resistir a fatores destrutivos externos. Dentro dos biofilmes, existem quatro estados metabólicos distintos das células em crescimento, incluindo aeróbico (frequentemente localizados nas camadas externas expostas ao oxigênio e nutrientes), fermentativo, dormentes e mortos, nas quais as células dormentes são dominantes e se hospedam nas camadas anóxicas (Rani et al., 2007; SERRA E HENGGE, 2014).

As mudanças no tipo de célula devido à mudança fenotípica, a taxa de crescimento alterada, bem como a expressão de genes relacionados às vias metabólicas das células, estruturas de superfície e fatores de virulência foram bem documentadas e mostram a capacidade bacteriana de usar o biofilme favoravelmente a adaptação ao ambiente (ARCHER et al., 2011; MOORMEIER et al., 2013).

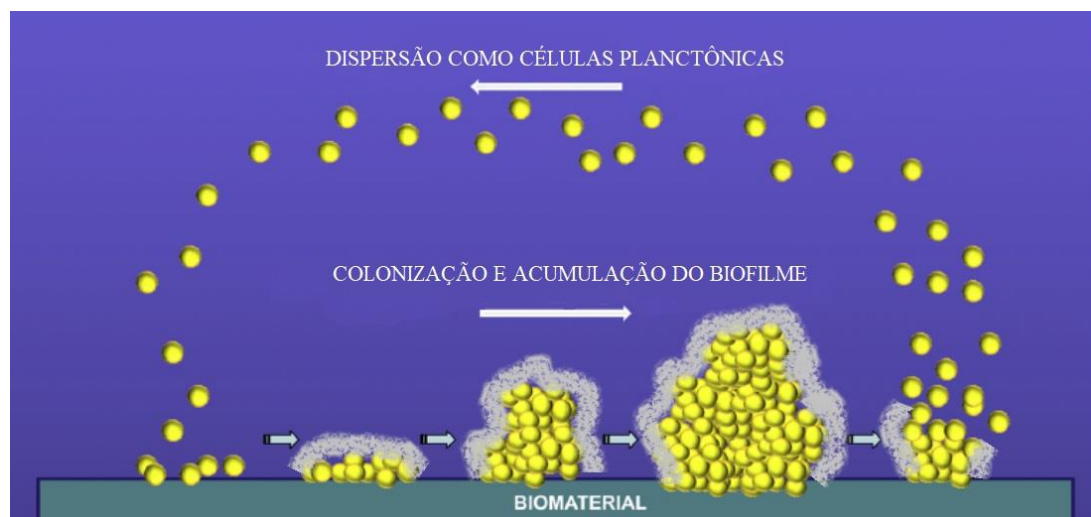


Figura 1 – Ciclo de formação de biofilme. Adaptado de ARCIOLA et al.,2012.

A formação de biofilme bacteriano (Figura 1) pode ser dividida esquematicamente em quatro fases nomeadas fixação, acumulação, maturação e dispersão (OTTO, 2008; YANG et al., 2011). Na primeira fase, as bactérias planctônicas ou livres dispersas no meio se aproximam da superfície sólida através de fluidos ou motilidade. Esse processo ainda é considerado reversível, pois depende de forças de interação de Van der Waals que influenciam o processo de adesão, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (STEWART et al., 2002; CHEW E YANG, 2017).

Em seguida, ocorre a transição da fase reversível para fase irreversível que acontece através da secreção de polímeros extracelulares ou produção de adesinas específicas (flagelos, fímbrias). Com isso, os microrganismos conseguem se imobilizar, formar uma monocamada e iniciar sua multiplicação, formando o estágio de acumulação (STEWART et al., 2002).

Alguns fatores de superfície incluindo uma variedade de proteínas ancoradas na parede celular - CWA (Bap – proteína associada a biofilme, fatores “clumping” A e B, entre outras), DNA extracelular (eDNA) e ácidos teicóicos são componentes cruciais para a adesão bacteriana de *S. aureus* (OTTO, 2008; YORK, 2017). Quando as células adjacentes interagem, a estrutura de algumas proteínas CWA (proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs) e SasG) podem ser modificadas para promover a agregação de células vizinhas (ARCHER et al. 2011; FOSTER et al., 2014).

Após o desenvolvimento inicial da estrutura e formação do biofilme, ocorre a formação de micro-colônias no biofilme maduro onde substâncias poliméricas possibilitam o acesso aos nutrientes. Nesta fase, o biofilme forma-se como uma estrutura descritas como “torres” ou “cogumelos” contendo sistemas de canais de água que possibilitam a entrada de nutrientes e

oxigênio e permitindo a excreção de metabólitos (STEWART et al., 2002). As bactérias que estão dentro da estrutura do biofilme se diferenciam metabolicamente, fisiologicamente e desenvolvem padrões de crescimento diferentes das bactérias planctônicas. eDNA liberado da lise celular é um componente predominante na maturação do biofilme de *S. aureus* (ARCHER et al., 2011). Como molécula polianiónica, eDNA desempenha um papel importante na formação da matriz devido à capacidade de unir outros componentes e facilitar a adesão do biofilme a superfície (MANN et al., 2009).

À medida que o biofilme é completamente desenvolvido, células únicas ou pequenos grupos de células podem se separar do biofilme maduro e realocar-se para outros ambientes distantes e reiniciar o ciclo de formação do biofilme novamente (OTTO, 2008). Biofilmes bacterianos foram descritos e pesquisados há décadas devido à sua crescente importância na patogênese (DAVIES E BILTON, 2009). Originalmente, os biofilmes são conhecidos por causar problemas industriais e agora estão implicados na disseminação de infecções relacionadas a dispositivos e crônicas (DONLAN E COSTERTON, 2002; OTTO, 2008).

Os biofilmes bacterianos podem ser isolados de amostras de mucosa ou tecido de fibrose cística, válvula cardíaca na endocardite, bem como em otite média, rinosinusite, amigdalite e dispositivos protéticos, como cateter venoso central, cateter urinário e muitas outras situações clínicas (DONLAN E COSTERTON, 2002; FEDERSPIEL et al. 2009; YANG et al., 2011). É facilmente observado que estes ambientes e dispositivos possuem superfícies rugosas ideais para a fixação e o crescimento do biofilme (SECOR et al., 2011). Em relação aos aspectos patológicos, a forma planctônica é frequentemente responsável por sintomas agudos e respostas sistêmicas, enquanto os biofilmes causam infecções crônicas, mas exacerbações agudas também podem acontecer devido à complexidade da resposta imunológica que podem provocar (DONLAN E COSTERTON, 2002; ARCHER et al., 2011).

Várias bactérias patogênicas como *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *S. aureus* são capazes de formação de biofilmes clinicamente relevantes (DONLAN E COSTERTON, 2002). Há uma alta prevalência de infecções mediadas por biofilme, estima-se que 50-70% das infecções relacionadas ao cateter, 40-50% de infecções protéticas da válvula cardíaca e 20-50% das infecções de reposição articular são causadas por biofilmes de estafilococos, sendo *S. aureus* o principal agente patogênico (KIM et al., 2018). Kwon et al. (2008) testou a relação entre a multiresistência a antibióticos e a formação de biofilme e revelou uma taxa significativamente maior de desenvolvimento de biofilme em linhagens com maior resistência múltipla em comparação com linhagens com menos multi-resistência,

sugerindo que os isolados clínicos multiresistentes de *S. aureus* têm maior probabilidade de desenvolver biofilmes em dispositivos médicos.

2.2 PLANTAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os sistemas tradicionais de medicina popular contam com as plantas medicinais para o tratamento de infecções humanas há muitos séculos. Aproximadamente 80% dos países em desenvolvimento dependem de medicamentos tradicionais derivados de plantas medicinais para construção terapêutica da sua modalidade básica de atenção à saúde (CHEESMAN et al., 2017). Uma pesquisa da Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento informou que mais de 33% do total de medicamentos produzidos por países industrializados são derivados de plantas e a OMS registrou os nomes de mais de 20.000 espécies de plantas medicinais com uma variedade de usos potenciais, inclusive no tratamento de infecções (SRINIVASAN et al., 2001).

Plantas medicinais possuem a vantagem de serem frequentemente menos dispendiosas, mais seguras em termos de efeitos colaterais e mais prontamente disponíveis em comparação com suas contrapartes sintéticas (SRINIVASAN et al, 2017; SUBRAMANI et al., 2017). Além disso, são abundantes em compostos bioativos que possuem atividade antimicrobiana. Essas substâncias bioativas (fitoquímicos) incluem taninos, alcalóides, carboidratos e glicosídeos, terpenóides, esteróides, flavonóides e cumarinas. Esses compostos são de valor clínico particular, porque sua bioatividade geralmente não confere resistência, que com a emergência global de resistência antibiótica a qual torna as bactérias substancialmente difíceis de controlar ou matar, os fitoquímicos tornam-se uma atrativa fonte de novos antimicrobianos, e portanto, mais pesquisas e estudos são altamente recomendados (SRINIVASAN et al, 2017; SUBRAMANI et al., 2017).

Os óleos essenciais estão incluídos neste contexto e possuem destacado potencial antimicrobiano, além de serem naturais e biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade para mamíferos e terem a capacidade de atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo (CALO et al., 2015). Seu uso bem como sua caracterização química, vem ganhando destaque em processamento de alimentos e aplicações farmacêuticas, sendo de grande interesse como soluções alternativas para o tratamento de doenças infecciosas (CALO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

2.2.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são misturas complexas de constituintes voláteis que são biossintetizados por plantas aromáticas. Eles podem ser sintetizados em botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca, e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Alguns dos compostos voláteis podem ser tóxicos em altas concentrações para a própria planta. Uma maneira de superar este problema é armazenar esses compostos voláteis como precursores inativos, por exemplo, como glicosídeos, ou em compartimentos extracelulares, como no caso dos tricomas glandulares (MAFFEI et al.,2010; OLIVEIRA et al.,2017).

Geralmente, os óleos essenciais são líquidos à temperatura ambiente, entretanto, alguns são sólidos ou resinosos. Os óleos são lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos e geralmente possuem uma densidade menor que a da água. Podem ser de cores diferentes, variando em colorações claras, amarelo pálido a verde esmeralda, azul ou vermelho acastanhado escuro (BAKALLI et al.,2008; BASSOLE E JULIANI, 2012).

Os óleos essenciais podem ser obtidos por diferentes métodos de extração como hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação a seco de uma planta ou parte de planta, ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento (por exemplo, para frutos cítricos). Destilação a vácuo; extração de solventes combinada com destilação; extração por destilação simultânea; extração de fluido supercrítico; extração assistida por microondas e hidrodestilação são outras técnicas usadas para extrair a fração volátil de plantas aromáticas (CAGLIERO et al.,2014; RUBIOLO et al.,2010). O rendimento e o perfil químico do produto de extração dependem do tipo de extração, clima, composição do solo e estágio do órgão da planta, idade e ciclo vegetativo (EL ASBAHANI et al., 2015).

Os componentes dos óleos essenciais podem incluir terpenóides regulares (mono-, sesqui- e diterpenos), terpenóides com esqueletos de carbono irregulares (homoterpenos e norisoprenóides), produtos da via da lipoxigenase, derivados de ácidos graxos voláteis, indóis e fenólicos, incluindo salicilato de metila e compostos aromáticos (MAFFEI et al., 2010).

As propriedades antissépticas das plantas aromáticas e medicinais e seus óleos são conhecidas desde a antiguidade. As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são a razão pela qual elas foram usadas para embalsamar múmias no antigo Egito (EDRIS, 2007). No entanto, foi

apenas no final do século XIX que os primeiros esforços foram feitos para caracterizar essas propriedades no laboratório (DORMAN E DEANS, 2000). Durante este período, Buchholtz realizou o primeiro estudo sobre capacidade antimicrobiana de óleos essenciais utilizando óleo de cominho, óleo de tomilho, fenol e timol para inibir o crescimento bacteriano e mostrou que o timol é um antimicrobiano mais eficaz do que o fenol. Como consequência, o timol passou a ser utilizado como anti-séptico cirúrgico na época de 1875 (PAULI E SCHILCHER, 2009).

A maioria dos estudos que envolvem óleos essenciais é direcionado para análise da atividade antimicrobiana *in vitro* e há uma ausência de pesquisas *in vivo* em humanos e em modelos animais correspondentes (vertebrados ou invertebrados), apesar dos bons resultados aparentemente obtidos por algumas pesquisas terapêuticas que tratam infecções com aplicações de óleos tópicas e sistêmicas (BASER E BUCHER et al. 2015).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais pode ter efeito inibidor do crescimento de bactérias (bacteriostáticas) ou destruidor de células bacterianas (bactericidas). Em relação a isto, as propriedades antibacterianas são mais frequentemente medidas como a concentração bactericida mínima (CMB) ou a concentração inibitória mínima (CMI) (SWAMY, AKHTAR, SINNIAH, 2016). Embora não exista uma padronização quanto ao nível de inibição aceitável para óleos essenciais quando comparados com antibióticos padrões, Duarte et al. (2005) propuseram a seguinte classificação para produtos naturais: elevada inibição - MIC de até 0,5 mg.mL⁻¹; moderada inibição - MIC entre 0,6 e 1,0 mg.mL⁻¹ e baixa inibição - MIC acima de 1,0 mg. mL⁻¹.

A eficácia dos óleos essenciais difere de um tipo para outro, bem como contra diferentes bactérias-alvo, dependendo da sua estrutura (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas). Por exemplo, óleos de sândalo e vetiver exibem alta atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas; no entanto, eles não inibem as linhagens bacterianas Gram-negativas (HAMMER E CARSON, 2011; RAUT E KARUPPAYIL, 2014). Os óleos essenciais de levístico e salsa manifestam comportamentos semelhantes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) (SEMENIUC, POP, E ROTAR, 2017). Além disso, muitos óleos essenciais são efetivos contra linhagens sensíveis e resistentes a antibióticos em estudos *in vitro* e demonstram possuir potencial contra biofilmes que são bem tolerantes a antibióticos (RAUT E KARUPPAYIL, 2014).

O conhecimento sobre o modo de ação dos óleos essenciais contra patógenos bacterianos em uma visão mais completa dos alvos celulares bacterianos tem sido ampliado nos últimos anos e inúmeros mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais têm sido propostos, entretanto, cada componente dos óleos pode exibir um mecanismo de ação diferente contra patógenos (FALEIRO, 2011).

O mecanismo de ação antimicrobiana mais reportado está associado à sua alta afinidade por lipídeos devido à sua natureza hidrofóbica. Suas propriedades antibacterianas estão evidentemente associadas a esse caráter lipofílico e às estruturas externas do microorganismo (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al, 2016). Isso permite que os óleos essenciais penetrem nas estruturas da membrana dentro da célula, o que aumenta a fluidez e permeabilidade da membrana, altera a topologia das proteínas da membrana e induz distúrbios na cadeia respiratória (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al, 2016).

Os óleos essenciais também podem influenciar outros processos celulares importantes. Eles podem alterar o transcriptoma celular, com a inibição da síntese de ácidos nucleicos de DNA e RNA, alterar o proteoma celular por inibição da síntese de proteínas, que entre outras funções, regulam a expressão gênica nas células (PIĄTKOWSKA E RUSIECKA-ZIÓŁKOWSKA, 2016). Além disso, eles podem limitar ou inibir a atividade de enzimas como lipase, coagulase, aminoácido descarboxilase e enzimas que degradam antibióticos (PIĄTKOWSKA E RUSIECKA-ZIÓŁKOWSKA, 2016).

Óleos essenciais também podem inibir ou reduzir a virulência microbiana por fatores de influência relacionados à parede celular ou excreção. Eles também podem modular a resistência microbiana aos antibióticos por inibição de bombas de efluxo. Embora os inibidores da bomba de efluxo sejam frequentemente considerados moléculas grandes e lipofílicas, também é proposto que as bombas de efluxo possam ser inibidas através da ruptura das membranas e da inibição das vias metabólicas (GIBBONS, 2008; PIĄTKOWSKA E RUSIECKA-ZIÓŁKOWSKA, 2016).

2.3 *Syagrus coronata*

Syagrus coronata (Mart.) Becc. é uma palma pertencente à família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Cocoeae, subtribo Butineae (BELVISO et al., 2013). Com 115 gêneros e 1500 espécies, a subfamília Arecoideae é a maior entre a família Arecaceae (CREPALDI et al., 2001).

S. coronata é popularmente conhecido por: licuri, ouricuri, aricuri, coqueiro cabeçudo, licurizeiro, nicuri, urucuri e coqueiro dicori (BELVISO et al., 2013; DRUMOND, 2007). Essa palmeira é comumente encontrada em regiões secas e áridas da Caatinga tendo sua distribuição geográfica ocupando a parte oriental e central da Bahia, até o Sul de Pernambuco, o norte de Minas Gerais e áreas de Alagoas e Sergipe (CREPALDI et al., 2001; BELVISO et al., 2013). O ouricuri se propaga de forma exclusivamente sexuada, se desenvolvendo em solos férteis e profundos, mesmo em afloramentos rochosos, porém não se adapta a solos alagados e permanentemente úmidos (DRUMOND, 2007).

O fruto do ouricuri é uma drupa, oval-elipsoide, que apresenta exocarpo fibrosotênue, mesocarpo fibroso-mucilaginoso comestível e endocarpo duro. Enquanto verdes, os frutos possuem o endosperma líquido, que se torna sólido no processo de amadurecimento, dando origem à amêndoa (DRUMOND, 2007). A literatura afirma que a coloração de frutos, variando do amarelo ao vermelho, geralmente está associada à presença de carotenóides, compostos com atividade pró-vitâmica A, tornando, portanto, seu consumo importante para as regiões pobres de países em desenvolvimento, onde a hipovitaminose A é endêmica, afetando principalmente crianças na idade pré-escolar (CREPALDI et al., 2001; GROSS, 1991).

Sobre sua composição nutricional, o fruto caracteriza-se por possuir elevado teor de lipídeos, em torno de 49%, com mais de 80% da sua composição classificada como ácidos graxos saturados, que podem ser extraídos por pressão e temperatura, proteínas (11,5%) da amêndoa e 13,2% de carboidratos totais da polpa dos frutos. O teor de lipídeos é elevado e similar ao padrão encontrado para outras espécies de palmeiras, porém o teor de proteínas é superior às demais (QUEIROGA et al., 2010).

O betacaroteno é a principal vitamina encontrada na polpa dos frutos do ouricuri, e mesmo sendo encontrado em um teor menor ($2,6\mu\text{g.g}^{-1}$) que o de outras espécies de palmeiras, ainda é uma boa fonte dessa vitamina, sobretudo porque em períodos de seca severa constitui-se no único alimento disponível na vegetação. A determinação da composição nutricional mostra que o fruto é altamente calórico. Os principais constituintes das amêndoas são lipídeos e proteínas (CREPALDI et al., 2001; BAUER et al., 2013).

A amêndoa de ouricuri é rica em proteína e em óleo de alta qualidade, fornecendo cerca de 57 a 62% de azeite, que é empregado na produção de margarina. O óleo extraído da semente é amarelado, similar ao do coco, mas com ponto de fusão mais baixo. A exploração do azeite das sementes do ouricuri teve início em 1937, quando este óleo pode ser utilizado na cozinha,

para o preparo de alimentos; sendo o mesmo também misturado ao óleo de dendê (NOBLICK, 1986).

O óleo de ouricuri ainda é utilizado na fabricação de sabão, sendo considerado um óleo de primeira qualidade, já tendo sido bastante usado na indústria de perfumaria no início do século XX (NOBLICK, 1986). O sabor das sementes e óleos de licuri é semelhante ao do coco comum (*Cocos nucifera*), atingindo poucos tons de sabor e aroma das amêndoas (*Prunus dulcis*) (BELSIVO et al., 2012).

Nas amêndoas de ouricuri cruas, os principais compostos voláteis são os ácidos carboxílicos de cadeia curta (particularmente ácidos octanóicos e hexanóicos), com presença de lactonas, álcoois e aldeídos (BELSIVO et al., 2012). Bessa et al. (2016) também reportaram a predominância dos ácidos graxos como componentes voláteis de *S. coronata* (particularmente ácidos octanóico e dodecanóico) e a presença de sesquiterpenos (em especial α -cubebeno). Santos et al. (2017) e De Souza et al. (2017) também encontraram os ácidos octanóico e dodecanóico como principais componentes.

S. coronata também tem sido utilizada na medicina popular de algumas regiões do nordeste brasileiro. Algumas partes da planta usadas em aplicações medicinais incluem a casca de nozes para picadas de cobra, água de coco (endosperma líquido) como gotas para inflamação ocular, micoses (*Tinea negra* e *Tinea versicolor*) e cicatrização de feridas, e chá da raiz de ouricuri indicado para o tratamento da dor na coluna (HUGHES et al., 2013).

O extrato aquoso da inflorescência de *S. coronata* mostrou potencial antibacteriano contra *Bacillus cereus* e *S. aureus* (HUGHES et al., 2013). A propriedade anti-estafilococos do óleo volátil de *S. coronata* contra linhagens sensíveis e resistentes a antibióticos também foi demonstrada por Bessa et al. (2016), com CMI variando de 0.002 $\mu\text{L/mL}$ to 0.08 $\mu\text{L/mL}$ e CMB variando de 0.002 $\mu\text{L/mL}$ to 0.312 $\mu\text{L/mL}$.

O óleo essencial extraído das amêndoas de *S. coronata* foi capaz de promover a morte de larvas de *Aedes aegypti* e exercer efeito deterrente de oviposição sobre fêmeas grávidas. O óleo também interferiu no padrão de motilidade larval que ocorreu em resposta à presença da substância estranha Tween 80 nas primeiras horas de incubação (SANTOS et al., 2017).

2.4 PROTEÔMICA

O termo proteoma, em alusão clara ao termo genômica, refere-se ao conjunto total de proteínas expressas pelo genoma, encontradas em células vivas, tecidos ou organismos, analisados de uma maneira ampla no contexto de determinada condição e tempo

(TSIATSIANI E HECK, 2015). O termo proteômica foi utilizado inicialmente em meados de 1994, definido como um campo de estudo e tecnologia que se propõe analisar de forma ampla o conjunto de proteínas (BENSIMON, HECK E AEBERSOLD, 2012). As proteínas se manifestam como estruturas expressas em uma célula ou tecido, caracterizadas como o resultado da transcrição de genes, tradução e síntese até à modificação protéica pós-tradução (TSIATSIANI E HECK, 2015).

A análise protéica global, corresponde a maquinaria funcional da célula, constitui o principal nível de informação para compreender as atividades e dinâmica celulares. (ALTELAAR, MUNOZ E HECK, 2013). Para caracterizar processos de mecanismos e funcionamento interno das células, é preciso avaliar a composição dinâmica e a localização dos componentes moleculares. Assim, todos os processos celulares envolvem proteínas e sua caracterização, desta forma, atraindo maior interesse dos estudos, ao longo dos anos (ALTELAAR, MUNOZ E HECK, 2013).

As análises proteômicas podem ser ferramentas úteis tanto na identificação de biomarcadores de diagnóstico, tratamento e expressão diferencial, como também na análise do perfil de proteínas aumentadas ou diminuídas, ganhando destaque no campo da pesquisa de doenças (ZENG et al., 2017). No campo da microbiologia, a proteômica também avançou o conhecimento dos mecanismos de virulência bacteriana e alguns aspectos importantes de interação das bactérias com as células humanas e, portanto, da patogênese das doenças infecciosas.

Além de identificação de proteínas relacionadas a resistência bacteriana a antibióticos, bem como elucidação do seu mecanismo de ação, a proteômica contribui para o melhor entendimento das funções da comunidade microbiana, incluindo biofilmes, e fisiologia microbiana, que fornece ferramentas para explorar ação de novos produtos bioativos e novos antibióticos para a terapia antimicrobiana clínica (CHEN et al., 2017; PÉREZ-LLARENA E BOU, 2016).

Na análise proteômica são utilizadas ferramentas analíticas e de bioinformática para caracterizar a estrutura e as funções das proteínas. Técnicas analíticas de eletroforese em gel 2-D e MALDI-TOF são as mais utilizadas. Para separação de proteínas por eletroforese unidimensional (1-DE)-Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) e bidimensional (2-DE), as moléculas devem ser inicialmente isoladas de materiais biológicos, tais como tecidos e fluidos corporais. A extração adequada de proteínas é a etapa essencial para obtenção de bons resultados eletroforéticos (BARBOSA et al., 2012).

A eletroforese em gel 1-DE em condições de desnaturação tem várias vantagens: praticamente todas as proteínas são solúveis em SDS, permitindo a sua separação e abrange um valor relativamente elevado de massas moleculares (de 10000 a 300000 dalton- Da). No entanto, ao separar proteínas apenas em relação às massas moleculares, obtém-se informação limitada, uma vez que cada uma das bandas presente nos géis é freqüentemente constituída por proteínas diferentes (LAMY et al., 2012).

Na 2-DE usual, as proteínas são separadas em duas etapas consecutivas. Na primeira, denominada focalização isoeétrica (IEF), as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga é igual a zero (ponto isoeétrico ou pI). Na segunda etapa, as proteínas são submetidas a uma eletroforese com direção perpendicular a IEF em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE), e então separadas de acordo com sua massa molecular. Essa segunda etapa é similar à SDS- PAGE, na qual as moléculas são diretamente aplicadas no gel SDS- PAGE e separadas de acordo com seu tamanho (BARBOSA et al., 2012).

A 2- DE é a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões proteicos (GALDOS-RIVEROS et al., 2010). Em comparação com a SDS- PAGE, a 2- DE apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas. Enquanto que na SDS-PAGE as bandas proteicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais de separação podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A 2- DE, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

Embora capaz de gerar muitas informações, as técnicas de SDS- PAGE e 2-DE possuem limitações. Uma das mais importantes é a presença de algumas proteínas em concentrações elevadas, especialmente em certos fluidos corporais, como é o caso da amilase e da mucina na saliva, que dificulta a migração eletroforética das menos abundantes. Outra limitação é a dificuldade na extração de proteínas intactas do gel para posterior análise, mas algumas tentativas têm sido feitas para contornar esse problema (BARBOSA et al., 2012).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que produz espectros das massas dos átomos ou moléculas que compõem uma amostra de material. Os espectros são usados para

determinar a assinatura elementar ou isotópica de uma amostra, as massas de partículas e de moléculas, e para elucidar as estruturas químicas de moléculas, tais como peptídeos e outros compostos químicos. Espectrometria de massa funciona por compostos químicos ionizantes para gerar carga moléculas ou fragmentos de moléculas e medir sua massa para cobrar taxas. MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight*) é a técnica mais usualmente empregada para identificação de proteínas (CHANDRASEKHAR et al., 2014).

O MALDI-TOF pode ser utilizado, também, para identificar bactérias e fungos e substitui o sequenciamento de isolados não usuais no mesmo laboratório, proporcionando uma plataforma de trabalho consistente e racionalização eficaz em termos de custos. Além disso, MALDI-TOF permite eliminar ensaios bioquímicos complementares (DHIMAN et al., 2011). Uma variante do MALDI, denominada SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionization) é geralmente empregada para análise de proteínas de baixo peso molecular (BARBOSA et al., 2012).

Diante deste vasto leque de oportunidades, análises proteômicas têm sido realizadas para avaliar a ação antibacteriana de produtos naturais derivados de plantas a fim de elucidar seu mecanismo de ação. Em um estudo recente, os efeitos dos polifenóis do chá (uma mistura de polifenóis extraídos do chá verde com um amplo espectro de atividade antibacteriana) na expressão de proteínas em *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens* foram investigados por 2-DE e MALDI-TOF/TOF. Os resultados confirmaram que o distúrbio metabólico causado pelo tratamento com polifenóis estava associado a um aumento na quantidade de proteínas de membrana, como chaperonas e enzimas-chave envolvidas no controle das vias de biossíntese dos componentes da membrana. Estes dados apoiaram um possível modo de ação para polifenóis: aumento da permeabilidade da membrana levando à liberação de componentes celulares (YI et al., 2014).

Plumbagin (naftoquinona) é um composto natural amarelo extraído da raiz *Plumbago zeylanica* L., que é amplamente utilizado na medicina tradicional na Índia e na China. O efeito antibacteriano da plumbagina sobre *Bacillus subtilis* foi avaliado por duas técnicas proteômicas complementares, 2-DE e iTRAQ, que identificaram expressão diferencial para 230 proteínas, envolvidas principalmente no ciclo do ácido cítrico e na biossíntese do heme. Esses resultados indicam que a plumbagin bloqueia a geração de energia e também suprime a biossíntese de ácidos graxos. A repressão de proteínas diretamente ligadas à divisão celular (FTSA e SpoVG) também foi observada (REDDY et al., 2015). Outro exemplo é a elucidação do mecanismo de ação para o roemerin, alcalóide de *Papaver rhoeas*, contra *E. coli*, que

estava relacionado com a inibição da permeabilidade da membrana e proteínas transportadoras de açúcar (GOKGOZ E AKBULUT, 2015).

O mecanismo de ação de rhodomyrtone (isolado de *Rhodomyrtus tomentosa*) contra *S. aureus* resistente à meticilina também foi estudado pela análise 2-DE, que revelou que este composto afeta a expressão de grandes classes de proteínas envolvidas na biossíntese da parede celular, divisão celular, degradação protéica, resposta ao estresse, fatores de virulência, produção de energia e biossíntese de macromoléculas (SIANGLUM et al., 2011). Outro trabalho semelhante mostrou que a rhodomyrtone afetou enzimas associadas às principais vias metabólicas do *Streptococcus pyogenes*, além de suas ações inibitórias em genes de virulência, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, AMPc e exotoxina pirogênica estreptocócica C (LIMSUWAN et al., 2011). Estes trabalhos forneceram informações importantes sobre a atividade antibacteriana deste novo composto natural, um candidato promissor para um agente terapêutico contra infecções bacterianas.

ARTIGO 1 – APPLICATION OF OMICS TECHNOLOGIES FOR EVALUATION OF ANTIBACTERIAL MECHANISMS OF ACTION OF PLANT-DERIVED PRODUCT *

Bruno S. dos Santos, Luís C. N. da Silva, Túlio D. da Silva, João F. S. Rodrigues, Marcos A. G. Grisotto, Maria T. dos Santos Correia, Thiago H. Napoleão, Márcia V. da Silva e Patrícia M. G. Paiva

(*) – Artigo publicado na revista **Frontiers in microbiology** (Fator de impacto 2017: 4.019)



Application of Omics Technologies for Evaluation of Antibacterial Mechanisms of Action of Plant-Derived Products

Bruno S. dos Santos^{1†}, Luís C. N. da Silva^{2†}, Túlio D. da Silva^{1,3}, João F. S. Rodrigues², Marcos A. G. Grisotto^{2,4}, Maria T. dos Santos Correia¹, Thiago H. Napoleão¹, Márcia V. da Silva¹ and Patrícia M. G. Paiva^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil,

² Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade CEUMA, Maranhão, Brazil, ³ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Pernambuco, Brazil, ⁴ Instituto Florence de Ensino Superior, Maranhão, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Yuji Morita,
Aichi Gakuin University, Japan

Reviewed by:

Octavio Luiz Franco,
Universidade Católica de Brasília,
Brazil

Nitin Mantri,
Royal Melbourne Institute of
Technology University, Australia
Berna Sariyar Akbulut,
Marmara University, Turkey

*Correspondence:

Patrícia M. G. Paiva
ppaivaufpe@yahoo.com.br

[†] These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance and
Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 13 December 2015

Accepted: 01 September 2016

Published: 27 September 2016

Citation:

Santos BS, Silva LCN, Silva TD,
Rodrigues JFS, Grisotto MAG, Correia
MTS, Napoleão TH, Silva MV and
Paiva PMG (2016) Application of
Omics Technologies for Evaluation of
Antibacterial Mechanisms of Action of
Plant-Derived Products.
Front. Microbiol. 7:1466.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01466

In the face of increasing bacterial resistance to antibiotics currently in use, the search for new antimicrobial agents has received a boost in recent years, with natural products playing an important role in this field. In fact, several methods have been proposed to investigate the antibacterial activities of natural products. However, given that the ultimate aim is future therapeutic use as novel drugs, it is extremely necessary to elucidate their modes of action, stating the molecular effects in detail, and identifying their targets in the bacterial cell. This review analyzes the application of “omics technologies” to understand the antibacterial mechanisms of bioactive natural products, to stimulate research interest in this area and promote scientific collaborations. Some studies have been specifically highlighted herein by examining their procedures and results (targeted proteins and metabolic pathways). These approaches have the potential to provide new insights into our comprehension of antimicrobial resistance/susceptibility, creating new perspectives for the struggle against bacteria, and leading to the development of novel products in the future.

Keywords: natural products, antimicrobial target, genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics

INTRODUCTION

The alarming spread of bacterial resistance to antibiotics is one of the most serious challenges to global public health, as drug resistance has been found for all classes of antibiotics used in clinical practice (Arias and Murray, 2015). Moreover, few new antibiotic classes have been discovered in the last several decades. Managing this situation will require extensive search for new drugs and elucidation of their mechanisms of action (MOA; Kon and Rai, 2012).

In general, natural plant products have been documented as important alternative sources of new antimicrobial agents. Traditional knowledge regarding the use of medicinal plants has driven the identification of plant-derived products with different chemical structures (Radulovic et al., 2013). This structural diversity enables the active phytochemicals to act through diverse mechanisms (usually targeting multiple biochemical pathways), which are sometimes different from those used by traditional antibiotics (Simões et al., 2009; Radulovic et al., 2013; Harvey et al., 2015).

Given the great achievements in the development of analytical tools for identification and isolation of antimicrobial phytochemicals, the biggest challenge now is the characterization of

their MOA, which is essential to supporting their use as lead molecules for drug-development programs (Swinney and Anthony, 2011). The approaches adopted to identify a possible drug target are predominantly based on the combined application of several biochemical and genetic assays (such as flow cytometry, electron microscopy, colorimetric assays, and gene expression analysis), using both cellular systems and model organisms. However, the combination of these techniques takes time and requires the use of large amounts of the compound under investigation (Swinney and Anthony, 2011; Schirle et al., 2012; Sianglum et al., 2012; Roemer and Boone, 2013; Tang, 2015).

Recent advances in “omics” technologies (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) are attributed to innovative breakthroughs in genome sequencing, bioinformatics, and analytic tools such as liquid and gas chromatography and mass spectrometry, along with high-throughput technologies. Omics technologies have provided crucial insights into processes related to bacterial physiology, virulence, stress, and the MOA of antimicrobial compounds (Roemer and Boone, 2013; Tang, 2015; **Figure 1**). The use of these tools provides deeper and more robust data, and has greater potential to reveal new therapeutic targets than conventional assays. These new targets and their related pathways are critically important in the struggle to overcome drug resistance (Roemer and Boone, 2013). In this review, we will focus on the application of these methodologies to study the mechanisms of action of plant-derived antibacterial compounds.

OVERVIEW OF PHENOTYPICAL METHODS FOR THE ELUCIDATION OF ANTIBACTERIAL MOA

Compounds with antibacterial activity are usually selected by traditional antimicrobial methodologies such as agar-diffusion based assays, determination of minimum inhibitory (MIC), and bactericide (MBC) concentrations, and time-kill curves. Once an antimicrobial candidate is selected, the next step is to characterize its action on bacterial structures such as the cell membrane, genetic material, and/or protein synthesis, usually through phenotypical assays (Gottschalk et al., 2013; Silva et al., 2013a; Monte et al., 2014; Hyldegard et al., 2015; Magi et al., 2015; Gerits et al., 2016; Moreira et al., 2016). Next, the molecular pathway can be elucidated by analyzing the expression of the genes related to the phenotype observed (Gottschalk et al., 2013). Here, we will discuss the methods to evaluate the effects on the cell membrane, DNA damage, and macromolecular synthesis.

The morphological alterations on cell membrane can be efficiently studied by electron microscopy (Silva et al., 2013a). Alternatively, various assays are performed to evaluate membrane integrity. One simple assay measures the leakage of cell material that absorbs at 260 nm wavelength on the supernatant of treated cells. Nucleic acids and related compounds (such as pyrimidines and purines) have max UV light absorbance at this wavelength. The increase of this material in the supernatant indicates bacterial cell wall and/or membrane

damage (Chusri and Voravuthikunchai, 2009; Silva et al., 2013b). Another useful approach is the detection of cytoplasmic enzymes or ATP leakage in the cell culture supernatant of treated bacteria (Gottschalk et al., 2013). Fluorescent probes are also widely used to evaluate membrane viability, such as propidium iodide (PI), SYTOX green, 1-*N*-phenylmethylamine (NPN), and 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide [DiOC₂(3)]. For example, PI is used to evaluate membrane integrity, as it is a membrane impermeant dye that intercalates DNA (only if there is a damage; Van Nevel et al., 2013); whereas DiOC₂(3) helps measure the membrane potential (Moreira et al., 2016).

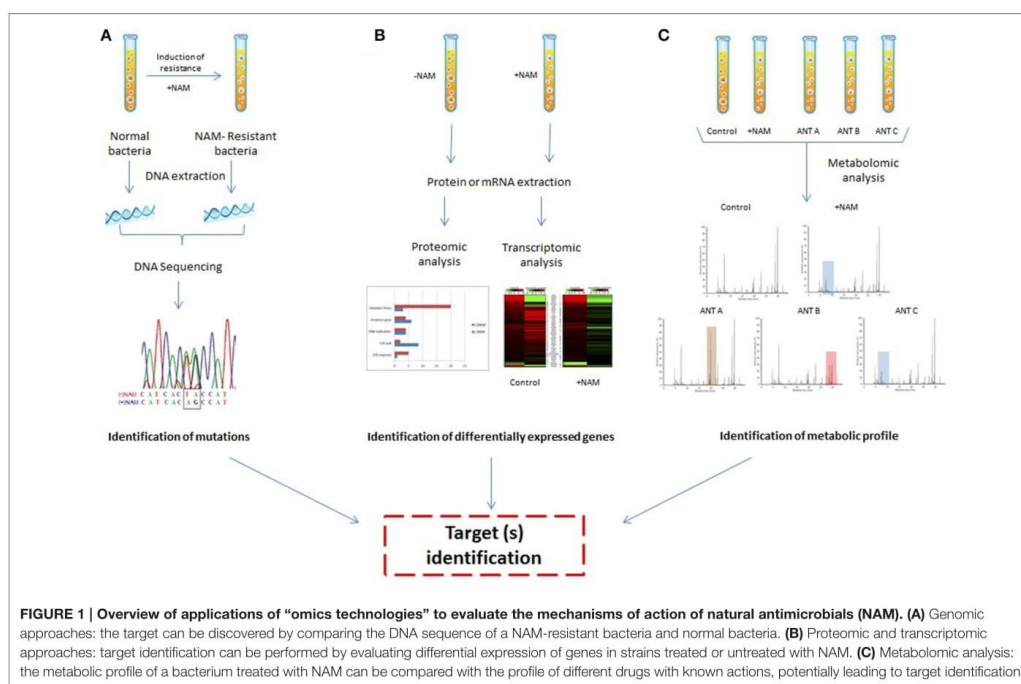
Recently, the effects of boromycin (a polyether macrolide antibiotic isolated from *Streptomyces antibioticus*) on mycobacterial cell membrane were evaluated. The authors adopted an approach where, to assess the release of cell content, a strain of *Mycobacterium bovis* was transformed with a plasmid (pGMEH-P38-mRFP) encoding mCherry Red Fluorescent Protein (mRFP). After treatment with boromycin, the fluorescence in the supernatant was measured (Moreira et al., 2016).

The action of a compound on DNA integrity can be evaluated by DNA-binding analysis, in which a sample of purified DNA (usual plasmid DNA) is mixed with different concentrations of the tested compound. After an incubation period, the reaction is subjected to electrophoretic analysis. From the gel retardation assay, interference on the migration profile in relation to control cells is considered a positive result (the compound can bind to the DNA; Gottschalk et al., 2013). DNA fragmentation induced by an antimicrobial can be detected *in situ* by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) assay. Usually this assay employs fluorescently tagged dUTP, which binds to 3'-OH groups in DNA breaks (Rohwer and Azam, 2000). Difference in DNA distribution between treated and untreated cells can be analyzed using DAPI dye (4',6-diamidino-2-phenylindole; Kjelstrup et al., 2013). Damage of bacterial DNA induces formation of the RecA filament, leading to auto-cleavage of LexA resulting in activation of SOS response. In this sense, perturbations in DNA integrity can be indirectly assessed through the expression of *recA* gene (Gottschalk et al., 2013; Kjelstrup et al., 2013).

To investigate the effects of a compound on bacterial macromolecular synthesis, a scintillation assay can be performed. In this assay, bacterial culture is labeled by the addition of radioactive precursors of DNA ([methyl-³H]thymidine), RNA ([5,6-³H]uridine), or protein (L-[G-³H]glutamine) synthesis. After the experimental treatment, the radiolabeled incorporation is measured using a scintillation counter (Gottschalk et al., 2013; Kjelstrup et al., 2013; Gerits et al., 2016).

GENOMICS AND ADVANCES IN ANTIBIOTICS RESEARCH

The advent of efficient genetic sequencing technologies enabled the complete decoding of various microbial genomes, making all this information accessible. This resulted in the identification of a range of genes related to essential processes for bacterial survival,



virulence, and mutagenesis. These genes and their products are therefore potential new antimicrobial targets (Roemer and Boone, 2013; Scheffler et al., 2013). This knowledge is of utmost importance to the development of new screening platforms for identification and selection of compounds targeting specific essential genes based on protein interactions and mutant libraries (Zhang et al., 2015; Morita et al., 2016). A classical approach, applicable to select compounds that are able to interact with a specific target, is based on affinity chromatography systems. In these assays, the target can be immobilized on a matrix (affinity matrix), and a bioactive compound that is able to bind the target can be isolated and identified (Sakamoto et al., 2012).

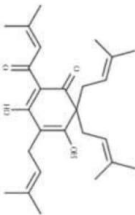
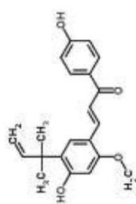
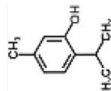
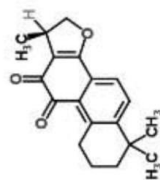
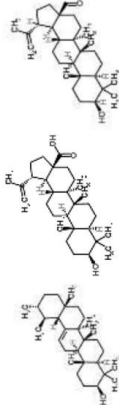
The interaction of a target and bioactive compound can also be evaluated using bacterial two-hybrid (BTH) systems. Several BTH platforms have been engineered, such as the BTH assay based on adenylate cyclase (*cya*) reconstitution. This system was comprehensively revised by Battesti and Bouveret (2012). Briefly, the adenylate cyclase from *Bordetella pertussis* is divided in two sub-domains (T18 and T25), and each gene encoding the proteins of interest is cloned into a vector fused to either T18 or T25 protein fragments. The vector is inserted in an *Escherichia coli* strain lacking endogenous *cya* (*cya*[−]). The interaction between the proteins of interest brings into proximity the T18 and T25 fragments and a *Cya*⁺ phenotype is created. This results in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production and

consequently, in the activation of cAMP-regulated promoters (e.g., the *lac* promoter). A BTH based on *cya* activity was employed by Kjelstrup et al. (2013) to select compounds capable of disrupting the interaction between proteins involved in DNA replication of *Staphylococcus aureus*. The authors found two peptide inhibitors of the dimerization of the β -sliding clamp of the replisome.

Another system developed from genomic technologies is based on the screening of a genome-wide mutant library (Gray et al., 2015). These mutants can be generated through mutagenesis mediated by mobile genetic elements such as transposons (Pasquina et al., 2015; Gerits et al., 2016). Next, mutants with altered sensitivity to the compound are identified, elucidating the pathways involved in its action (through genomic studies). This approach was adopted to elucidate the molecular mechanism of alfalfa snak-in-1 (MsSN1), an antimicrobial peptide produced by *Medicago sativa*, against *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. This work revealed that MsSN1 peptide acts on adhesion properties of *P. fluorescens* (Ayub et al., 2015; Table 1).

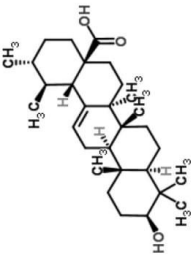
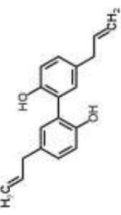
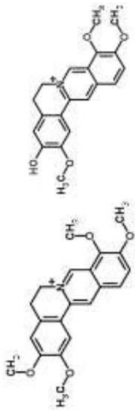
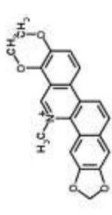
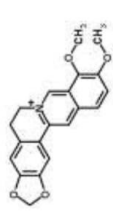
Sequencing methods can also be applied in the discovery of potential targets through the selection of mutants resistant to the new compound, followed by genetic comparison (Brazas and Hancock, 2005; Bachmann et al., 2014; Köser et al., 2014). In this case, the wild type strain is cultivated in the presence of the antimicrobial compound, and mutants

TABLE 1 | Plant-derived products with mechanisms of action evaluated by “omics technologies”.

Phytochemical class	Chemical structure	Antimicrobial agent	Pathogen	Methodology	Main target(s)	References
Phenolic acid		Lupulone from <i>Humulus lupulus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Microarray	Surface-exposed lipids, cytochrome P450 enzymes, PE/PPE multigene families, ABC transporters, and protein synthesis	Wei et al., 2014
Chalcone		Licochalcone A from <i>Glycyrrhiza inflata</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Autolysis-associated proteins, cell wall proteins, pathogenic factors, protein synthesis, and capsule synthesis	Shen et al., 2015
Terpenes	 	Thymol from <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Thompson	2-DE analysis	Bacterial envelope and citrate metabolic pathway	Di Pasqua et al., 2010
		Cryptotanshinone from <i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Oxygen radical generation	Feng et al., 2009
		Essential oils from <i>Citrus sinensis</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Cell envelope	Muthaiyan et al., 2012
		Pentacyclic triterpenoids (α-amyrin, betulonic acid, and betulinaldehyde) from <i>Callicarpa tomentosa</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Bacterial cell membrane, cessation of protein synthesis, and fatty acids	Chung et al., 2013

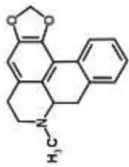
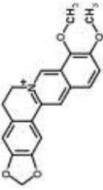
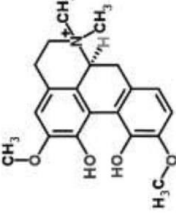
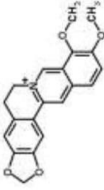
(Continued)

TABLE 1 | Continued

Phytochemical class	Chemical structure	Antimicrobial agent	Pathogen	Methodology	Main target(s)	References
Lignan		Ursolic acid	<i>Staphylococcus aureus</i>	RNA-Seq-based	Inhibition of metabolism of some amino acids and the expression of adhesins	(Cin et al., 2014)
		Magnolol from <i>Magnolia obovata</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Virulence pathways	Wang et al., 2011
Alkaloids		Palmitine and jatrorrhizine from <i>Trinospora capillipes</i>	<i>S. aureus</i>	HPLC-ESI/MS	RNA polymerase, gyrase, and topoisomerase IV (similar to rifampicin and norfloxacin)	Yu et al., 2007b
		Chelerythrine from <i>Chelidonium majus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Microarray	Urease, surface exposed lipids, the heat shock response, and protein synthesis	Liang et al., 2011
		Berberine-containing plant extract from <i>Papaver polychaetum</i>	<i>Escherichia coli</i>	2-DE analysis	Elongation factor-Ts, ABC transporter, energy metabolism	Ozbaldi et al., 2010
						

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Phytochemical class	Chemical structure	Antimicrobial agent	Pathogen	Methodology	Main target(s)	References
		Rebermine from <i>Papaver rhoeas</i>	<i>Escherichia coli</i>	2-DE analysis	Inhibition of membrane permeability and sugar transporter proteins involved in carbohydrate metabolism	Gokgoz and Akbulut, 2015
		Berberine from <i>Aquilegia oxysepala</i>	<i>S. aureus</i>	HPLC/ESI-MS with PCA	Nucleic acids; same profile as rifampin and norfloxacin	Yu et al., 2007a
		Magnoflorine from <i>Aquilegia oxysepala</i>	<i>S. aureus</i>	HPLC/DAD/ESI-MS analysis combined with PCA	Protein synthesis	Yu et al., 2007a
		Berberine from <i>Coptis chinensis</i>	<i>S. aureus</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>E. coli</i> <i>Shigella flexneri</i>	Microarray Microarray Microarray and 2-DE Microarray	Transport proteins Regulation of central metabolism and disruption of membrane Cell division, motility, and transport processes DNA replication, cell division, and chromosome partitioning, bacterial cell membrane	Wang et al., 2008 Zhang et al., 2009 Karasmanoglu et al., 2014 Fu et al., 2010
Crude extract rich in esters, ketone and phenol derivative	-	Berberine chloride Flower extract from <i>Melastoma candidum</i>	<i>Escherichia coli</i> and <i>S. aureus</i>	Denaturing gel electrophoresis and MALDI TOF-TOF MS	Glutamate decarboxylase, elongation factor-Tu, and α -hemolysin	Wong et al., 2014

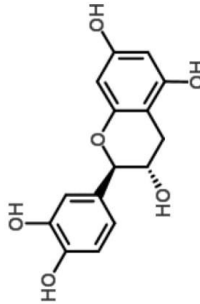
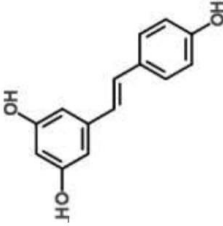
(Continued)

TABLE 1 | Continued

Phytochemical class	Chemical structure	Antimicrobial agent	Pathogen	Methodology	Main target(s)	References
Acylphloroglucinol		Rhodomycinone from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	<i>S. aureus</i>	2-DE analysis	Cell wall biosynthesis, cell division, protein degradation, Stress response, virulence factors, energy production, and macromolecule biosynthesis	Sianglum et al., 2011
				Microarray	Biosynthesis of amino acids, cell envelope, protein transporters, and nucleotide metabolism	Sianglum et al., 2012
			<i>S. pyogenes</i>	2-DE analysis	Virulence genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cAMP factor, streptococcal pyrogenic exotoxin C	Limsuwan et al., 2011
Anthraquinone		Rhein from <i>Rheum palmatum</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Cellular transport	Yu et al., 2008
Naphthoquinone		Plumbagin from <i>Plumbago zeylanica</i>	<i>B. subtilis</i>	2-DE and ITRAQ	Citric acid cycle and heme biosynthesis	Reddy et al., 2015
		Shikonin-containing plant extract from <i>Lithospermum radix</i>	<i>S. aureus</i>	2-DE	Helicase (RuvB) and bacterial cell wall biosynthesis	Lin et al., 2012

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Phytochemical class	Chemical structure	Antimicrobial agent	Pathogen	Methodology	Main target(s)	References
Phytoanticipin		Sodium Houttuyfonate from <i>Houttuynia cordata</i>	<i>S. aureus</i>	Microarray	Autolysin pathway	Liu et al., 2011
Catechin		Tea polyphenols (especially catechins) from <i>Camellia sinensis</i>	<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. marcescens</i>	2-DE and MALDI-TOF/TOF analyzes	Membrane metabolism	Yi et al., 2010, 2014
Stilbene		Resveratrol	<i>Staphylococcus aureus</i>	RNA-Seq-based	Inhibition of quorum sensing, synthesis of surface protein, and capsular polysaccharides	Qin et al., 2014
Peptide		Alfalfa snak-in-1 (MSN1; several plants)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Screening of genome-wide mutant library	Adhesion properties	Ayub et al., 2015

can be generated by natural selection. This strategy can be exemplified by the elucidation of the antibacterial action mechanism of a new compound designated SPI031 [*N*-alkylated 3,6-dihalogenocarbazol 1-(sec-butylamino)-3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)propan-2-ol] against *P. aeruginosa*. The authors selected three SPI031-resistant mutants and compared their whole genome sequences with the genome of *P. aeruginosa* wild-type (WT). They found mutations in the genes coding for the multidrug efflux pump (*nfxB*) and outer membrane synthesis (*htrB* and PA14_23400; Gerits et al., 2016). This approach has the advantage of being able to overcome the limitations of protein interaction assays or mutant libraries in revealing new targets (Nijman, 2015).

TRANSCRIPTOMICS TECHNOLOGIES IN ANTIBIOTIC RESEARCH

Several studies support that the MOA of an antibiotic is related to the interaction of multiple pathways (Dwyer et al., 2015). Thus, techniques for the analysis of gene expression on a large scale (transcriptional analysis) have been widely applied to evaluate the action mechanisms of an antibiotic, including those derived from plants. These assays are classified as “transcriptomics,” which is a set of high-throughput technologies that analyze the transcriptome (the complete set of RNA transcripts produced by an organism or cell under specific circumstances; Nambiar et al., 2010).

Currently, DNA microarrays are the technology of choice for large-scale studies of gene expression. Microarray technology was developed using the information available from the genome projects and is based on the hybridization of cDNA (complementary DNA produced from mRNA) to oligonucleotide probes incorporated into a slide. Each probe has a sequence of a specific gene from the organism. Microarrays have the advantage of simultaneously measuring the global gene expression at the level of transcription, and thus providing insights into the molecular pathways related with the investigated phenomena. Generally, at least two different experimental situations are studied and the cDNA extracted from each is labeled with different fluorophores (Smith et al., 2005; Nagaraj and Singh, 2010). Microarrays have been used to elucidate the MOA of several phytochemicals, opening new insights into the modulation of different pathways caused by an antimicrobial agent (Hammami and Fliss, 2010; Chung et al., 2013; Wei et al., 2014; Eng and Nathan, 2015; Shen et al., 2015). We highlight some of them herein, with more examples provided in **Table 1**.

Licochalcone A is a chalcone isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae), which shows different pharmacological activities, including the inhibition of *S. aureus* biofilm formation and planktonic cells. The transcriptional profile of this pathogen treated with licochalcone A was evaluated by a microarray assay. Several genes had their expression significantly altered after licochalcone A treatment, especially those related to autolysis, cell wall, pathogenic factors, protein synthesis, and capsule synthesis (Shen et al., 2015).

Another example is a study carried out to evaluate the molecular effects triggered by lupulone (phenolic acid from *Humulus lupulus*) in *Mycobacterium tuberculosis*. The authors reported that 540 genes were found to be differentially regulated, which were involved in various pathways such as surface-exposed lipids, cytochrome P450 enzymes, PE/PPE multigene families, ABC transporters, and protein synthesis (Wei et al., 2014).

Pentacyclic triterpenoids (such as α -amyrin, betulinic acid, and betulinolaldehyde) are phytochemicals with recognized anti-*S. aureus* action. The transcriptional changes induced by sub-inhibitory doses of these three components in a methicillin-resistant *S. aureus* strain were analyzed by microarray, showing that they act by targeting pathways such as cell division (FtsZ), ABC transporters (OPP-1C), fatty acid (fabz), and peptidoglycan (fmhB, PBP2) biosynthesis, DNA replication (*ccrA*), two-component regulatory system, and β -lactam resistance (*mecR1*). The proposed MOA was the inhibition of cell growth by destabilization of the bacterial cell membrane combined with the cessation of protein and fatty acids synthesis (Chung et al., 2013).

Transcriptional analysis by microarrays and other gene probe-based methods are relatively inexpensive and compatible with high-throughput studies. However, these methods have some limitations, such as the availability of arrays for a particular species (the target species needs to have a sequenced genome), and technical issues including reproducibility. Specifically for bacterial studies (or for other highly variable genomes), another discovered issue is that the array is designed using genomic information of a wild type strain and cannot detect genes present only in a particular isolate (Wang et al., 2009; Bumgarner, 2013; Dopazo, 2014; Zhao et al., 2014). These factors together make sequence-based approaches an interesting alternative for measuring gene expression. These methods quantify gene expression directly through sequencing the cDNA produced from a fragment that maps transcript. The most recent sequence-based method, RNA sequencing (RNA-Seq), employs recently developed technologies, providing a deeper quantification of gene expression (Rapaport et al., 2013).

RNA-Seq studies have been performed to evaluate the MOA of some plant-derived products (**Table 1**). For example, this method was employed to analyze the molecular pathways involved in the action of ursolic acid and resveratrol against the biofilm produced by methicillin-resistant *S. aureus* (Qin et al., 2014). Ursolic acid is a pentacyclic triterpenoid found in numerous classes of medicinal plants (Kashyap et al., 2016). The anti-biofilm action of ursolic acid was found to be related to a reduction in the expression of genes involved in amino acid metabolism and adhesin expression (Qin et al., 2014). Conversely, resveratrol (a polyphenol found in red wine) was found to act through the inhibition of pathways related to quorum sensing, surface proteins, and capsular polysaccharides (Qin et al., 2014).

PROTEOMICS ASSAYS

Proteomics is the systematic evaluation of all proteins expressed by one particular cell, tissue, biological fluid, or organism in a

given time period. It is used to identify and quantify proteins involved in a particular biological condition, and can also be applied to determine post-translational modifications, as well as cellular origin and place of action (Yates et al., 2009). The first proteomic studies were performed using gels to separate proteins. In the most commonly applied technique, two-dimensional electrophoresis (2-DE), proteins are separated according to their isoelectric points and then separated by their molecular weights. Thus, maps are created for each sample, where each spot corresponds to a protein or a small protein group. Using these maps, different conditions can be studied and compared through differential protein expression (up or downregulated; Zhu et al., 2003). To increase sensitivity and reproducibility, 2DE assays using fluorescence have been developed (differential electrophoresis; DIGE). This technique is robust because it allows the simultaneous analysis of more than one condition (multiplex), excluding the necessity of experimental replicates, and because fluorophores can detect protein concentrations more precisely than traditional methods (Coomassie blue and silver nitrate; Vranakisa et al., 2013). Proteomic assays are also performed to characterize and quantify post-translational modifications (PTM), which are essential for a range of protein functions, including infectious processes (Olsen and Mann, 2013). PTMs are detected by enrichment techniques using affinity antibodies, ionic interaction, or by specific enzymes (Zhao and Jensen, 2009).

Indeed, proteomic approaches have not been adopted in abundance in the study of the antibacterial MOAs of plant-derived compounds. A few examples are summarized in **Table 1**. In a recent study, the effects of tea polyphenols (TP; a mix of polyphenols extracted from green tea with a broad spectrum of bacterial activity) on protein expression in *P. aeruginosa* and *Serratia marcescens* were investigated by 2-DE and MALDI-TOF/TOF analyses. The results confirmed that the metabolic disorder caused by treatment with TP was associated with an increase in the amount of membrane proteins, such as chaperones and key enzymes involved in the control of membrane component biosynthesis pathways. These data supported a possible MOA for TP: increased membrane permeability leading to release of cellular components (Yi et al., 2010, 2014).

Plumbagin (naphthoquinone) is a yellow natural compound extracted from the *Plumbago zeylanica* L. root, which is widely used in traditional medicine in India and China. The antibacterial effect of plumbagin on *Bacillus subtilis* was evaluated by two complementary proteomic techniques, 2-DE and iTRAQ, which identified differential expression for 230 proteins, mainly involved in the citric acid cycle and heme biosynthesis. These results indicated that plumbagin blocks energy generation and also suppresses fatty acid biosynthesis. Repression of proteins directly linked to cell division (FTSA and SpoVG) was also observed (Reddy et al., 2015). Another example is the elucidation of the MOA for the alkaloid roemerine from *Papaver rhoeas* against *E. coli*, which was related to the inhibition of membrane permeability and sugar transporter proteins (Gokgoz and Akbulut, 2015).

The MOA of rhodomirtone (isolated from *Rhodomyrtus tomentosa*) against methicillin-resistant *S. aureus* was also

studied by 2-DE analysis, which revealed that this compound affects the expression of major classes of proteins involved in cell wall biosynthesis, cell division, protein degradation, stress response, virulence factors, energy production, and macromolecules biosynthesis (Sianglum et al., 2011). Another similar work showed that rhodomirtone affected enzymes associated with major metabolic pathways of *Streptococcus pyogenes*, apart from its inhibitory actions on virulence genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cAMP, and streptococcal pyrogenic exotoxin C (Limsuwan et al., 2011). These works provided important insights into the antibacterial activity of this new natural compound, a promising candidate for a therapeutic agent against bacterial infections.

METABOLOMICS ANALYSES

The last “omics” technology to be presented in this review is metabolomics, which is defined as the study of the global profile of metabolites present in a biological system under certain conditions and time (Nambiar et al., 2010). “Metabolites” is a general term for a range of end products of cellular processes that belong to different classes, such as organic acids, amino acids, fatty acids, sugars, sugar alcohols, steroids, nucleic acid bases, etc. (Goodacre et al., 2004). Metabolomics analysis investigates biochemical disturbances caused by disease, drugs, toxins, and other factors such as genetic modification, etc. (Monteiro et al., 2013). The development of analytical and data mining methods is responsible for the quick evolution in the metabolomics field, providing more insights into cellular organization (Dunn et al., 2011). The methods followed to generate metabolic signatures are usually nuclear magnetic resonance (NMR), gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (LC/MS), capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-DM), ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC/MS), high-performance liquid chromatography-electrospray ionization coupled to mass spectrometry (HPLC-ESI/MS), high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC/DAD/ESI-MS; Zhang et al., 2012). Multivariate analysis of statistical data needs to be performed owing the complexity of interpreting the data resulting from an analysis based on the metabolome. Principal component analysis (PCA) is the most prevalent method followed to reduce the dimensionality of the data, although other data mining techniques are routinely applied, such as clustering algorithms. By PCA, the data obtained are structured in a two/three-dimensional scores plot where the clustering of samples is shown in either similar or different groupings (Cox et al., 2014).

Metabolomics approaches have been widely adopted to investigate the responses of microorganisms to various environmental stressors such as heavy metals, temperature, and organic compounds (Lankadurai et al., 2013), and they are suitable tools for the study of metabolism disorders in microorganisms treated with antibiotics (Aliferis and Jabaji, 2011). Conversely, the application of metabolomic approaches for the discovery of plant-derived compound mechanisms of action is still largely unexplored, with *S. aureus* the most

studied for this purpose (Table 1). In general, the metabolic profile induced by the tested compound is compared with those obtained using antibiotics with known action mechanisms. For example, the anti-*S. aureus* action of *Aquilegia oxysepala* extract (used in traditional Chinese medicine) and its main chemical components (genkwanin, apigenin, maguoflorine, and berberine) were investigated by metabolomics (HPLC/DAD/ESI-MS analysis combined with PCA) and compared with the profile induced by nine antibiotics with known modes of action. This study has shown that the *A. oxysepala* target should be similar to those of protein synthesis inhibitors (lincomensin, erythromycin, chloromycetin, streptomycin, and aceomycin), and maguoflorine was the main component responsible for antibacterial activity (Yu et al., 2007a). In this study, berberine showed the same effects as rifampicin and norfloxacin, which are drugs that target nucleic acids (Yu et al., 2007a).

Similarly, the intracellular metabolic profiles of *S. aureus* treated with rhizome extract from *Tinospora capillipes* and its main constituents (columbin, palmatine, tinoside, and jatrorrhizine) were studied by HPLC-ESI/MS, showing the inhibition of RNA polymerase, gyrase, and topoisomerase IV as targets (similar to rifampicin and norfloxacin). Palmatine and jatrorrhizine were the most active compounds (Yu et al., 2007b). However, these metabolomic strategies, which compare the metabolic profiles of phytochemicals with known antibiotics, may be somewhat limited because they cannot be applied to define a new mechanism of action, but are viable and unexplored alternatives to assign known mechanisms to new bioactive compounds.

An interesting approach to be explored is the study of the exometabolome (metabolites that are secreted into the culture medium). Birkenstock et al. (2012), applying an exometabolome profiling approach, revealed that triphenylbismuthdichloride affects bacterial pyruvate catabolism, leading to the discovery of this compound as an efficient and non-competitive inhibitor of the bacterial pyruvate dehydrogenase complex. This study illustrates that metabolomics may represent a promising strategy to elucidate the MOA of bioactive compounds, and for combating multidrug-resistant bacteria.

CONCLUSIONS

Taking into account all the possibilities provided by “omics” technologies, these approaches offer very exciting opportunities

to elucidate the antimicrobial mechanisms of plant-derived compounds. These studies are essential for the use of the most promising compounds as therapeutic agents, and they could also lead to the identification of new targets, owing to the high degree of structure diversity found in phytochemicals. As shown in Table 1, there is a diversity of pathways involved in the MOA of plant-derived antimicrobial compounds. The design of new antibiotics with different action modes and structures will be also driven by these studies, and thus cross-resistance events will be avoided and development of resistance to these novel compounds will be delayed. It is also expected that, upon knowledge of the molecular mechanism, only compounds that have targets unrelated to host factors will be selected. Nevertheless, some barriers still need to be overcome prior to the widespread popularization for “omics” approaches, such as operating cost, complexity, and the wide dynamic range of the samples, which are being solved by the constant improvements made in the field and in bioinformatics technology. An integrated study using different “omics” technologies would be the ideal approach to elucidate the MOA of a natural compound since each technique has particularities with respect to its limitations and the potential of providing responses.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BS, LD, MC, PP conceived of the study and participated in its design and coordination. MD and TD contributed in the Section “Proteomics assays.” JR and MG contributed in the Sections “Overview of some phenotypical methods used for elucidation of antibacterial action mechanisms” and “Génomics advances in antibiotics research.” BS, LD, TN drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE), and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) for the financial support to this study.

REFERENCES

- Aliferis, K. A., and Jabaji, S. (2011). Metabolomics – a robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: a review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 105–117. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.03.004
- Arias, C. A., and Murray, B. E. (2015). A new antibiotic and the evolution of resistance. *N. Engl. J. Med.* 372, 1168–1170. doi: 10.1056/NEJMcibr1500292
- Ayub, N. D., Fox, A. R., Garcia, A. N., Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Angeletti, M., et al. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 genome-wide mutant screen for resistance to the antimicrobial peptide alfa1a snakin-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–6. doi: 10.1093/femsle/fnu006
- Bachmann, B. O., Van Lanen, S. G., and Baltz, R. H. (2014). Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making?. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* 41, 175–184. doi: 10.1007/s10295-013-1389-9
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* 58, 325–334. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.07.018
- Birkenstock, T., Liebeke, M., Winstel, V., Krismer, B., Gekeler, C., Niemiec, M. J., et al. (2012). Exometabolome analysis identifies pyruvate dehydrogenase as a target for the antibiotic triphenylbismuthdichloride in multiresistant bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* 287, 2887–2895. doi: 10.1074/jbc.M111.288894
- Brazas, M. D., and Hancock, R. E. W. (2005). Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. *Drug Discov. Today* 10, 1245–1252. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03566-X

- Bumgarner, R. (2013). Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 101, 22.1.1–22.1.11. doi: 10.1002/0471142727.mb2201s101
- Chung, P. Y., Chung, L. Y., and Navaratnam, P. (2013). Transcriptional profiles of the response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to pentacyclic triterpenoids. *PLoS ONE* 8:e56687. doi: 10.1371/journal.pone.0056687
- Chusri, S., and Voravuthikunchai, S. P. (2009). Detailed studies on *Quercus infectoria* Olivier (nutgalls) as an alternative treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J. Appl. Microbiol.* 106, 89–96. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03979.x
- Cox, D. G., Oh, J., Keasling, A., Colson, K. L., and Hamann, M. T. (2014). The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 3460–3474. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.08.007
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., and Mauriello, G. (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics* 10, 1040–1049. doi: 10.1002/pmic.200900568
- Dopazo, J. (2014). Genomics and transcriptomics in drug discovery. *Drug Discov. Today* 19, 126–132. doi: 10.1016/j.drudis.2013.06.003
- Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R., and Griffin, J. L. (2011). Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* 40, 387–426. doi: 10.1039/B906712B
- Dwyer, D. J., Collins, J. J., and Walker, G. C. (2015). Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, 313–332. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124712
- Eng, S. A., and Nathan, S. (2015). Curcumin rescues *Caenorhabditis elegans* from a *Burkholderia pseudomallei* infection. *Front. Microbiol.* 6:290. doi: 10.3389/fmicb.2015.00290
- Feng, H., Xiang, H., Zhang, J., Liu, G., Guo, N., Wang, X., et al. (2009). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to Cryptotanshinone. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009:617509. doi: 10.1155/2009/617509
- Fu, H., Liu, L. G., Peng, J. P., Leng, W. C., Yang, J., and Jin, Q. (2010). Transcriptional profile of the *Shigella flexneri* response to an alkaloid: berberine. *FEMS Microbiol. Lett.* 303, 169–175. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01872.x
- Gerits, E., Blommaert, E., Lippell, A., O'Neill, A. J., Weytjens, B., De Maeyer, D., et al. (2016). Elucidation of the mode of action of a new antibacterial compound active against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 11:e0155139. doi: 10.1371/journal.pone.0155139
- Gokgoz, N. B., and Akbulut, B. S. (2015). Proteomics evidence for the activity of the putative antibacterial plant alkaloid (-)-roemerine: mainstreaming omics-guided drug discovery. *Omics* 19, 478–489. doi: 10.1089/omi.2015.0056
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., and Kell, D. B. (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 22, 245–252. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.03.007
- Gottschalk, S., Ifrah, D., Lerche, S., Gottlieb, C. T., Cohn, M. T., Hiasa, H., et al. (2013). The antimicrobial lysine-peptoid hybrid LP5 inhibits DNA replication and induces the SOS response in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 13:192. doi: 10.1186/1471-2180-13-192
- Gray, A. N., Koo, B., Shiver, A. L., Peters, J. M., Osadnik, H., and Gross, C. A. (2015). High-throughput bacterial functional genomics in the sequencing era. *Curr. Opin. Microbiol.* 27, 86–95. doi: 10.1016/j.mib.2015.07.012
- Hammami, R., and Fliss, I. (2010). Current trends in antimicrobial agent research: chemo- and bioinformatics approaches. *Drug Discov. Today* 15, 540–546. doi: 10.1016/j.drudis.2010.05.002
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., and Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 111–129. doi: 10.1038/nrd4510
- Hylgaard, M., Mygind, T., Piotrowska, R., Foss, M., and Meyer, R. L. (2015). Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Front. Microbiol.* 6:754. doi: 10.3389/fmicb.2015.00754
- Karaosmanoglu, K., Sayar, N. A., Kurnaz, I. A., and Akbulut, B. S. (2014). Assessment of Berberine as a multi-target antimicrobial: a multi-omics study for drug discovery and repositioning. *Omics* 18, 42–53. doi: 10.1089/omi.2013.0100
- Kashyap, D., Tuli, H. S., and Sharma, A. K. (2016). Ursolic acid (UA): a metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* 146, 201–213. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.017
- Kjelstrup, S., Hansen, P. M. P., Thomsen, L. E., Hansen, P. R., and Lobner-Olesen, A. (2013). Cyclic peptide inhibitors of the β -sliding clamp in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 8:e72273. doi: 10.1371/journal.pone.0072273
- Kon, K. V., and Rai, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 775–790. doi: 10.1586/eri.12.57
- Köser, C. U., Ellington, M. J., and Peacock, S. J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet.* 30, 401–407. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.003
- Lankadurai, B. P., Nagato, E. G., and Simpson, M. J. (2013). Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environ. Rev.* 21, 180–205. doi: 10.1139/er-2013-0011
- Liang, J., Zeng, F., Guo, A., Liu, L., Guo, N., Li, L., et al. (2011). Microarray analysis of the chelerythrine-induced transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 62, 1200–1208. doi: 10.1007/s00284-010-9837-5
- Limsuwan, S., Hesselting-Meinders, A., Voravuthikunchai, S. P., Dijk, J. M. V., and Kayser, O. (2011). Potential antibiotic and anti-infective effects of rhodomirtone from *Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk on *Streptococcus pyogenes* as revealed by proteomics. *Phytomedicine* 18, 934–940. doi: 10.1016/j.phymed.2011.02.007
- Lin, Y. L., Chen, Y. S., Hsu, Y. M., Yao, C. H., and Chang, T. J. (2012). Proteomic analysis and antibacterial effects of *Lithospermum radix* against common bacteria from human infected wounds. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.* 24, 37–45. doi: 10.1142/S1016237212002937
- Liu, G., Xiang, H., Tang, X., Zhang, K., Wu, X., Wang, X., et al. (2011). Transcriptional and functional analysis shows sodium houttuyniate-mediated inhibition of autolysis in *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 16, 8848–8865. doi: 10.3390/molecules16108848
- Magi, G., Marini, E., and Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.* 6:165. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165
- Monte, D. F., Tavares, A. G., Albuquerque, A. R., Sampaio, F. C., Oliveira, T. C., Franco, O. L., et al. (2014). Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. *Front. Microbiol.* 5:721. doi: 10.3389/fmicb.2014.00721
- Monteiro, M. S., Carvalho, M., Bastos, M. L., and Pinho, P. G. (2013). Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Curr. Med. Chem.* 20, 257–271. doi: 10.2174/092986713804806621
- Moreira, W., Aziz, D. B., and Dick, T. (2016). Boromycin kills mycobacterial persists without detectable resistance. *Front. Microbiol.* 7:199. doi: 10.3389/fmicb.2016.00199
- Morita, Y., Nakashima, K., Nishino, K., Kotani, K., Tomida, J., Inoue, M., et al. (2016). Berberine is a novel type efflux inhibitor which attenuates the MexXY-mediated aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 7:1223. doi: 10.3389/fmicb.2016.01223
- Muthaiyan, A., Martin, E. M., Natesan, S., Crandall, P. G., Wilkinson, B. J., and Riche, S. C. (2012). Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1020–1033. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05270.x
- Nagaraj, N. S., and Singh, O. V. (2010). Using genomics to develop novel antibacterial therapeutics. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 340–348. doi: 10.3109/1040841X.2010.495941
- Nambiar, P. R., Gupta, R. R., and Misra, V. (2010). An “Omics” based survey of human colon cancer. *Mutat. Res.* 693, 3–18. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.07.008
- Nijman, S. M. (2015). Functional genomics to uncover drug mechanism of action. *Nat. Chem. Biol.* 11, 942–948. doi: 10.1038/nchembio.1963
- Olsen, J. V., and Mann, M. (2013). Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 3444–3452. doi: 10.1074/mcp.O113.034181
- Ozbalci, Ç., Unsal, Ç., Kazan, D., and Sariyar-Akbulut, B. (2010). Proteomic response of *Escherichia coli* to the alkaloid extract of *Papaver polychaetum*. *Ann. Microbiol.* 60, 709–717. doi: 10.1007/s13213-010-0118-0

ARTIGO 2 - ANTI-STAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF *Syagrus coronata* ESSENTIAL OIL: BIOFILM ERADICATION AND IN VIVO ACTION ON *Galleria mellonella* INFECTION MODEL

Bruno Souza dos Santos^a, Clóvis Macedo Bezerra Filho^a, José Adelson Alves do Nascimento Junior^a, Flávia Roberta Brust^b, Patrícia Cristina Bezerra-Silva^c, Suyana Karoline Lino da Rocha^c, Karen Angeliki Krogfelt^d, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^c; Maria Tereza dos Santos Correia^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Luís Claudio Nascimento da Silva^e, Alexandre José Macedo^b, Márcia Vanusa da Silva^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^c*Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^d*State Serum Institute, Denmark*

^e*Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade CEUMA, Maranhão, Brazil.*

Artigo submetido a revista Microbial Pathogenesis (Fator de impacto 2017: 2.332)

*Corresponding author. E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

In this study, essential oil extracted from *Syagrus coronata* seeds (SCEO) was evaluated for antibacterial and antibiofilm activities against *Staphylococcus aureus*; and *Galleria mellonella* model was used as an *in vivo* infection model. SCEO was mainly composed by fatty acids (89.79%) and sesquiterpenes (8.5%). The major components were octanoic acid, dodecanoic acid, decanoic acid and γ -eudesmol. SCEO showed bactericidal activity (minimal bactericidal concentration from 312 to 1250 $\mu\text{g/mL}$) against all tested *S. aureus* clinical isolates, including those with biofilm-forming and multiple drug resistance phenotypes. SCEO weakly reduced biomass but remarkably decrease cell viability in pre-formed biofilms of isolate UFPEDA-02. The electronic microscopy analysis showed that SCEO treatments decreased the number of cells (causing structural alterations) and lead to loss of the roughness in the multiple layers of the three-dimensional structure of bacterial biofilm. In addition, the overproduction of exopolymeric matrix was observed. SCEO at 31.2 mg/kg improved the survival of *G. mellonella* larvae inoculated with UFPEDA-02 isolate as well as reduced bacterial load in hemolymph and melanization. In conclusion, SCEO is an antibacterial agent against *S. aureus* strains with different resistance phenotypes and able to disturb biofilm architecture. Our results show SCEO as a potential candidate to drug development.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; antibiofilm; antibacterial activity; volatile oil.

1. Introduction

Antimicrobial resistance is one of the most serious public health problems, especially in developing countries where infectious diseases still represent a major cause of human mortality (Ventola, 2015). *Staphylococcus aureus* is highlighted as one of the major human pathogens due its high ability to produce virulence factors that mediate evasion of immune system and host tissue damage (Paharik and Horswill, 2016; Guerra et al., 2017; Pietrocola et al., 2017)..

Diseases caused by *S. aureus* involve skin infections (boils, folliculitis, and abscesses) and diseases with greater severity such as pneumonia, meningitis, osteomyelitis, endocarditis, bacteremia and sepsis (Cosimi et al., 2017; van Wamel, 2017). In addition, the widespread and indiscriminate use of antibiotics has caused selective pressure for the development of resistant strains, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and other multidrug resistant phenotypes. MRSA is associated with high rates of morbidity and mortality, as well as longer periods of hospital stay (Cosimi et al., 2017; Haaber et al., 2017; van Wamel, 2017).

As other bacteria, *S. aureus* often survive by adhering to surfaces where they form complex structures called biofilms (Paharik and Horswill, 2016). Biofilms are conglomerates of bacterial cells protected by self-synthesized extracellular polysaccharide matrices. Bacterial biofilm formation is one of the most common causes of persistent infection and represents a major health problem, as it plays an important role in nosocomial infections in internal medical devices such as implanted catheters, artificial heart valves, or bone and joint prostheses (Figueiredo et al., 2017; Moormeier and Bayles, 2017). The ability of *S. aureus* to form biofilms in implanted medical devices is an important virulence factor for this pathogen (McCarthy et al., 2015). Biofilm producer strains usually exhibit increased resistance to

antibiotics and are responsible for persistent infections (McCarthy et al., 2015; Figueiredo et al., 2017).

The failure of antibiotics currently used for the treatment of infections caused by multidrug resistant microorganisms has driven the search for new compounds and alternative treatments, particularly, those involving plant-derived products such as essential oils, flavonoids and other secondary metabolites (Santos et al., 2016; Swamy et al., 2016; Silva et al., 2017). Essential oils are mixtures of odoriferous and volatile compounds that have been widely reported as antimicrobial agents (Islam et al., 2016; Swamy et al., 2016). One example of essential oil bearing plant is *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae, Arecoideae), popularly known as “licuri” or “ouricuri” (Belviso et al., 2013; Bessa et al., 2016).

Syagrus coronata has been used in a number of applications in folk medicine including snakebite, ocular inflammation, mycoses, wound healing, and spinal pain treatment (Andrade et al., 2015). Various biological activities have been reported for *S. coronata* seed oil, including antibacterial and insecticidal properties (Bessa et al., 2016; Santos et al., 2017). In addition, it has shown moisturizing property (Leal et al., 2013).

Galleria mellonella larvae (waxmoth) is an alternative model that has attracted attention due the methodological simplicity and reliability in the evaluation of infections caused by different human pathogens, discovery of new virulence genes, as well as the evaluation of toxicity and efficacy of antimicrobial agents (Ferro et al., 2016; Jonsson et al., 2016; Astvad et al., 2017).

In the present study, *S. coronata* seed essential oil (SCEO) was evaluated for antibiotic and antibiofilm activity against *S. aureus* and *Galleria mellonella* model was used as an *in vivo* infection model.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Seeds of *S. coronata* were collected at the Catimbau National Park region (PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brazil - 8° 30' 57" S, 37° 20' 59" W) in December 2015. They were dried at 30 °C in an open and airy area for three weeks. The taxonomic identification of the plant was performed by Dr. Alexandre Gomes da Silva in the herbarium of the *Instituto Agrônômico de Pernambuco* (IPA). The voucher specimen was deposited under the number 86,950.

2.2. Extraction of *S. coronata* essential oil (SCEO)

The dried seeds (200 g) were powdered and essential oil was obtained by hydrodistillation method for 4 h in a modified Clevenger-type apparatus. The SCEO layer was separated from the hydrolate (aqueous layer), dried over anhydrous sodium sulfate, and stored in a hermetically sealed amber-glass vial at -20 °C until required for analysis. The percentage yield of essential oil was taken as the quotient of the weight of obtained oil divided by weight of the seeds. The whole procedure was repeated 3 times.

2.3. Gas chromatographic (GC) analyses

SCEO was esterified by acid catalysis with boron trifluoride (BF₃) (Lima et al., 2013). GC was performed using a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace GC Ultra gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), a split/splitless injector and a Hamilton Bonaduz (Bonaduz Switzerland) HB-5 fused silica capillary column (30 m ×

0.25 mm; film thickness 0.25 μm). The oven temperature was held at 40 °C for 2 min and then increased at 4 °C/min to 230 °C. The injector and detector were both maintained at 250 °C, and the essential oil solution and esterified fractions were injected in the splitless mode. Each analysis was carried out in triplicate.

GC coupled to mass spectrometry (GC-MS) was carried out using an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) series 5975C quadrupole analyzer equipped with an Agilent J & W nonpolar DB-5 fused silica capillary column (60 m x 0.25 μm i.d.; film thickness 0.25 μm). The oven temperature was held at 60 °C for 3 min, then increased at 2.5 °C/min to 240 °C and subsequently held for 10 min. The helium carrier gas flow was maintained with a constant pressure of 100 kPa, and the injector was operated at 250 °C in the split mode (1:20). The detector temperature was 280 °C, the ionization potential was 70 eV, and mass spectra were scanned in the range 20-350 m/z at a rate of 0.5 scans/s (Autran et al., 2009).

Individual components of SCEO were initially identified according their Retention Indices (RI), obtained by co-injection of oil samples and C₈-C₃₀ n-alkanes, calculated according to the equation of van Den Dool and Kratz (1963) and compared with the literature (Adams, 2007). The acquired mass spectra were matched with those stored in the library of the GC-MS system (MassFinder 4 comprising NIST08 MS Library and Wiley Registry of Mass Spectral Data, 9th Edition) and with other published data. The composition of essential oil was expressed in the form of percentages of total peak area as recorded by GC-FID.

2.4. Phenotypic characterization of S. aureus strains

2.4.1. Antibiotic susceptibility profile

Twenty *S. aureus* clinical isolates (Table 2) were obtained from the Collection of Microorganisms of the *Departamento de Antibióticos* of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPEDA), Brazil. *S. aureus* clinical isolates susceptibility was determined according to Kirby Bauer's disk diffusion technique (Bauer et al., 1966) using the antibiotics: ampicillin, oxacillin, cephalothin, cefazolin, cefepime, ceftazidime, cefuroxime, imipenem, meropenem, nalidixic acid, ciprofloxacin, nitrofurantoin, amikacin, gentamicin, vancomycin, clindamycin, chloramphenicol, tetracycline, and trimethoprim. Antibiotics susceptibility was interpreted according the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

The multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated using the formula $MAR = x/y$, where x is the number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance and y is the total number of antibiotics tested (Krumperman, 1983).

2.4.2. Evaluation of *S. aureus* biofilm formation

Biofilm formation was evaluated and quantified using crystal violet assay (Stepanovic et al., 2007). Briefly, biofilm was formed adding 20 μ L of the bacterial suspension (1.5×10^8 CFU/mL), 20 μ L of Milli-Q water and 160 μ L of brain heart infusion broth (BHI) in each well of a microtiter plate. After 24 h of incubation at 37 °C, the non-adherent cells were removed, and the biofilm was washed three times with saline solution (0.9% NaCl). Biofilms were heat-fixed at 60 °C for 1 h and then stained with 0.4% (w/v) crystal violet for 15 min at 30 °C. Finally, the plate was washed four times with water and the biofilm was resuspended with ethanol for 30 min. The optical density (OD) was measured at 570 nm. The biofilm production was classified according to Stepanovic et al. (2007).

2.5. Determination of minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations

Minimum inhibitory concentration and MBC were determined by broth microdilution method (De Oliveira et al., 2012). Initially, overnight bacterial culture was prepared on Mueller Hinton Agar (MHA) plates, after the incubation bacterial suspension at 1.5×10^8 CFU/mL was prepared in saline solution (0.9% NaCl). SCEO (0.039 – 10.000 $\mu\text{g/mL}$) was serially diluted in microplates containing Mueller Hinton Broth (MHB). Each well received 10 μL of bacterial suspension, except the wells used as negative growth control. The plates were incubated at 37 °C and, after 24 h, wells received 20 μL of 0.01% (w/v) resazurin solution to follow bacterial growth (i.e. change of blue to pink color). After 2-h incubation, the MIC was defined as the lowest SCEO concentration that inhibited bacterial growth. Subsequent, suspension from wells where bacterial growth was not detected were transferred to MHA plates and incubated for 24 h. MBC was determined as the lowest SCEO concentration able to prevent bacterial growth.

2.6 Biofilm eradication assays: Quantification of biofilm biomass and Viability of biofilm cells

The biofilm eradication ability of SCEO was evaluated using crystal violet method (Zimmer et al., 2013). For this assay, the *S. aureus* UFPEDA-02 strain was selected due to its source (wound) and high biofilm production ability. The biofilm was formed according previously described and, after 24 h of incubation at 37 °C, planktonic cells were removed and the SCEO diluted in BHI broth was added at different concentrations (156, 312, 624 and 1,248 $\mu\text{g/mL}$). The plate was incubated again at 37 °C and after 24 h the wells were washed three times with saline solution (0.9% NaCl). Adherent biofilms were heat-fixed at 60 °C for 1 h and then

stained with 0.4% (w/v) crystal violet for 15 min at 30 °C. Finally, the plate was washed four times with water and the stained biofilm was solubilized in ethanol for 30 min. The absorbance (570 nm) was measured. Vancomycin (1 µg/mL) was used as antibiotic control.

The viability of cells within biofilms exposed SCEO was assessed using MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay (Mosmann, 1983). Biofilms were grown as described above and, after 24 h, it was exposed to the SCEO (156, 312, 624 and 1,248 µg/mL). After the incubation period, the content of wells was removed and the remaining biofilm was washed two times with saline. MTT solution at 0.3 mg/mL (200 µL) was added to each well and incubated for 90 min at 37 °C. MTT was removed and the wells were washed once with saline. Then, purple formazan crystals were dissolved with 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) for 20 min and then the absorbance at 540 nm was measured. Vancomycin (1 µg/mL) was used as positive control.

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Biofilm was grown and treated with SCEO (312 and 624 µg/mL) in 96-wells microtiter plates containing a piece of Permanox™ slide in each well (Nalge Nunc International, USA). After 48 h of incubation at 37 °C, the slide pieces were fixed and stored in 2.5% (v/v) glutaraldehyde at -20 °C until microscopy analysis. The samples were washed with 100 mM cacodylate buffer pH 7.2, and dehydrated in increasing concentrations of acetone. The slides were dried by the CO₂ critical point technique (CPD 030 Balzers, Liechtenstein), fixed on aluminum stubs, covered with gold film and examined in a JEOL JSM-6060 microscope (Trentin et al., 2011). Vancomycin (1 µg/mL) was used as antibiotic control.

2.8. *In vivo* assays using *Galleria mellonella*

2.8.1. Survival assay

Galleria mellonella larvae (200 mg) were randomly distributed in groups ($n = 10/\text{group}$), and infected with 10 μL of *S. aureus* UFPEDA-02 suspension (1.0×10^5 CFU/larvae) injected into the last left proleg. After 2 h incubation at 37 °C, larvae received a single dose of *S. coronata* essential oil (15.6 mg/kg or 31.2 mg/kg) and the plates were re-incubated at 37 °C. The amount of essential oil administered to individual larvae was determined by larval weight and MIC results from the *in vitro* assay, further to approaching similar doses to doses of antibiotics applied in humans. Larvae infected with *S. aureus* and inoculated with vehicle (PBS) were used as positive control, while uninfected larvae also treated with vehicle were taken as negative control. Mortality rates of each group were observed daily during 5 days.

2.8.2. Early melanization assay

The effect of SCEO in the production of melanin induced by *S. aureus* infection was measured as previously described by Scorzoni et al. (2013) with modifications. The larvae ($n=10/\text{group}$) were infected with *S. aureus* (1.0×10^6 CFU/larva) and immediately treated with SCEO (15.6 or 31.2 mg/kg). Larvae infected and treated with vehicle (PBS) were used as positive control while larvae inoculated only with vehicle were the negative group. After 1 h and 3 h of incubation, the hemolymph of four larvae from each group was collected by cutting them with a scalpel blade through the cephalocaudal direction and squeezing. The obtained

hemolymph was diluted in cold PBS and the absorbance read at 405 nm. Melanin production was detected by measuring the absorbance at 405 nm.

2.8.3. Bacterial load in hemolymph

To evaluate the effect of SCEO in bacterial load in hemolymph, the larvae ($n = 10/\text{group}$) were infected with *S. aureus* (1.0×10^5 CFU) and treated with essential oil (31.2 mg/kg) as described for survival assay. The hemolymph of five larvae was collected daily for 3 days, serially diluted in PBS and 4 μL of each dilution was plated on MHA. After incubation for 24 h at 37 °C, the number of colony forming units (CFU) per millilitre (mL) was determined.

2.9. Statistical analysis

All assays were performed in triplicate in at least two independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA). All analyses were carried out using GraphPrism, version 7. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Differences in the survival of *G. mellonella* larvae were determined using the Kaplan-Meier method and log-rank test was used to compare survival curves.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition of SCEO

The hydrodistillation of *S. coronata* seeds allowed to obtain the essential oil with yield of $0.41 \pm 0.1\%$. The SCEO components detected by GC/MS and GC/FID are presented in Table 1. A total of 11 volatile constituents were identified, corresponding to 98.63% of the total oil, being most of them fatty acids (89.79%) and sesquiterpenes (8.5%). The most abundant components were octanoic acid, dodecanoic acid, decanoic acid and γ -eudesmol. Previous studies have reported that *S. coronata* oils are dominated by free carboxylic acids, accounting for approximately 80% of the total composition, and octanoic acid has been reported as the major volatile component of *S. coronata* oil (Belviso et al., 2013; Bessa et al., 2016; Santos et al., 2017).

3.2. Phenotypic characteristics of *S. aureus* isolates

The twenty *S. aureus* clinical isolates were from several sources such as catheter tip, purulent exudate, bone fragment, surgical wound and human injury (Table 2). The results showed that 13 strains were resistant to cefoxitin and classified as MRSA (Kumar et al., 2013). The MRSA strains exhibited higher MAR indexes compared to the methicillin-sensitive strains (MSSA), as shown in Table 3. In fact, 11 MRSA clinical isolates were multidrug resistant as they showed resistance to at least 3 classes of antibiotics while 3 MSSA were multidrug resistant strains (Table 3). Crystal violet assay revealed that 13 clinical isolates were strong biofilm producers, 6 strains were moderate biofilm producers, while one strain was a weak biofilm producer (Table 2).

3.3. SCEO is a bactericide agent against *S. aureus*

SCEO showed antimicrobial efficacy against all selected strains of *S. aureus*, including those with biofilm-forming and multiple drug resistance phenotypes. The MIC values for the oil ranged from 156 µg/mL to 625 µg/mL (Table 3). The MBC values were equal to or 2-fold higher than each respective MIC, ranging from 312 to 1250 µg/mL, indicating the bactericidal effect of the oil. Essential oils from plants such *Caryophyllus aromaticus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia uniflora*, *Rosmarinus officinalis*, *Vernonia polyanthes*, and *Baccharis dracunculifolia* have been shown to be effective against clinical isolates of *S. aureus*, with MIC ranging from 0.25 to 56mg/mL for MRSA and 0.25 to 50.8 mg/mL for MSSA (Barbosa et al., 2015).

The main constituents of SCEO are medium chain fatty acids, which have previously been identified as bioactive components against bacteria and yeasts, tending to be more active against gram-positive bacteria than gram-negative (Desbois and Smith, 2010; Sternkopf Lillebaek et al., 2017). For example, the octanoic acid, the major component of SCEO, has antibacterial properties against a range of gram-positive and gram-negative pathogens; dodecanoic and decanoic acids have been also reported as antimicrobial agents (Hulankova et al., 2013; Kim and Rhee, 2015).

3.4. SCEO eradicates *S. aureus* biofilm

The effect of SCEO on the biomass and viability of preformed biofilm was evaluated using the strong biofilm producer strain UFPEDA 02. SCEO showed a slightly effect on biofilm biomass; significant reduction was observed only with 312 and 624 µg/mL concentrations (Figure 1). These findings were similar to vancomycin results, used as antibiotic control. On the other hand, SCEO was able to significantly decrease biofilm cell viability at all tested concentrations. Bacterial cell viability decreased more than 50% when

the biofilm was submitted to the lowest concentration (156 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to $0.5\times\text{MIC}$), while minimal viability was detected when the biofilms were exposed to the highest concentrations (624 and 1,248 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to $2\times\text{MIC}$ and $4\times\text{MIC}$) (Figure 1).

Figure 1 also shows that vancomycin showed low effect against the bacteria within the biofilm. The planktonic bacterial susceptibility to antibiotics may not correspond to a good prediction for bacteria associated with biofilm. This may represent a key point in the failure of antimicrobial treatment in the clinical routine as well as in the evaluation and development of potency antimicrobial agents (Claessens et al., 2015; Ozturk et al., 2016).

The SEM analysis revealed untreated *S. aureus* biofilm as aggregates composed by cells with preserved structure (Figure 2A). No remarkable alterations were observed in biofilm treated with vancomycin (Figure 2B). SCEO treatments with MIC, 312 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2C), and supra-MIC, 624 $\mu\text{g/mL}$ concentrations (Figure 2D), decreased the number of cells in biofilms and lead to loss of the roughness in the multiple layers of the three-dimensional structure of bacterial biofilm. The biofilm architecture was also affected by SCEO showing flat form and more homogeneity. SCEO at 312 $\mu\text{g/mL}$ caused alteration in the cellular structure of *S. aureus* (Figure 2C), which may be related to the bactericidal action of the oil. Another effect induced by SCEO in *S. aureus* biofilms was the overproduction of exopolymeric matrix (Figure 2D), which can be a protective mechanism against the aggression caused by the natural product (Trentin et al., 2011). The maintenance of the three-dimensional matrix architecture (with dense areas, pores and channels) is crucial to determine the way of life in biofilm due to its influence on factors such as diffusion of nutrients, oxygen, residual products, motility (Flemming and Wingender, 2010; Flemming et al., 2016). The biofilm eradication ability of the major components of SCEO was already reported. Hogan et al. (2016) demonstrated that application of ML: 8, an emulsion based on octanoic acid,

reduced *S. aureus* biofilm viability in more than 97% after 24 h treatment *in vitro*. Hess et al. (2015) showed that dodecanoic acid was also able to reduce the viability of biofilm cells of *S. aureus*, however, it did not reduce the biofilm biomass.

3.5. SCEO reduces the deleterious effects of *S. aureus* infection in *G. mellonella*

The inoculation SCEO at 15.6 mg/kg or 31.2 mg/kg did not change the survival rate of *G. mellonella* larvae. In addition, *G. mellonella* larvae exposed to SCEO developed the pupal stage in the same time period than untreated larvae. These data show that SCEO showed no toxicity.

The inoculation of *S. aureus* UFPEDA-02 reduced the survival rate of *G. mellonella* larvae, resulting in the death of all larvae in 3 days. This effect was reduced with a single SCEO dose of 31.2 mg/kg, which resulted in survival rate of 60% in 4 days after infection. The mortality rate at dose of 15.6 mg/kg was similar to that of the untreated group (Figure 3A). Aiming to investigate if the mortality rate was related to antibacterial activity of SCEO, the bacterial survival in hemolymph was evaluated. The hemolymph of larvae infected with *S. aureus* exhibited increased levels of bacterial load, approximately, 6, 8, and 9 log CFU/mL in 1st, 2nd, and 3rd days post-infection, respectively. These values were reduced in treatment with SCEO at 31.2 mg/kg to 4, 5, and 5 log CFU/mL 1, 2, and 3 days post-infection, respectively (Figure 3B).

We also analyzed the effect of SCEO at 31.2 mg/kg in melanin production, employing a model of acute infection by inoculating the larvae with a high-density inoculum. Melanogenesis is an essential component of *G. mellonella* immune response against microbial infection (Zdybicka-Barabas et al., 2014). However, the overproduction of this pigment has been associated to death induced by microorganisms (Ciesielczuk et al., 2015). The melanin

in hemolymph significantly increased after 1 and 3 h of infection with *S. aureus* and SCEO was able to reduce larvae melanization induced by *S. aureus* infection in both periods (Figure 3C). These results corroborate with the benefic effects of this oil in infected larvae.

4. Conclusion

This work demonstrated that SCEO is an antibacterial agent against *S. aureus* strains with different resistance phenotypes and that its ability in disturbing biofilm architecture is probably associated to the decrease of viability of cells inside the biofilm. *In vivo* antibacterial activity of SCEO against *S. aureus* improved survival of *G. mellonella* larvae and this fact indicates SCEO as a potential candidate to drug development for treatment of *S. aureus* infections.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants (446902/2014-4) and fellowships (MTSC, AJM, THN and PMGP). They are also grateful to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS PRONEM 16/2551-0000244-4), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; AUXPE 1454/2013) for financial support and fellowship. BSS would like to thank FACEPE for graduate scholarship (IBPG-0775-2.08/13). We are grateful to technical assistance from the CMM/UFRGS in the microscopies.

References

- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream, USA: Allured Publishing.
- Andrade, W.M.D., Ramos, M.A., Souto, W.M.S., Bento-Silva, J.S., Albuquerque, U.P.D., and Araújo, E.D.L. (2015). Knowledge, Uses and Practices of the Licuri Palm (*Syagrus Coronata* (Mart.) Becc.) around Protected Areas in Northeastern Brazil Holding the Endangered Species Lear's Macaw (*Anodorhynchus Leri*). *Tropical Conservation Science* 8, 893-911.
- Astvad, K.M.T., Meletiadis, J., Whalley, S., and Arendrup, M.C. (2017). Fluconazole Pharmacokinetics in the *Galleria mellonella* Larvae and performance evaluation of a Bioassay compared to LC-MS/MS for haemolymph specimens. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Autran, E.S., Neves, I.A., Da Silva, C.S., Santos, G.K., Da Camara, C.A., and Navarro, D.M. (2009). Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresour Technol* 100, 2284-2288.
- Barbosa, L.N., Probst Ida, S., Andrade, B.F., Alves, F.C., Albano, M., Da Cunha Mde, L., Doyama, J.T., Rall, V.L., and Fernandes Junior, A. (2015). In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. *J Oleo Sci* 64, 289-298.
- Bauer AW, Kirby MDK, Sherries JC, Truck, M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
- Belviso, S., Ghirardello, D., M. Giordano, Ribeiro, G.S., Alves, J.S., Parodi, S., Risso, S., and Zeppa, G. (2013). Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds

- of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. *Food Research International* 51, 39-45.
- Bessa, C.M.a.S., Nascimento, R.S.D., Alves, R.C.C., Anselmo, J.M., A. P. S. Da Silva, Silva, A.G.D., Lima, V.L.M., Tavares, J.F., L. C. N. Da Silva, Silva, M.V.D., and Correia, M.T.S. (2016). *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 10, 310-317.
- Ciesielczuk, H., Betts, J., Phee, L., Doumith, M., Hope, R., Woodford, N., and Wareham, D.W. (2015). Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence* 6, 145-151.
- Claessens, J., Roriz, M., Merckx, R., Baatsen, P., Van Mellaert, L., and Van Eldere, J. (2015). Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 45, 368-375.
- CLSI (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cosimi, R.A., Beik, N., Kubiak, D.W., and Johnson, J.A. (2017). Ceftaroline for Severe Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review. *Open Forum Infect Dis* 4, ofx084.
- Da Silva, L.C., Da Silva, M.V., and Correia, M.T. (2017). Editorial: New Frontiers in the Search of Antimicrobials Agents from Natural Products. *Front Microbiol* 8, 210.
- Desbois, A.P., and Smith, V.J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1629-1642.
- Dos Santos, B.S., Da Silva, L.C., Da Silva, T.D., Rodrigues, J.F., Grisotto, M.A., Correia, M.T., Napoleao, T.H., Da Silva, M.V., and Paiva, P.M. (2016). Application of Omics

- Technologies for Evaluation of Antibacterial Mechanisms of Action of Plant-Derived Products. *Front Microbiol* 7, 1466.
- Ferro, T.A., Araujo, J.M., Dos Santos Pinto, B.L., Dos Santos, J.S., Souza, E.B., Da Silva, B.L., Colares, V.L., Novais, T.M., Filho, C.M., Struve, C., Calixto, J.B., Monteiro-Neto, V., Da Silva, L.C., and Fernandes, E.S. (2016). Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol* 7, 2052.
- Figueiredo, A.M.S., Ferreira, F.A., Beltrame, C.O., and Cortes, M.F. (2017). The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit Rev Microbiol* 43, 602-620.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563-575.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., and Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42, 872-874.
- Guerra, F.E., Borgogna, T.R., Patel, D.M., Sward, E.W., and Voyich, J.M. (2017). Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 286.
- Haaber, J., Penades, J.R., and Ingmer, H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*.
- Hess, D.J., Henry-Stanley, M.J., and Wells, C.L. (2015). The Natural Surfactant Glycerol Monolaurate Significantly Reduces Development of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Surg Infect (Larchmt)* 16, 538-542.

- Hogan, S., Zapotoczna, M., Stevens, N.T., Humphreys, H., O'gara, J.P., and O'Neill, E. (2016). Eradication of *Staphylococcus aureus* Catheter-Related Biofilm Infections Using ML:8 and Citrox. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 5968-5975.
- Hulankova, R., Borilova, G., and Steinhauserova, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Sci* 95, 190-194.
- Islam, M.T., Da Mata, A.M., De Aguiar, R.P., Paz, M.F., De Alencar, M.V., Ferreira, P.M., and De Carvalho Melo-Cavalcante, A.A. (2016). Therapeutic Potential of Essential Oils Focusing on Diterpenes. *Phytother Res* 30, 1420-1444.
- Jonsson, R., Struve, C., Jenssen, H., and Krogfelt, K.A. (2016). The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enterotoxigenic *Escherichia coli* pathogenesis. *Virulence*, 1-6.
- Kim, S.A., and Rhee, M.S. (2015). Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with citric acid against both *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food Microbiol* 49, 166-172.
- Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46, 165-170.
- Kumar, V.A., Steffy, K., Chatterjee, M., Sugumar, M., Dinesh, K.R., Manoharan, A., Karim, S., and Biswas, R. (2013). Detection of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates by use of chromogenic medium MRSA ID. *J Clin Microbiol* 51, 318-319.
- Leal LB, Sousa GD, Seixas KB, Souza PHND, Santana DPD (2013). Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: Application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. *Braz. J. Pharm. Sci.* 49:167-173.

- Lima, L.C.D., Navarro, D.M., and Souza-Santos, L.P. (2013). Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. *Journal of Crustacean Biology* 33, 372-381.
- Mccarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., and O'gara, J.P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 1.
- Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* 104, 365-376.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- De Oliveira, Y. L. C., Nascimento da Silva, L. C., da Silva, A. G., Macedo, A. J., Araújo, J. M. D., Correia, M. T. D. S., & Silva, M. V. D. (2012). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoideae). *The Scientific World Journal*, 2012.
- Ozturk, B., Gunay, N., Ertugrul, B.M., and Sakarya, S. (2016). Effects of vancomycin, daptomycin, and tigecycline on coagulase-negative staphylococcus biofilm and bacterial viability within biofilm: an in vitro biofilm model. *Can J Microbiol* 62, 735-743.
- Paharik, A.E., and Horswill, A.R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr* 4.
- Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S., and Speziale, P. (2017). *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 166.
- Rabelo, M.A., Bezerra Neto, A.M., Loibman, S.O., Lima, J.L., Ferreira, E.L., Leal, N.C., and Maciel, M.A. (2014). The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a

- university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47, 437-446.
- Ramsey, M.M., Freire, M.O., Gabriliska, R.A., Rumbaugh, K.P., and Lemon, K.P. (2016). *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to *Corynebacterium* Species. *Front Microbiol* 7, 1230.
- Santos, L.M.M., Nascimento, J.S., Santos, M.a.G., Marriel, N.B., Bezerra-Silva, P.C., Rocha, S.K.L., Silva, A.G., Correia, M.T.S., and Paiva, P.M.G. (2017). Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100, 35-40.
- Scorzoni, L., De Lucas, M.P., Mesa-Arango, A.C., Fusco-Almeida, A.M., Lozano, E., Cuenca-Estrella, M., Mendes-Giannini, M.J., and Zaragoza, O. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One* 8, e60047.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, 891-899.
- Sternkopf Lillebaek, E.M., Lambert Nielsen, S., Scheel Thomasen, R., Faergeman, N.J., and Kallipolitis, B.H. (2017). Antimicrobial medium- and long-chain free fatty acids prevent PrfA-dependent activation of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Res Microbiol* 168, 547-557.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., and Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016, 3012462.

- Trentin Dda, S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Da Silva, A.G., Da Silva, M.V., Correia, M.T., Baumvol, I.J., and Macedo, A.J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* 137, 327-335.
- Van Wamel, W.J.B. (2017). *Staphylococcus aureus* infections, some second thoughts. *Curr Opin Infect Dis* 30, 303-308.
- Vandendool, H., and Kratz, P.D. (1963). A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr* 11, 463-471.
- Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40, 277-283.
- Zdybicka-Barabas, A., Mak, P., Jakubowicz, T., and Cytrynska, M. (2014). Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 87, 1-12.
- Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Giordani, R.B., Conceicao, J.M., Nicastro, G.G., Boechat, A.L., Baldini, R.L., Abraham, W.R., and Termignoni, C. (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environ Microbiol* 15, 2008-2018.

Figure captions

Figure 1. Effect of the *Syagrus coronata* essential oil (SCEO) on biomass and cell viability in *S. aureus* UFPEDA-02 biofilm. Biomass was quantified using the crystal violet method (OD 540 nm) and viability was determined by MTT assay (OD 540 nm). (**) $p < 0.05$; (***) $p < 0.01$.

Figure 2. SEM images of biofilms formed by *S. aureus* UFPEDA-02. (A) Untreated biofilm. (B) Biofilm treated with vancomycin at 1 $\mu\text{g/mL}$. (C) Biofilm treated with *Syagrus coronata* essential oil (SCEO) at 312 $\mu\text{g/mL}$. Arrows point cells with altered structure. (D) Biofilm treated with SCEO at 624. The asterisks indicate overproduction of exopolymeric matrix.

Figure 3. Effects of SCEO on *Galleria mellonella* larvae infected with *S. aureus* UFPEDA-02. (A) Survival curves of uninfected insects treated with PBD as well as infected insects treated with PBS (control) or SCEO at 15.6 and 31.2 mg/kg. (B) Bacterial load and (C) melanization in larvae uninfected treated with PBS as well as insects treated with PBS (control) or SCEO at 31.2 mg/kg. (**) $p < 0.05$ (***) $p < 0.01$.

Figure 1

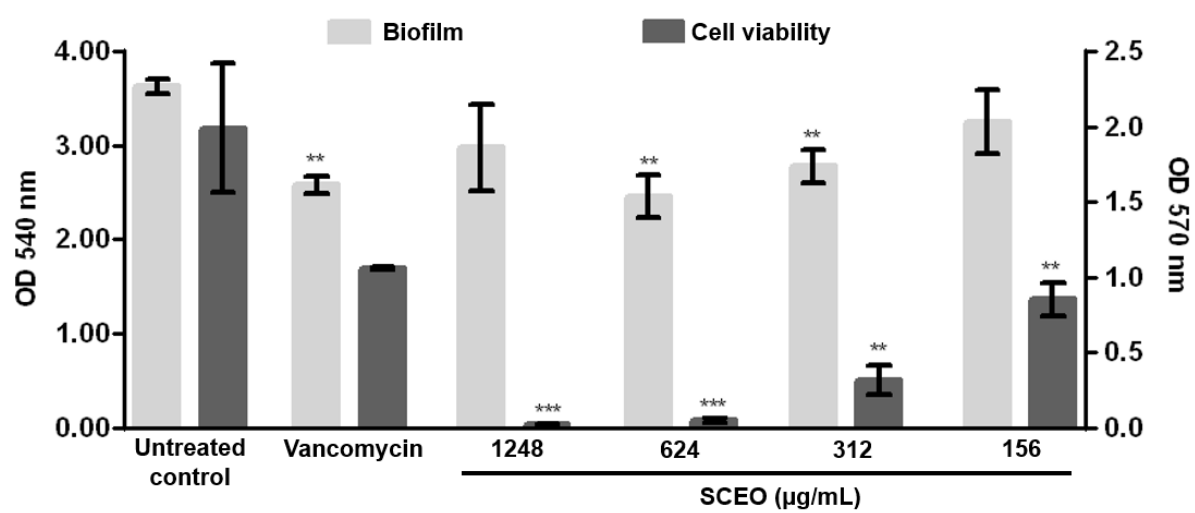


Figure 2

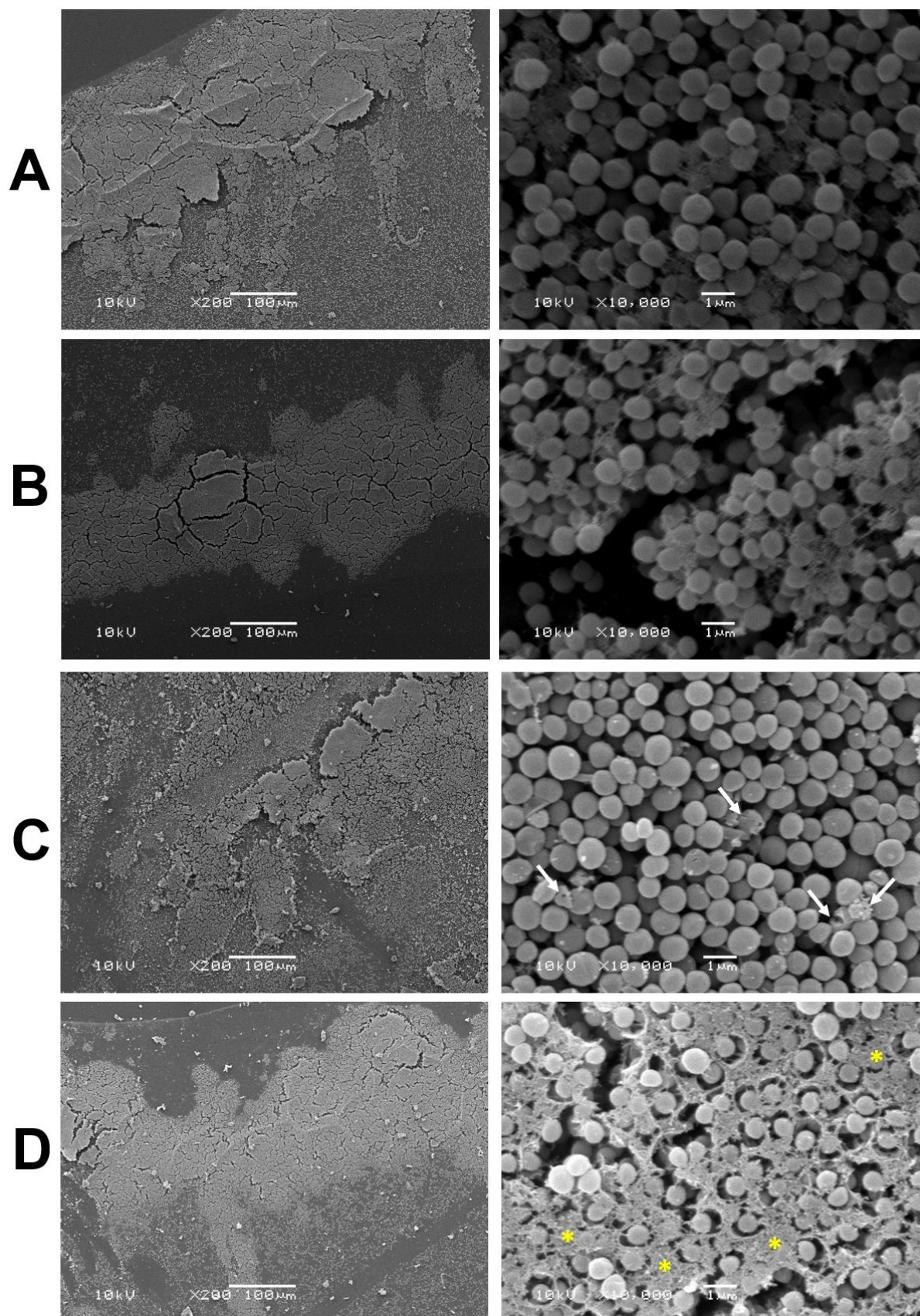


Figure 3

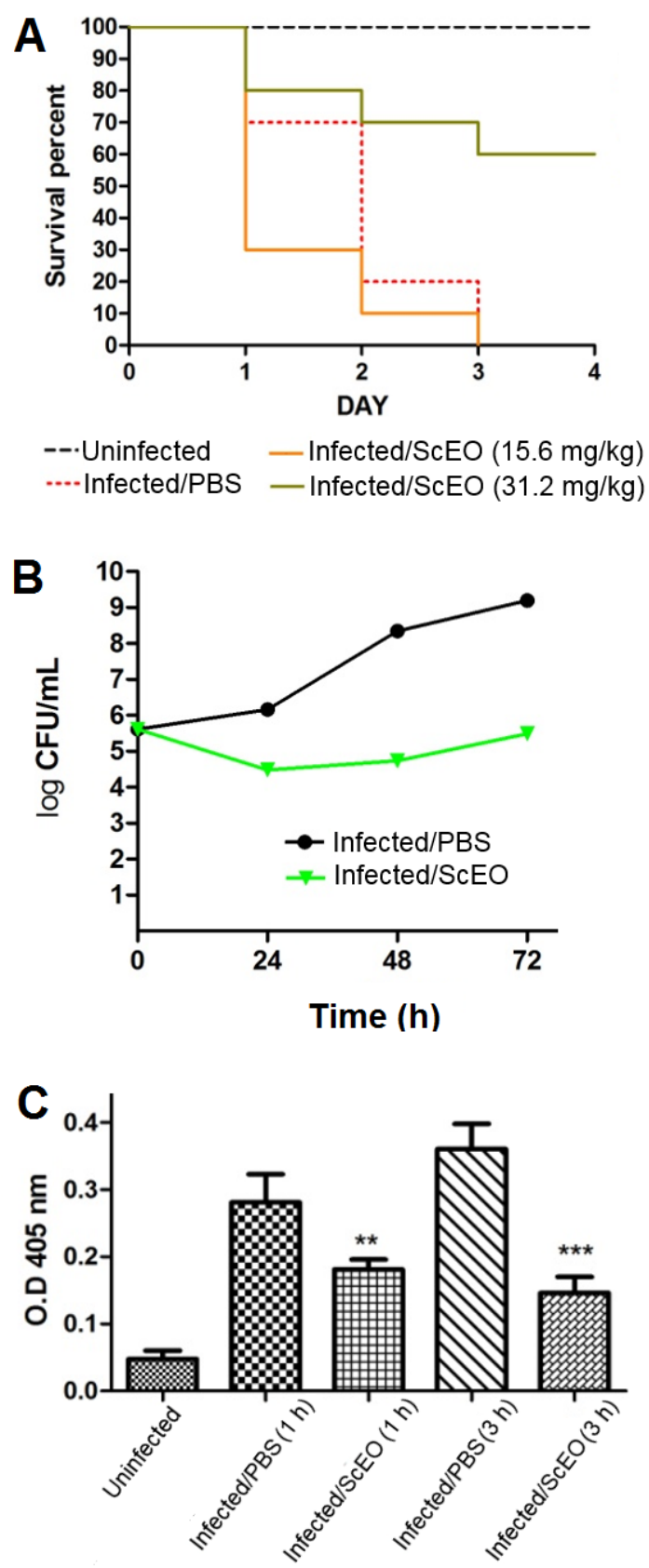


Table 1. Constituents of *Syagrus coronata* seed essential oil (SCEO).

N°	Compound ^a	RI		Content (as % of total oil)
		Determined ^b	Literature ^c	
1	Octanoic acid	1195	1167	46.77 ± 1.85
2	Decanoic acid	1378	1364	20.93 ± 0.29
3	<i>trans</i> -Caryophyllene	1421	1417	0.41 ± 0.05
4	Viridiflorene	1497	1496	0.53 ± 0.09
5	δ-Cadinene	1525	1522	0.44 ± 0.06
6	Dodecanoic acid	1573	1565	22.09 ± 3.51
7	Caryophyllene oxide	1586	1582	0.61 ± 0.23
8	Ethyl dodecanoate	1595	1594	0.34 ± 0.06
9	γ-Eudesmol	1634	1630	4.26 ± 0.41
10	β-Eudesmol	1653	1649	0.41 ± 0.04
11	α-Eudesmol	1656	1652	1.84 ± 0.61
Total				98.63

^a Constituents listed in order of elution on a non-polar DB-5 column; ^b Retention indexes (RI) calculated from retention times in relation a series of C₈-C₃₀ *n*-alkanes on a 30 m DB-5 capillary column; ^c Values taken from Adams (2007).

Table 2. Isolation source, phenotypic evaluation and biofilm formation ability of *S. aureus* isolates used in this study.

Isolate	Source	Phenotypic evaluation		Crystal violet assay	
		Colony color	Colony consistency	OD ₅₇₀	Biofilm formation
UFPEDA-02	Human injury	Almost black	Dry	1.47±0.12	+++
UFPEDA-659	Catheter tip	Red	Crystalline	0.59±0.13	++
UFPEDA-662	Catheter tip	Almost black	Rough	1.22±0.08	+++
UFPEDA-670	Catheter tip	Red	Crystalline	0.52±0.03	++
UFPEDA-671	Bone Fragment	Almost black	Dry e Rough	1.03±0.15	+++
UFPEDA-672	Bone Fragment	Almost black	Rough	1.14±0.08	+++
UFPEDA-674	Purulent exudate	Bordeaux red	Crystalline	0.62±0.09	++
UFPEDA-679	Surgical wound secretion	Black	Rough	0.77±0.07	++
UFPEDA-683	Purulent exudate	Almost black	Rough	1.06±0.19	+++
UFPEDA-689	Purulent exudate	Black	Rough	1.22±0.11	+++
UFPEDA-691	Catheter tip	Red	Rough	0.45±0.06	++
UFPEDA-699	Catheter tip	Red	Crystalline	1.01±0.15	+++
UFPEDA-700	Diabetic foot ulcer	Bordeaux red	Crystalline	1.01±0.22	+++
UFPEDA-705	Surgical wound secretion	Black	Rough	1.49±0.18	+++
UFPEDA-709	Purulent exudate	Red	Crystalline	1.31±0.09	+++
UFPEDA-718	Tracheal secretion	Red	Crystalline	0.38±0.05	+
UFPEDA-726	Nasal secretion	Red	Crystalline	1.18±0.12	+++
UFPEDA-731	Surgical wound secretion	Almost black	Rough	0.58±0.05	++
UFPEDA-733	Bone Fragment	Bordeaux red	Crystalline	1.28±0.16	+++
UFPEDA-802	Nasal secretion	Red	Dry	1.14±0.2	+++

(+++) Strong biofilm forming strain. (++) Moderate biofilm forming strain. (+) Weak biofilm forming strain.

Clinical isolate	Susceptibility profile	MAR	SCEO activity	
			MIC(µg/mL)	MBC (µg/mL)
UFPEDA-02	Susceptible	0	312	312
UFPEDA-659	CFO,OXA, NAL	0.15	312	312
UFPEDA-662	AMP, CFO, OXA, NAL	0.2	625	625
UFPEDA-670	AMP, CFO, OXA, NAL, CIP, CLI, TRI	0.35	312	625
UFPEDA-671	AMP, CFO, OXA, NAL, CIP, AMI, GEN, CLI, CLO, TET, TRI	0.55	312	312
UFPEDA-672	AMP, CFO, OXA,NAL, CIP, NIT, CLI, TRI	0.4	156	312
UFPEDA-674	AMP, NAL, CLI, TET	0.2	312	625
UFPEDA-679	AMP, CFO, OXA, CFL, CFZ, NAL, VAN, AMI, CLI	0.45	625	625
UFPEDA-683	AMP, OXA, CFL, CFO, CFZ, CPM, CRX, CTX, NAL, CIP, VAN, AMI, GEN, CLI, CLO, TRI	0.8	625	1250
UFPEDA-689	AMP, CFZ, NAL, GEN, CLI, CLO, TET, TRI	0.4	625	625
UFPEDA-691	NAL, CIP, CLO	0.15	156	312
UFPEDA-699	AMP, NAL, CLI, CLO	0.2	156	312
UFPEDA-700	AMP, CFO, OXA, CIP, TET	0.25	312	156
UFPEDA-705	AMP, OXA, CFL, CFO, CPM, CRX, NAL, NIT, GEN	0.45	312	312
UFPEDA-709	AMP, CFO, OXA, NAL, CLI, TET	0.3	625	625
UFPEDA-718	AMP, NAL, CIP	0.15	312	312
UFPEDA-726	AMP, CFO, OXA, CIP, GEN, CLO, TRI	0.35	312	312
UFPEDA-731	AMP, CFO, OXA, CFL, CFO, CRX, NAL, CIP, GEN, CLI, CLO, TRI	0.6	312	312
UFPEDA-733	AMP, NAL, CIP, CLO	0.2	625	625
UFPEDA-802	AMP, OXA, CFL, CFO, CFZ, CPM, CRX, CTX, NAL, CIP, AMI, GEN, CLI, CLO, TET,	0.8	625	625

Table 3. Antibiotic resistance profile of *S. aureus* isolates and antibacterial activity of *Syagrus coronata* essential oil (SCEO).

AMP: ampicillin. OXA: oxacillin. CFL: cephalothin. CFZ: cefazolin. CPM: cefepime. CFO: ceftiofur, CTX: cefotaxime. CRX: cefuroxime. IMI: imipenem. MER: meropenem. NAL: nalidixic acid. CIP: ciprofloxacin. NIT: nitrofurantoin. AMI: amikacin. GEN: gentamicin. VAN: vancomycin. CLI: clindamycin. CLO: chloramphenicol. TET: tetracycline. TRI: trimethoprim. MAR: multiple antibiotic resistance index. MIC: minimum inhibitory concentration. MBC: minimum bactericidal concentration.

**ARTIGO 3 - CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DE *Staphylococcus aureus*
TRATADO COM ÓLEO VOLÁTIL DE *Syagrus coronata***

Santos, B.S.S., Nascimento-Júnior, J.A.A., Sampaio, M.G.V., Correia, M.T.S., Silva, L.C.N.,
Napoleão, T.H., Silva, M.V., Paiva, P.M.G.

(*) – Artigo a ser submetido a revista Microbial Pathogenesis (Fator de impacto 2017: 2.332)

Caracterização proteômica de *Staphylococcus aureus* tratado com óleo volátil de *Syagrus coronata*

Santos, B.S.S., Nascimento-Júnior, J.A.A., Sampaio, M.G.V., Correia, M.T.S., Silva, L.C.N., Napoleão, T.H., Silva, M.V., Paiva, P.M.G.

1 – Introdução

O surgimento e disseminação de bactérias patogênicas resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos tornou-se um grande problema de saúde global no século XXI (MAGIORAKOS et al., 2012). As infecções causadas por esses agentes patogênicos aumentam a incidência de morbidade e mortalidade, bem como o tempo de hospitalização e os custos de tratamento (LAXMINARAYAN et al., 2013). Este problema é ainda mais complicado pelo fato de que o desenvolvimento de novos antimicrobianos não segue a taxa em que os mecanismos de resistência bacteriana evoluem (LAUTENBACH E PERENCEVICH, 2014).

Neste sentido, as estratégias destinadas a combater esta ameaça estão sendo buscadas. Ao longo dos séculos, produtos naturais provenientes de plantas têm formado a base para sistemas médicos tradicionais em todo o mundo. Essas substâncias chamam a atenção dos pesquisadores devido à sua multiplicidade de aplicações e atualmente desempenham um papel fundamental na permitindo a descoberta de novos medicamentos. Usados diariamente ou com algumas modificações químicas, os metabólitos da planta secundária estão presentes em vários medicamentos que foram aprovados nos últimos 30 anos (NEWMAN E CRAGG, 2012).

Syagrus coronata (Arecaceae), popularmente conhecida como "ouricuri" ou "licuri", é uma palmeira tipicamente encontrada na Caatinga (região semi-árida do nordeste brasileiro), que sofre uma seca prolongada e floração e frutificação durante um longo período do ano (SANTOS et al., 2017). Os seus usos em culinária (principalmente o óleo de frutas), construção, arte popular, combustível e medicina foram relatados, mas o valor predominante está ligado ao uso da amêndoa (SANTOS et al., 2017). A atividade antibacteriana do óleo de *S. coronata* foi reportada recentemente, entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Uma análise da caracterização do perfil proteico de *Staphylococcus aureus* exposto ao óleo de *S. coronata* poderá facilitar o entendimento do seu modo de ação.

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil proteico de *S. aureus* após incubação com concentração subinibitória do óleo de *S. coronata*. Em adição, o trabalho também avalia a citotoxicidade do óleo de *S. coronata* sobre fibroblastos humanos.

2 – Materiais e métodos

2.1 Óleo volátil de *S. coronata*

O óleo volátil de *S. coronata* foi obtido como descrito previamente no segundo capítulo conforme Santos et al.(2017). Os principais componentes do óleo de *S. coronata* são ácido octanóico, ácido dodecanóico e ácido decanóico (SANTOS et al., 2017).

2.2 Linhagens de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas duas linhagens de *S. aureus*, uma linhagem padrão sensível a meticilina (MSSA) UFPEDA 02 e uma linhagem resistente a meticilina (MRSA) UFPEDA 705. Os isolados foram mantidos e crescidos em meio BHI (Brain Heart Infusion).

2.3 Curva de crescimento

Para avaliação do crescimento, as linhagens de *S. aureus* foram cultivadas em meio BHI na ausência ou presença de 0.5xMIC (156µg/mL) a 37° por 12h. Aliquotas foram coletadas após 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12h e o crescimento celular foi monitorado pela leitura do valor de densidade óptica (OD) a 600nm.

2.4 Preparação dos extratos protéicos

As células de MRSA e MSSA foram coletadas após 6h de crescimento na presença ou ausência de óleo volátil de *S. coronata*. As células foram lavadas três vezes com solução fosfato salina (PBS) para retirar resíduos de meio de cultura e coletadas por centrifugação a 6000xg por 10 min. O precipitado protéico foi obtido pelo método de trizol, seguindo as instruções do fabricante. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit Quanti 2-D (GE Life Sciences) de acordo com as recomendações do fabricante. O padrão de proteína BSA foi utilizado para obter uma curva de calibração. As amostras foram estocadas a -80°C.

2.5 Eletroforese bidimensional (2-DE) e análise da imagem

A focalização isoeétrica foi realizada em IPGphor 3 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) em tira dry strip 11 cm e gradiente de pH imobilizado de 4-7, que foram hidratados com 500 µg de proteínas dissolvidas em solução de reidratação (ureia 7 M, tioteia 2 M, 2% CHAPS, DTT 19,4 mM, tampão IPG / pH 4-7 1,0% (GE Life Sciences) e 0,005% de azul de bromofenol). O IEF foi realizado a 20 °C de um modo passo a passo nas condições da seguinte forma: 100V durante 2 horas, 250V por 2 horas, 500V durante 2 horas, 1000V durante 2 h, gradientes de 8000V durante 4 h e 8000V para um total de 66.000Vh . A segunda dimensão foi realizada com 12% de géis utilizando 16 mA/gel durante 0,5 h, seguido de 32 mA/gel a 16 °C. Os spots proteínas nos géis foram visualizadas por coloração com o método melhorado de Blue-G-250 do Coomassie Brilliant.

Cada amostra de proteína foi analisada por 2-DE pelo menos três vezes. Os géis de proteínas foram analisados com o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. A detecção dos spots foi realizada, seguido de correções manuais para remover artefatos que não correspondem a proteínas e a quantidade de cada site foi normalizada pela intensidade total de spots válidas.

Os spots de proteínas normalizadas foram comparadas e as que apresentaram aumento ou diminuição da abundância para mais do dobro foram consideradas diferencialmente expressas, com valores de $p < 0,05$. Os spots de proteínas selecionadas foram submetidas a digestão com tripsina para identificação pelo MALDI-TOF/TOF MS.

2.6 Identificação de pontos diferencialmente expressos por espectrometria de massa

Os locais selecionados foram excisados manualmente dos géis e digeridos com tripsina. Os peptídeos resultantes foram extraídos em solução contendo 5% de ácido trifluoracético e 50% de acetonitrila, concentrados em Speed-Vac (Eppendorf) durante 30 minutos e submetidos a análise de espectrometria de massa. Os espectros de MS e MS/MS foram obtidos no MALDI-TOF/TOF Autoflex III (espectrômetro Bruker Daltonics) usando a matrix de α -ciano. O MS em conjunto com o espectro MS/MS foi pesquisado pelo software MASCOTE (versão 2.2, Matrix Science, Londres, Reino Unido) e no banco de dados UniprotKB/Swiss-Prot.

2.7 Determinação de ROS (Radical anion superóxido)

Radical anion superóxido foi estimado pelo método de NBT usando protocolo descrito por Joshi et al.(2018). Células de MRSA e MSSA tratadas e não tratadas foram lavadas três vezes para retirar resíduos de meio de cultura e foram incubadas com solução de NBT(0,1%) a 37°C por 45 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000xg por 10 minutos e o pellet celular foi solubilizado com 100 µL de KOH (2M) e 100 µL de DMSO e a quantidade de ROS foi mensurada espectrofotometricamente a 620nm.

2.8 Ensaio de citotoxicidade

Os fibroblastos NCTC clone 929 foram plaqueados em placas de microtitulação 96 poços a 3×10^4 células por poço em 100 µL de meio de crescimento(Meio Essencial Mínimo (Sigma) suplementado com 10% de FBS inativado pelo calor, penicilina G e estreptomicina). As células foram cultivadas overnight a 37°C, 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido e o óleo volátil foi adicionado em 200 µL de meio durante 24 h. Cada concentração foi testada em triplicada. A mensuração da viabilidade celular foi avaliada por reagente MTT (MOSMANN,1983).

3 – Resultados e discussão

A curva de crescimento celular de MRSA e MSSA (Figura 1) foi construída nos tempo de 0 a 12h tratado com 0.5 x MIC e determinada espectrofotometricamente (OD600). O crescimento de ambas as linhagens foi diminuído pela presença do tratamento, por isso, o tempo de 6h foi escolhido para estudo proteômico devido a uma significativa biomassa para extração protéica e início da fase exponencial, período em que as células encontraram-se em alta atividade metabólica.

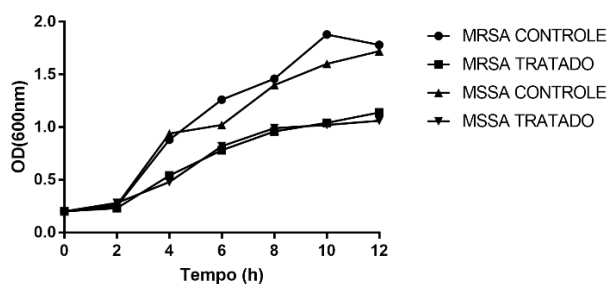


Figura 1 – Curva de crescimento celular de MRSA e MSSA tratados e não tratados.

Inicialmente, foi utilizada a técnica de eletroforese unidimensional – SDS PAGE, a fim de avaliar a integridade das proteínas e obter uma prévia do perfil proteico. A eletroforese bidimensional – 2DE foi utilizada para investigar a expressão diferencial de proteínas de MRSA e MSSA. A figura 2 mostra o gel 2D dos controles e tratados, mais de 50 spots foram detectados e visualizados em cada gel após utilização dos recursos de normalização da intensidade dos spots e correção manual, adição e remoção dos spots, sempre mantendo uma intervenção concisa mínima durante a análise, essa ação ocorreu devido a sensibilidade do programa que pode detectar como spots alguns artefatos.

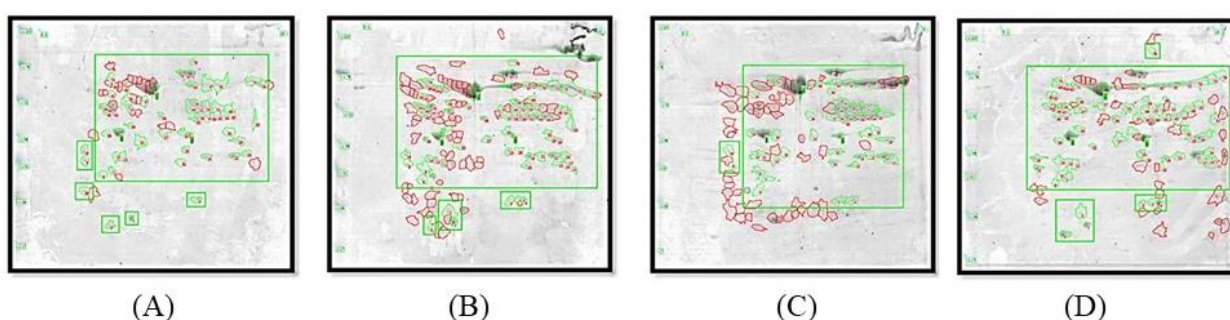


Figura 2 – Padrão de eletroforese bidimensional das proteínas de MSSA tratado e não tratado(A e B) e MRSA tratado e não tratado(C e D)

A análise das imagens identificaram um total de 14 (11 down regulados e 3 up regulados) e 11(9 down regulados e 2 up regulados) spots diferencialmente regulados para MRSA e MSSA. Desses 25 spots, 9 (37,5%) foram identificados com sucesso após serem submetidos a espectrometria de massas – MALDI-TOF (Tabela 1). 6 spots foram identificados em comum entre MRSA e MSSA. As proteínas encontradas foram relacionadas a diferentes categorias de acordo com o processo celular como sistema de transporte de membrana, resposta a estresse, estresse oxidativo, metabolismo de lipídios, síntese proteica e produção de energia.

Nossa análise proteômica revelou uma reorganização celular da produção de energia de *S.aureus* quando exposto a óleo de *S. coronata*. Uma mudança detectada aqui é a diminuição de uma enzima chave na produção de energia, aldeído desidrogenase. Outra enzima importante inibida foi a 3-oxo-acil-sintase, que participa de síntese de ácidos graxos. A biossíntese de ácidos graxos é essencial para a formação e estabilidade da membrana de fosfolípidos (NEUMAN et al, 2015). Pode-se esperar que devido a natureza lipofílica do óleo de *S. coronata* (rico em ácidos graxos) haja uma interferência na biossíntese de ácidos

graxos, por causar perda da integridade da membrana celular. Esse dado é consistente com resultado prévio que mostram que o óleo de tea tree modificou a expressão da enzima 3-oxo-acil-sintase, alterando a sensibilidade das colônias variantes de *S. aureus* a antibióticos (TORRES et al, 2017).

A exposição de *S. aureus* ao óleo de *S. coronata* alterou a produção de proteínas ligadas a estresse oxidativo e resposta a estresse. Essas proteínas são ferritina, superóxido dismutase, proteína de choque alcalino 23, catalase e proteína Dnak. A catalase e superóxido dismutase são uma defesa contra o desbalanço de radicais livres. A catalase é um dos principais fatores de virulência e sua repressão pode tornar as células das bactérias mais suscetíveis a serem mortas por neutrófilos nas células hospedeiras (THOMER, SCHNEEWIND, MISSIAKAS, 2016). Esses dados são condizentes com aqueles reportados por Khairon et al.(2016), que encontraram que os níveis subinibitórios de extrato aquoso de *Quercus infectoria* reduziu a expressão de várias proteínas ligadas a estresse como a catalase. As proteínas propostas relacionadas ao estresse, obviamente, refletem um mecanismo secundário consistente da ação do óleo de *S. coronata* a condições de estresse causada pela alteração da membrana e morte celular. Esses dados indicam que a ação bactericida sobre *S. aureus* pode ser atribuída a seus efeitos inibitórios em múltiplos alvos.

O teste de redução de NBT estimou os níveis de radicais livres através de formação cromogênica de íon reduzido e validou os dados de estresse provocados pelo óleo de *S. coronata* nas células de MRSA. As células tratadas mostraram um aumento da OD de 0.48 ± 0.12 para 0.98 ± 0.032 ($p < 0.05$), indicando altos níveis residuais de radicais livres. ROS podem funcionar como mensageiros secundários nas cascatas de sinalização envolvidas na proliferação e diferenciação celular (NEVIN E RAJAMOCHAN, 2010). O ácido láurico, um dos principais componentes do óleo de *S. coronata*, é um ácido graxo com conhecida atividade antibacteriana, com mecanismo de ação relacionado a indução de danos na membrana e geração de ROS, que é resultado da lise celular (YANG et al., 2017).

Na atividade citotóxica, óleo de *S. coronata* causou a mortalidade de 1,88%, 3,68%, 4,2% e 7,92% dos fibroblastos nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. Esses dados são consoantes com outro óleo rico em ácidos graxos, óleo de coco, que manteve a viabilidade celular acima de 50% até em altas doses (10mg/mL), além disso, em doses mais baixas aumentou a proliferação das células de fibroblastos (AHMADA et al, 2017).

Tabela 1 - Lista de proteínas diferencialmente expressas identificadas por MALDI-TOF

Spot	Proteína	Categoria	Detecção	Organismo	Score	Coverage %	Expressão	pI	Mr(kDa)
1	ABC transporter ATP-binding protein	Sistema de transporte de membrana	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	128	33	-3,26	6,96	29,38
2	Ferritin	Resposta a estresse	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	125	52	-2,81	5,04	19,8
3	Superoxide dismutase	Estresse oxidativo	MRSA	<i>S.aureus</i>	162	39	-2,55	5,08	22,7
4	3-oxoacyl-synthase	Metabolismo de lipídios	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	101	47	-3,26	5,1	43,88
5	Alkaline shock protein 23	Resposta a estresse	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	102	33	2,18	5,23	19,22
6	Catalase	Estresse oxidativo	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	200	43	-3,78	5,29	58,02
7	30S ribosomal protein S2	Síntese proteica	MRSA	<i>S.aureus</i>	81	58	3,88	6,76	25,6
8	DnaK protein	Resposta a estresse	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	122	37	-2,96	4,75	63,37
9	Aldehyde dehydrogenase	Produção de energia	MRSA/MSSA	<i>S.aureus</i>	178	37	-3,85	4,8	52,02

4. Conclusões

A caracterização do perfil proteômico de *S.aureus* respondendo ao tratamento com óleo de *S. coronata* conseguiu visualizar a adaptação metabólica da bactéria a exposição a este produto natural. Neste estudo, vias metabólicas alternativas como a inibição da produção de energia, da biossíntese de ácidos graxos e acúmulo de radicais livres podem ajudar a elucidar o curso de ação antimicrobiana do óleo, que se mostrou um produto natural com baixa toxicidade. Entretanto, mais avaliações clínicas da atividade anti-estafilococos do óleo de *S. coronata* são ainda necessárias.

5. REFERÊNCIAS

- AHMADA, Z., SARMIDIB, M. R., HASHAM, R. Evaluation of Wound Closure Activity of *Cocos Nucifera* Oil on Scratched Monolayer of Human Dermal Fibroblasts. **Chemical engineering transactions** vol. 56, p. 1657-1662, 2017.
- JOSHI, B. et al. Efficient inactivation of *Staphylococcus aureus* by silver and copper loaded photocatalytic titanate nanotubes. **Progress in Natural Science: Materials International**, 2018.
- LAUTENBACH, E.; PERENCEVICH, E. N. Addressing the emergence and impact of multidrug-resistant gram-negative organisms: a critical focus for the next decade. **Infection control & hospital epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 333-335, 2014.
- LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.
- MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NEUMANN, Y. et al. The effect of skin fatty acids on *Staphylococcus aureus*. **Archives of microbiology**, v. 197, n. 2, p. 245-267, 2015.
- NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Effect of topical application of virgin coconut oil on skin components and antioxidant status during dermal wound healing in young rats. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 6, p. 290-297, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- SANTOS, L.M. M. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 100, p. 35-40, 2017.
- THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 343-364, 2016.
- TORRES, N. J. et al. Proteomics analysis of tea tree oil-selected *Staphylococcus aureus* small colony variant. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1 Supplement, p. 768.14-768.14,

2017.

YANG, H. T. et al. Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in mouse model of infection. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2635, 2017.

6 CONCLUSÕES

- As tecnologias “ômicas”, em especial a proteômica, fornecem informações cruciais sobre os processos relacionados à fisiologia bacteriana, virulência, estresse e mecanismo de ação de compostos antimicrobianos. O uso dessas ferramentas fornece dados mais profundos e mais robustos, e tem maior potencial para revelar novos alvos terapêuticos do que os ensaios convencionais.
- Óleo essencial de *Syagrus coronata* é um agente antibacteriano contra linhagens de *S. aureus* com diferentes fenótipos de resistência e que sua habilidade em perturbar a arquitetura do biofilme está provavelmente associada à diminuição da viabilidade celular dentro do biofilme. A atividade antibacteriana *in vivo* de SCEO contra *S. aureus* melhorou a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* e este fato indica SCEO como um potencial candidato ao desenvolvimento de drogas para o tratamento de infecções por *S. aureus*.
- A caracterização do perfil proteômico de *S. aureus* respondendo ao tratamento com óleo de *S. coronata* conseguiu visualizar a adaptação metabólica da bactéria a exposição a este produto natural. Neste estudo, vias metabólicas alternativas como a inibição da produção de energia, da biossíntese de ácidos graxos e acúmulo de radicais livres podem ajudar a elucidar o curso de ação antimicrobiana do óleo, que se mostrou um produto natural com baixa toxicidade. Entretanto, mais avaliações clínicas da atividade anti-estafilococos do óleo de *S. coronata* são ainda necessárias.

REFERÊNCIAS

- ADUKWU, E. C., BOWLES, M., EDWARDS-JONES, V., E BONE, H. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied microbiology and biotechnology**, 100(22), 9619-9627, 2016.
- AHMAD, S. et al. Characterization of Novel Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcal aureus*. **Journal of Bacteriology and Mycology Open Access**, 6.1: 00167, 2018.
- ALMEIDA, M. I. et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 2, p. 489-495, 2007.
- ALTELAAR, A.F. M.; MUNOZ, J.; HECK, A. JR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 35, 2013.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, 12.7: 465, 2014.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- ARCIOLA, C.R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, E. B. et al. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.
- BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown**. 2008. 162p. Dissertação de mestrado em Ciências.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2015.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BAUER, L. C. et al. Chemical characterization of pressed and refined licuri (*Syagrus coronata*) oils. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 4, 2013.

BELVISO, S. et al. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**, v. 51, p. 39-45, 2013.

BENSIMON, A.; HECK, A. JR; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 379-405, 2012.

BESSA, C. M. A. S. et al. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.

CAGLIERO, C. et al. Analytical strategies for multipurpose studies of a plant volatile fraction. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2014.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, 51(26):565-7, 2002.

CHANDRASEKHAR, K. et al. A short review on proteomics and its applications. **International Letters of Natural Sciences**, v. 12, n. 1, 2014.

CHANDRIKA, N.T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Comprehensive review of chemical strategies for the preparation of new aminoglycosides and their biological activities. **Chemical Society Reviews**, 2018.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Essential oils: a natural alternative to combat antibiotics resistance. **Antibiotic Resistance**, p. 227. 2016.

CHEESMAN, M. J. et al. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 57, 2017.

CHEN, B. et al. Proteomics progresses in microbial physiology and clinical antimicrobial therapy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 403-413, 2017.

CHEW, S. C.; YANG, L. Biofilms: Microbial Cities Wherein Flow Shapes Competition. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 5, p. 331-332, 2017.

CHEW, Y. L. et al. Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth. and their mechanism of antibacterial activity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 70, 2018.

CREPALDI, I. C. et al. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.

DAVIES, J. C.; BILTON, D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. **Respiratory care**, v. 54, n. 5, p. 628-640, 2009.

DE SOUZA, L. I. O. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055-1064, 2017.

DHIMAN, N. et al. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1614-1616, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DRUMOND, M. A. **Licuri - *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido. 16p. 2007.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

FALEIRO, M. L. **The mode of antibacterial action of essential oils**. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, v. 2, p. 1143-1156, 2011.

FEDERSPIL, P.; FEDERSPIL, P. A.; GEIPEL, U. Methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRSA, MRSE) in the nose, paranasal sinuses and sputum. **HNO**, v. 57, n. 4, p. 395-407, 2009.

FEßLER, Andrea T., et al. **Antimicrobial Resistance Properties of *Staphylococcus aureus***. *Staphylococcus aureus*. p. 57-85, 2018.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **Fems microbiology reviews**, 41.3: 430-449, 2017.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49, 2014.

GALDOS-RIVEROS, A.C. et al. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-24, 2010.

GELATTI, L. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 5, p. 501-506. 2009.

GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. **Planta medica**, v. 74, n. 06, p. 594-602, 2008.

GIEDRAITIENĖ, A., et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina** (Kaunas), 47, 3, 137-146, 2011.

GLASER, P., et al. Demography and intercontinental spread of the USA300 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage. **MBio**, 7.1: e02183-15, 2016.

GOKGOZ, N.B.; AKBULUT, B. S. Proteomics evidence for the activity of the putative antibacterial plant alkaloid (-)-roemerine: mainstreaming omics-guided drug discovery. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 19, n. 8, p. 478-489, 2015.

GOLDBERG, E. et al. Co-trimoxazole versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective cohort study. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1779-1783, 2010.

GÓMEZ-SANZ, E. et al. Novel erm (T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3275-3282, 2013.

GOULD, I. M. et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **International journal of antimicrobial agents**, 39.2: 96-104, 2012.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids** Van Nostrand Reinhold. New York, 1991.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 255-306, 2011.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 130, 2017.

HIRAMATSU, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, 1997.

HOOPEL, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12-31, 2015.

HU, Y. et al. Combinations of β -lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117664, 2015.

HUGHES, A. F. S. et al. Antimicrobial activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269-274, 2013.

IROLSTON, K. V. et al. *In-vitro* activity of tedizolid and comparator agents against clinical Gram-positive isolates recovered from patients with cancer. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2018.

KIM, S. J. et al. Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 3, p. 749-756, 2018.

KREAUSUKON, K., et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. **Journal of dairy science**, 95.8: 4382-4388, 2012.

KWON, A. S. et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 1, p. 68-72, 2008.

LAMY, E. et al. Protein electrophoresis in saliva study. In: **Electrophoresis**. InTech, 2012.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, 34.4: 482-492, 2002.

LIMSUWAN, S. et al. Potential antibiotic and anti-infective effects of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. on *Streptococcus pyogenes* as revealed by proteomics. **Phytomedicine**, v. 18, n. 11, p. 934-940, 2011.

LOWY, F. D. Staphylococcal Infections. **Harrison' Principles of Internal Medicine**. E. B. A. S. Fauci, D.L. Casper, S. L. Hauser, D. L. Longo, J. L. Jameson and J. Loscalzo, The McGraw-Hill Companies, Inc: 386-399, 2011.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. The **Journal of clinical investigation**, 111.9: 1265-1273, 2003.

LUCENA, B. F.F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 1, 2015.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.

MAIA, G.N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª Ed. Leitura & Arte, p. 19-31, 2004.

MANN, E. E. et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5822, 2009.

MOELLERING JR, R. C. MRSA: the first half century. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 4-11, 2011.

MOORMEIER, D. E. et al. Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological niches. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 11, p. 3413-3424, 2013.

NAGEL, M. et al. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, 2011, 301.3: 229-236.

NGUYEN, F. et al. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological chemistry**, 395.5: 559-575, 2014.

NOBLICK, L. R. Syagrus. **The Palm Journal**, Lawrence, v.126, 12-46p, 1996.

OKSUZ, L.; GURLER, N. Susceptibility of clinical methicillin-resistant *Staphylococci* isolates to new antibiotics. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 11, p. 825-831, 2013.

OLIVEIRA, A. E.M.F.M et al. Essential oil from *Pterodon emarginatus* as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 1-9, 2017.

OTTO, M. **Staphylococcal biofilms**. In: Bacterial biofilms. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 207-228.

PANTOSTI, A., SANCHINI, A., MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Medicine**. 2(3):323-34, 2007.

PARK, S., GERBER, S., LEE, J. C. Antibodies to *Staphylococcus aureus* serotype 8 capsular polysaccharide react with and protect against serotype 5 and 8 isolates. **Infection and immunity**, 82(12), 5049-5055, 2014.

PASTOR-SÁNCHEZ, R. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. **Gac Sanit.**, 20, 1, 175-81, 2006.

PAULI, A.; SCHILCHER, H. *In Vitro* Antimicrobial activities of essential oils monographed in the european pharmacopoeia 6th Edition. **ESSENTIAL**, p. 353, 2009.

PELEG, A.Y. et al. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 4, p. 532-536, 2009.

PÉREZ-LLARENA, F.J.; BOU, G. Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 410, 2016.

PIĄTKOWSKA, E.; RUSIECKA-ZIÓŁKOWSKA, J. Influence of essential oils on infectious agents. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 25, n. 5, p. 989-995, 2016.

QUEIROGA, R.C. R. E. et al. Produção e composição química do leite de cabras mestiças Moxotó sob suplementação com óleo de licuri ou de mamona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 204-209, 2010.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

REDDY, P. J. et al. Proteomics analyses of *Bacillus subtilis* after treatment with plumbagin, a plant-derived naphthoquinone. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 19, n. 1, p. 12-23, 2015.

RIVERA, A. M.; BOUCHER, H.W. Current concepts in antimicrobial therapy against select gram-positive organisms: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant pneumococci, and vancomycin-resistant enterococci. **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2011. p. 1230-1243.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 293-297, 2013.

ROLO, J. et al. Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2017, 61.6: e02302-16.

ROSSI, F. et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 16, p. 1524-1531, 2014.

RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 282-290, 2010.

SAKOULAS, G.; MOELLERING JR, R. C. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Clinical Infectious Diseases**, 46. Supplement_5: S360-S367, 2008.

SANTOS, L. M. M. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 100, p. 35-40, 2017.

SARAVOLATZ, L. D.; PAWLAK, J.; JOHNSON, L. B. *In vitro* susceptibilities and molecular analysis of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Clinical infectious diseases**, 55.4: 582-586, 2012.

SECOR, P. R. et al. *Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 143, 2011.

SEMIENIUC, C. A.; POP, C. R.; ROTAR, A. M. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 2, p. 403-408, 2017.

SERIO, A. W. et al. **Aminoglycosides: Mechanisms of action and resistance**. In: Antimicrobial Drug Resistance. Springer, Cham, p. 213-229, 2017.

SERRA, D. O.; HENGGE, R. Stress responses go three dimensional—the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1455-1471, 2014.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, 303.6-7: 350-359, 2013.

SIANGLUM, W. et al. Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrone, a novel antibiotic candidate. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16628, 2011

SRINIVASAN, D. et al. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 217-220, 2001.

STEGGER, Marc, et al. Rapid differentiation between livestock-associated and livestock-independent *Staphylococcus aureus* CC398 clades. **PloS one**, 8.11: e79645, 2013.

STEWART, C.M. ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins**. A.D. Hocking (Ed.) Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. 6th. Australian Institute of Food Science Technology (NSW Branch) Food Microbiology Group, Sydney, NSW, Australia; 359–380, 2003.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 172, 2017.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, 119, 6A, S3-10, 2006.

THAKKER, M. et al. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infection and immunity**, 66.11: 5183-5189, 1998.

TILLE, P. **Staphylococcus, Micrococcus and Similar Organism**. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology-E-Book. Elsevier Health Sciences, 2015.

TONG, S. Y. C et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, 28.3: 603-661, 2015.

TSIATSIANI, L.; HECK, A. JR. Proteomics beyond trypsin. **The FEBS journal**, v. 282, n. 14, p. 2612-2626, 2015.

WALSH, C., et al. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. **American Society for Microbiology (ASM)**, 2016.

WEIGEL, L. M. et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1569-1571, 2003.

YANG, L. et al. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1705-1717, 2011.

YI, S. et al. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of tea polyphenols against *Serratia marcescens*. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 451-460, 2014.

YORK, A. Biofilms: The architect of the biofilm. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 642, 2017.

ZENG, Y. et al. Mass spectrometry based proteomics profiling of human monocytes. **Protein & cell**, v. 8, n. 2, p. 123-133, 2017.