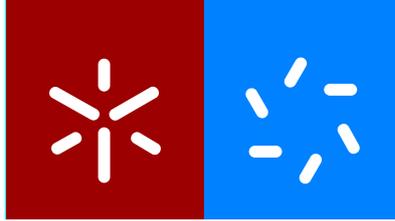


Luciana Mayara Mendonça de Almeida

Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Thymbra capitata* contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM)



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luciana Mayara Mendonça de Almeida

**Potencial antimicrobiano do óleo
essencial de *Thymbra capitata* contra
isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina (SARM)**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biologia
Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em
Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação do
Doutor Nuno Miguel Dias Cerca e da
Doutora Cristina Alexandra Almeida Aguiar

Novembro de 2020

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição
CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Sem todo o apoio que recebi, a realização deste gratificante trabalho não teria sido possível. Por isso, agradeço imensamente ao Dr. Nuno Cerca pela oportunidade de realizar a dissertação no Laboratório de Investigação em Biofilmes Rosário Oliveira, pelo rigor científico, pela disponibilidade constante, por todas as sugestões e por todo incentivo. Agradeço a professora Dra. Cristina Aguiar, por ter sido sempre tão atenciosa, pelo suporte, pelo acompanhamento e pelas sugestões.

Agradeço ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela disponibilidade de instalações e equipamentos, ao Microbiology and Antibiotic Resistance Team da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro por terem disponibilizado os isolados, à Escola de Ciências da Universidade do Minho pela qualidade do ensino e a todos os professores do Departamento de Biologia por partilharem a maior riqueza que alguém pode acumular: o conhecimento;

Expresso também o meu agradecimento à Aliona Rosca, Andreia Magalhães, Angela França, Beatriz Pinto, Fernando Oliveira, Joana Castro, Lúcia Sousa, Nathalie Lopes, Paula Jorge, Susana Brás e Vânia Gaió pela generosidade em partilharem os seus conhecimentos, pela paciência e por tornarem divertida esta jornada de constante aprendizado. Deixo um agradecimento especial para Nathalie Lopes e Vânia Gaió pela ajuda durante as experiências e pela prestatividade. Faço um agradecimento com carinho as “meninas do grupo MOP”, pela disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso. Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse trabalho.

Este estudo foi suportado em parte pelo projeto CAREBIO2 - Comparative assessment of antimicrobial resistance in environmental biofilms through proteomics - towards innovative theranostic biomarkers, com referência NORTE-01-0145-FEDER-030101 e PTDC/SAU-INF/30101/2017 financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDR) através do Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020) e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).



DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Thymbra capitata* contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM)

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (SARM) é um agente patogénico oportunista, considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma bactéria multirresistente de alta prioridade. Além do desenvolvimento de resistência aos antibióticos utilizados na prática clínica, a capacidade de formação de biofilme é um fator subjacente que dificulta o tratamento das infeções resultantes da colonização de SARM. Por este motivo, novos agentes antimicrobianos têm vindo a ser procurados, tendo os óleos essenciais (OEs) demonstrado serem uma importante fonte de compostos bioativos. Uma vez que tem sido reportado na literatura que o OE de *Thymbra capitata* possui atividade antimicrobiana contra diversos agentes patogénicos, o objetivo do presente trabalho foi investigar o seu potencial antimicrobiano contra isolados clínicos de SARM em crescimento planctónico e em biofilme. Foram utilizados isolados provenientes de septicemias, úlceras de pés de diabéticos e osteomielites. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima letal (CML) foi investigada para verificar o efeito antibacteriano contra células planctónicas. O potencial anti-biofilme foi investigado através da quantificação da biomassa, avaliação da cultivabilidade celular e da atividade metabólica após incubação com o OE. Uma forte atividade antimicrobiana contra células planctónicas foi observada, sendo os valores de CIM e de CML entre 0,32 e 0,64 $\mu\text{L}/\text{mL}$. No entanto, a concentração de OE necessária para a erradicação das células planctónicas foi insuficiente para reduzir significativamente a biomassa de biofilme de alguns isolados. Porém, todos os isolados apresentaram uma redução significativa da cultivabilidade celular e atividade metabólica após incubação com o OE. O presente estudo mostrou o forte efeito antimicrobiano do OE de *T. capitata* e o seu promissor potencial anti-biofilme para o tratamento de infeções associadas a SARM.

Palavras-chave: biofilmes, terapia alternativa, atividade antibacteriana, CMI, produção de biomassa

ABSTRACT

***Thymbra capitata* essential oil antimicrobial potential against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an opportunistic pathogen considered by the World Health Organization (WHO) as a high-priority multi-resistant bacterium. In addition to the development of resistance to antibiotics, the ability to form biofilm is an underlying factor that makes it difficult to treat infections resulting from MRSA colonization. For this reason, new antimicrobial agents are being sought and essential oils (EOs) have been shown to be an important source of bioactive compounds. Since it has been reported in the literature that EO from *Thymbra capitata* has antimicrobial activity against several pathogens, the aim of the present work was to investigate the antimicrobial potential of this EO against clinical isolates of MRSA in planktonic growth and in biofilm. Isolates from septicemias, diabetic foot ulcers and osteomyelitis were used. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MLC) was investigated to verify the antibacterial effect against planktonic cells. The anti-biofilm potential was investigated through biomass quantification, evaluation of the number of cultivable cells and metabolic activity after incubation with EO. Strong antimicrobial activity against planktonic cells was observed, with MIC and MLC values between 0.32 and 0.64 $\mu\text{L}/\text{mL}$. However, the concentration of EO necessary for the eradication of planktonic cells was insufficient to significantly reduce the biofilm biomass of some isolates. However, all isolates showed a significant reduction in the number of cultivable cells and metabolic activity after incubation with OE. The present study showed the strong antimicrobial effect of the EO from *T. capitata* and its promising anti-biofilm potential for the treatment of infections associated with MRSA.

Keywords: biofilms, alternative therapy, antibacterial activity, MIC, biomass production

Dedico este trabalho àqueles que me apoiaram, me incentivaram e me inspiraram: A Deus, pelo dom da vida. À minha mãe, Maria Aparecida, pelo amor, cuidado, compreensão e conselhos. Aos meus irmãos, José Lucyan e Lucilayne, por não medirem esforços para me ajudar sempre que precisei. Aos Martins Coelho Nunes pelo apoio e carinho. Ao meu grande amigo e amor, Ricardo, pelo companherismo e por todas as vezes que me fez pensar mais um pouco sobre o mundo ao meu redor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Contextualização	15
1.2 Motivação.....	16
1.3 Objetivos	16
1.3.1 Geral	16
1.3.2 Específicos	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Bacteriologia de <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
2.1.1 Aspectos históricos e taxonômicos.....	17
2.1.2 Caracterização e identificação.....	18
2.1.3 Epidemiologia	19
2.2 <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (SARM)	20
2.3 Infecções associadas a SARM.....	21
2.3.1 Osteomielites.....	22
2.3.2 Septicemias.....	22
2.3.3 Úlceras nos pés de diabéticos.....	23
2.4 Fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade.....	23
2.5 Biofilme: o estilo de vida bacteriano predominante	25
2.5.1 Etapas do desenvolvimento do biofilme de <i>S. aureus</i>	27
2.5.1.1 Adesão	27
2.5.1.2 Multiplicação	28
2.5.1.3 Êxodo.....	28
2.5.1.4 Maturação	29
2.5.1.5 Dispersão	29
2.5.2 Relevância dos biofilmes em doenças infecciosas	30
2.6 Tratamentos convencionais.....	31
2.7 Compostos derivados de plantas como alternativa terapêutica.....	32
2.7.1 Óleos essenciais	33
2.7.1.1 Óleo essencial de <i>Thymbra capitata</i>	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Estirpes e condições de crescimento bacteriano.....	35
3.2 Agentes antimicrobianos.....	36

3.2.1 Óleos essenciais extraídos de <i>Thymbra capitata</i>	36
3.2.2 Antibióticos.....	36
3.3 Caracterização fenotípica referente à formação de biofilme	37
3.3.1 Otimização das condições de crescimento	37
3.3.2 Formação do biofilme	37
3.3.3 Quantificação da biomassa do biofilme	38
3.3.4 Análise da estrutura dos biofilmes por microscopia de laser de varrimento confocal (CLSM)	38
3.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima letal (CML) do OE de <i>T. capitata</i>	39
3.5 Determinação da suscetibilidade de biofilmes pré-formados à ação dos antimicrobianos.....	40
3.5.1 Efeito na biomassa do biofilme.....	40
3.5.2 Efeito na cultivabilidade celular	40
3.5.3 Efeito na atividade metabólica.....	41
3.6 Análise estatística	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Efeito da suplementação do meio de cultura e das condições hidrodinâmicas na formação de biofilmes	42
4.2 Caracterização fenotípica de isolados clínicos de SARM.....	44
4.2.1 Análise da resistência antimicrobiana e capacidade de produção de biofilme	44
4.2.2 Análise da estrutura do biofilme por CLSM	47
4.3 Avaliação da atividade antibacteriana do OE <i>T. capitata</i> em células planctônicas de SARM.....	49
4.4 Avaliação da atividade anti-biofilme do OE <i>T. capitata</i> contra isolados SARM.....	53
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	57
5.1 Principais conclusões	57
5.2 Perspetivas futuras	57
6. BIBLIOGRAFIA	59
7. ANEXO	80

LISTA DE SIGLAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

<i>Agr</i>	Gene regulador acessório
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American type culture collection
AtIA	Autolisina principal A
Bap	Proteína associada ao biofilme
CA-SARM	<i>S. aureus</i> resistente à metilina adquirido na comunidade
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
CIEPQPF	Centro de investigação em engenharia dos processos químicos e dos produtos da floresta
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	Microscopia de laser de varrimento confocal
CMEB	Concentração mínima de erradicação do biofilme
CMI	Concentração mínima inibitória
CML	Concentração mínima letal
Cna	Adesina de ligação ao colágeno
Coa	Coagulase
CoNS	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo
CoPS	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positivo
CV	Cristal de violeta
CVC	Coloração violeta de cristal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
e-ADN	Ácido desoxirribonucleico extracelular
Eap	Proteína de adesão extracelular
EbpS	Proteína de ligação à elastina
Efb	Proteína de ligação ao fibrinogénio extracelular
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridização fluorescente in situ
FnbpA	Proteína de ligação à fibronectina A
FnBpB	Proteína de ligação à fibronectina B
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
GRAS	Geralmente reconhecidos como seguros
HA-SARM	SARM adquirido no ambiente hospitalar
HQNO	4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide
IDSA	Sociedade de Doenças Infeciosas da América
MALDI-TOFMS	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MEC	Matriz extracelular
<i>mecA</i>	Gene de resistência à metilina A
MEP	Matriz extracelular polimérica
MicroART	Grupo de investigação em microbiologia e resistência aos antibióticos

MSCRAMMs	Componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz
MSF	Metossulfato de fenazina
NaCl	Cloreto de sódio
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMs	Plantas aromáticas e medicinais
PBP-2A	Proteína de ligação à penicilina 2A
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCS	Pico de concentração sérica
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Adesina polissacarídica intercelular
PNAG	poli-β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina
PSC	Pico de concentração sérica
PSMs	Modulinas solúveis em fenol
PVL	Panton-valentine leucocidina
QS	Mecanismos de deteção quorum
SAGs	Superantígenos
SARM	<i>S. aureus</i> resistente à metilina
SasG	Proteína de superfície G
SASM	<i>S. aureus</i> suscetível à metilina
SCCmec	Cassete cromossômica estafilocócica mec
SCVs	Pequenas colónias variantes
SERAMs	Moléculas adesivas de repertório expandido secretável
SpA	Proteína A
SSSS	Síndrome da pele escaldada estafilocócica
TEs	Toxinas esfoliativas
TFPs	Toxinas formadoras de poros
TSA	Caldo tríptico de soja suplementado com agar
TSB	Caldo tríptico de soja
TSB_G	TSB suplementado com glucose
TSB_{NaCl}	TSB suplementado com NaCl
TSST-1	Toxina-1 da síndrome do choque tóxico
UFCs	Unidades formadoras de colónias
UV	Ultravioleta
VBNC	Células viáveis mas não cultiváveis
WGA-TRITC	Aglutinina de germe de trigo conjugada com tetrametilrodamina
WTA	Ácido teicóico da parede
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

Símbolos:

°C	Graus celsius	h	Hora	nm	nanómetro
µg	Micrograma	L	Litro	Rcf	Rotações centrifugas
µL	Microlitro	m	Massa	Rpm	Rotações por minuto
µm	Micrómetro	M	Concentração molar	s	Segundos
%	Porcentagem	min	Minuto	v	Volume
g	Grama	mL	Mililitro		

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas do desenvolvimento do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i>: A) Adesão, B) Multiplicação, C) Êxodo, D) Maturação e E) Dispersão. e-ADN: ácido desoxirribonucleico extracelular, MSCRAMMs: componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz, PSMs: modulinas solúveis em fenol, <i>Agr.</i> gene regulador acessório.	27
Figura 2 Flores (A) e troncos (B) de <i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav. (Lamiaceae).	34
Figura 3 Formação de biofilmes em diferentes condições de cultura. Quantificação da capacidade de formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 após incubação em TSB, TSB _G e TSB _{NaCl} , com (■) e sem (□) agitação. Os dados são representados como média ± desvio padrão de dois ensaios independentes. As diferenças significativas são representadas como: ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$	43
Figura 4 Capacidade de formação de biofilme e perfil de resistência antimicrobiana de isolados clínicos de SARM. A percentagem de formação de biofilme foi avaliada através da capacidade de acumulação de biomassa por isolados clínicos provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabéticos (D) e osteomielites (O) comparativamente com a estirpe <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. O perfil de resistência dos isolados de <i>S. aureus</i> em relação aos antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina estão representados como: CIP – R (■, Resistente à ciprofloxacina), CIP – S (□, Sensível à ciprofloxacina), TET – R (■, Resistente à tetraciclina) e TET – S (□, Sensível à tetraciclina). Os antibiogramas foram realizados pelo grupo de investigação MicroART- UTAD. Os dados são representados como média ± desvio padrão de três ensaios independentes. As diferenças significativas são representadas como: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$	45
Figura 5 Composição macromolecular da matriz do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtida por microscopia confocal. A coloração com DAPI (azul) permite a deteção de ácidos nucleicos e a visualização de células bacterianas. A coloração WGA-TRITC (vermelho) indica a presença do conteúdo de polissacáridos atribuído à produção de PIA. Análise de colocalização de ambas as sondas é indicada como MERGED. Os biofilmes foram observados com uma objetiva de 10 x.	48
Figura 6 Imagem representativa da composição macromolecular da matriz de biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> obtida por CLSM. Matriz do biofilme do isolado proveniente de úlceras de pés de diabéticos (D15). A) regiões de alta densidade e B) regiões de baixa densidade. Imagens no eixo z foram conseguidas em intervalos de 2 µm. As regiões coradas com DAPI (azul) indicam a presença de ácidos nucleicos e as regiões coradas com WGA-TRITC (vermelho) indicam a presença de polissacáridos.	49
Figura 7 Estrutura de biofilmes de isolados clínicos de SARM. Imagens representativas da colocalização de ácidos nucleicos e polissacáridos presentes em biofilmes de isolados clínicos provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabético (D) e osteomielites (O), após coloração com DAPI e WGA-TRITC. Um eixo z é apresentado para cada biofilme. Os biofilmes foram observados com uma objetiva de 10 x.	50
Figura 8 Avaliação do potencial anti-biofilme do óleo essencial de <i>T. capitata</i>. Quantificação da (A) biomassa de biofilmes, (B) cultivabilidade celular e (C) atividade metabólica de isolados de SARM provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabéticos (D) e osteomielites (O) após incubação com TSB 24 h (■), TSB 48 h (□), ciprofloxacina (■), tetraciclina (■), TSB e DMSO (■) e OE (■). As concentrações utilizadas de cada antibiótico correspondem ao valor de pico de concentração sérica (PCS), sendo 4,5 mg/L para ciprofloxacina e 16,0 mg/L para tetraciclina. TSB 24 h indica a incubação por 24 h em TSB e TSB 48 h indica a incubação por 48 h em TSB. A concentração de OE e DMSO utilizadas correspondem a 0,64 µL/mL. Os valores são apresentados como média de três ensaios independentes e as barras indicam desvio padrão. As diferenças significativas são representadas como: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$	54

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1 Vantagens e limitações de diferentes técnicas utilizadas para a identificação de bactérias.	19
Tabela 2 Composição química dos três óleos essenciais de <i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav. (Lamiaceae).	36
Tabela 3 Mecanismos de ação e pico de concentração sérica (PCS) dos antibióticos ciproflxacina e tetraciclina.	36
Tabela 4 Determinação das concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) do óleo essencial de <i>Thymbra capitata</i> L. contra isolados clínicos SARM.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal, que coloniza cerca de 30 % da população humana (Wertheim et al., 2005). No entanto, é também um agente patogénico humano responsável por diversas infeções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015). Este patógeno causa diversas infeções clinicamente relevantes como bacteremia, endocardite e osteomielite (Tong et al., 2015). Além disso, é particularmente hábil em colonizar a superfície de dispositivos médicos implantados (Donlan, 2001). *S. aureus* possui diversos fatores de virulência que permitem a adesão das células bacterianas à superfície das células do hospedeiro, a evasão ao seu sistema imune e a conversão do tecido do hospedeiro em nutrientes (Bien, Sokolova, & Bozko, 2011). A expressão de fatores de adesão, como a proteína A (SpA) e a Proteína de Ligação à Fibronectina A (FnbpA), permitem a colonização inicial pelas células bacterianas. Porém, após a colonização, as células de *S. aureus* possuem a capacidade de formar biofilmes, e esta habilidade tem sido considerada um importante fator de virulência deste patógeno (Elasri et al., 2002; McCarthy et al., 2015).

Um biofilme é uma comunidade estruturada de bactérias aderidas a uma superfície e que é envolvida por uma matriz extracelular polimérica (MEP) composta por polissacarídeos, proteínas e ADN extracelular (e-ADN) (Costerton et al., 1987; López et al., 2010; Watnick & Kolter, 2000). A formação de biofilmes representa um mecanismo de sobrevivência para as bactérias, uma vez que o confinamento numa matriz permite que as células bacterianas permaneçam num microambiente protegido das fontes de stresse do meio exterior (Høiby, Bjarnsholt, Givskov, Molin, & Ciofu, 2010). Adicionalmente, os biofilmes são clinicamente relevantes e representam cerca de 80 % das infeções bacterianas (Lynch e Robertson, 2008). Além de aumentar os custos relativos à assistência médica (Lynch & Robertson, 2008), as infeções associadas aos biofilmes causam grandes problemas de saúde em todo o mundo, contribuindo significativamente para a morbilidade do paciente (Graf et al., 2019; Römling & Balsalobre, 2012). O desenvolvimento de osteomielites, periodontites, feridas crónicas, endocardites e infeções oculares são exemplos de doenças causadas por *S. aureus* que estão relacionadas com sua capacidade de formar biofilme (Archer et al., 2011). Uma vez estabelecidos, os biofilmes de *S. aureus* são recalcitrantes à resposta imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos convencionais (Stewart & Costerton, 2015). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é urgente.

1.2 Motivação

A resistência aos antibióticos é uma crise crescente, tendo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) declarado que a resistência aos antibióticos é uma preocupação global de saúde pública. Devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana aos diversos antibióticos utilizados na prática clínica, o interesse pela descoberta de agentes antimicrobianos alternativos tem aumentado (Magi, Marini, & Facinelli, 2015). Durante as últimas décadas, as terapias que envolvem a utilização de produtos naturais têm-se mostrado como uma estratégia promissora para a identificação de novos compostos antimicrobianos (Assis, Nedeljković, & Dessen, 2017). Especificamente, os produtos do metabolismo secundário das plantas, como os óleos essenciais (OEs), têm sido utilizados desde a antiguidade até os dias atuais para fins terapêuticos (Hyltdgaard, Mygind, & Meyer, 2012). Além da ação antimicrobiana direta, diversos autores destacam ainda que os OEs têm ação adjuvante, aumentando assim o efeito de antibióticos convencionais (Buldain et al., 2018; Langeveld, Veldhuizen, & Burt, 2014; Magi et al., 2015; Rosato, Vitali, Laurentis, Armenise, & Milillo, 2007). Em particular, o OE de *Thymbra capitata* tem demonstrado efeito antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* (Faleiro et al., 2005), *Gardnerella vaginalis* (Palmeira-De-Oliveira et al., 2012a), *Escherichia coli* (Delgado-Adámez et al., 2017), *Salmonella typhimurium* (Karampoula et al., 2016), *Candida* spp. (Palmeira-De-Oliveira et al., 2012) e *Aspergillus* spp. (Salgueiro et al., 2004). Devido ao seu potencial antimicrobiano contra uma ampla gama de agentes patogênicos, o OE de *T. capitata* pode ser um forte candidato para o tratamento de infecções decorrentes da formação de biofilmes por *S. aureus* resistente à metilicina (SARM).

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do OE de *T. capitata* contra isolados clínicos de SARM provenientes de diferentes infecções.

1.3.2 Específicos

- a) Determinar a capacidade de formação de biofilmes dos diferentes isolados clínicos;
- b) Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima Letal (CML) do OE de *T. capitata* contra os isolados SARM em crescimento planctônico;

c) Determinar o efeito da CML do OE de *T. capitata* na capacidade de reduzir biofilmes de SARM e comparar a sua ação com a diferentes antibióticos usados na prática clínica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacteriologia de *Staphylococcus* spp.

2.1.1 Aspetos históricos e taxonómicos

O género *Staphylococcus* foi cunhado por Alexander Ogston, um cirurgião e bacteriologista escocês, combinando o prefixo "staphylo" (do grego antigo: cacho de uvas) e o sufixo "coccus" (do latim moderno: bactéria esférica; e do do grego antigo: "grãos, sementes, bagas") para classificar o grupo de micrococcos causadores de inflamação e supuração (Götz, Bannerman, & Schleifer, 2006). Até à década de 1970, existiam apenas 10 espécies identificadas (Becker, Heilmann, & Peters, 2014); atualmente o género *Staphylococcus*, pertencente à família Staphylococcaceae (ordem Bacillales), possui 54 espécies e 28 subespécies descritas (Euzéby, 1997).

Assim como para outros géneros, a taxonomia de *Staphylococcus* spp. passou por diversas reclassificações, sendo ajustada consoante o avanço das ferramentas utilizadas pelos taxonomistas (Mahato et al., 2017). Em 1884, Rosenbach recuperou diferentes bactérias de abscessos nas suas experiências com animais e classificou como *Staphylococcus pyogenes aureus* (*aurum* - do latim: ouro) as que produziam pigmento amarelo, e *Staphylococcus pyogenes albus* (*album* - do latim: branco) as que produziam pigmento branco (Becker et al., 2014). A cor do pigmento produzido pelas colónias foi o critério inicial utilizado para a classificação das espécies estafilocócicas. No entanto, mais tarde descobriu-se que a subespécie "albus", descrita por Rosenbach, seria provavelmente um isolado de *S. aureus* que não apresentava pigmento quando em meio sólido (Becker et al., 2014). Desse modo, a utilização do pigmento como único critério para classificação mostrou-se insuficiente, uma vez que esta característica não é geneticamente estável (Becker et al., 2014; Fairbrother, 1940; Kloss, 1980). Ao longo das décadas, novos critérios de classificação foram desenvolvidos e a capacidade de coagular o sangue, mediante a produção da enzima coagulase, permitiu a separação das espécies de *Staphylococcus* em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase-positivo (CoPS) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (CoNS) (Crosby, Kwiecinski, & Horswill, 2016; Loeb, 1903). Como exemplos de espécies CoPS pode mencionar-se *S. aureus* (patógeno humano), *S. intermedius* e *S. hyicus* (patógenos de animais domésticos), e como exemplos de CoNS pode referir-se *S. epidermidis* e *S. hominis* (Harris et al., 2002;

Mendoza-Olazarán et al., 2013). Estafilococos patogénicos são comumente identificados pela sua capacidade de produzir coagulase (Harris et al., 2002; Schmidt et al., 2014). As bactérias CoPS podem escapar das defesas do hospedeiro isolando o local da infecção através da formação de um coágulo, que confere uma barreira de proteção (Muray, Rosenthal, & Pfaller, 1990; Zapotoczna, McCarthy, Rudkin, O’Gara, & O’Neill, 2015). Dentro do grupo CoPS, a espécie *S. aureus* é clinicamente a mais relevante (Becker et al., 2014). No entanto, é importante referir que algumas estirpes de *S. aureus* podem ser atípicas e apresentam um perfil CoNS (Akineden, Hassan, Schneider, & Usleber, 2011; Malinowski, Lassa, Kłossowska, Smulski, & Kaczmarowski, 2009). Por esse motivo, diferentes ensaios devem ser combinados para uma correta identificação a nível específico (Brown et al., 2005).

2.1.2 Caracterização e identificação

Os estafilococos são bactérias esféricas com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, que, geralmente, encontram-se sob a forma de cachos irregulares, devido ao facto da sua divisão celular ocorrer em três planos perpendiculares (Monteiro et al., 2015). Além disso, são bactérias gram-positivas, não móveis, anaeróbicas facultativas, catalase-positivo, oxidase-negativo e não formadoras de esporos (Harris et al., 2002). *S. aureus* é uma bactéria com uma grande plasticidade fisiológica, por isso consegue adaptar-se a diferentes condições ambientais, o que faz deste microrganismo o agente patogénico causador de uma larga variedade de infeções que ameaçam a saúde (Liang et al., 2011; Lowy, 2003). Estas bactérias conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 7 e 46 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37 °C (Onyango, Dunstan, Gottfries, Eiff, & Roberts, 2012). Podem ainda sobreviver dentro de uma faixa de pH entre 4 e 10 (Lampila & McMillin, 2012) e são capazes de crescer em altas concentrações de NaCl ($\geq 1,7$ M) (Clements & Foster, 1999).

S. aureus é uma bactéria frequentemente associada a graves infeções. Por esse motivo, uma identificação rápida e precisa é de extrema importância (Martineau, Picard, Roy, Ouellette, & Bergeron, 1998; Qian, Eichelberger, & Kirby, 2014). Existem diferentes métodos para identificar isolados de *S. aureus*, sendo os testes fenotípicos os mais utilizados (Váradi et al., 2017). Entre estes, destacam-se os testes de coagulase de lâminas e tubos, testes de aglutinação do látex e crescimento em meio de cultura agar sal manitol (Kateete et al., 2010). As técnicas baseadas em cultura de microrganismos apresentam algumas limitações, como o tempo necessário para o crescimento bacteriano. Por outro lado, métodos moleculares de identificação apresentam alta especificidade e podem superar as limitações dos métodos convencionais (Johnson et al., 2016). Pode citar-se, como exemplo, a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês polymerase chain reaction) para a deteção direta do gene de resistência à

meticilina (*mecA*), que permite a identificação de espécimes de SARM (Chen, Zhao, Guo, Li, & Chen, 2017). Diferentes técnicas utilizadas para a identificação de bactérias, bem como suas vantagens e limitações, podem ser consultadas na tabela 1.

Tabela 1 | Vantagens e limitações de diferentes técnicas utilizadas para a identificação de bactérias.

Técnicas	Vantagens	Limitações	Referências
Testes enzimáticos (ex: catalase)	Fácil execução Alta sensibilidade Baixo custo	Tempo de realização Não permite identificar células não cultiváveis	(FrancoDuarte et al., 2019; Sandle, 2016)
Meios cromogênicos (ex: ChromID <i>S. aureus</i>)	Fácil execução Permite detetar culturas mistas Permite detetar estirpes resistentes	Tempo de realização Processo moroso Não permite identificar células não cultiváveis	(Gaillot, Wetsch, Fortineau, & Berche, 2000; Perry, 2017)
Testes serológicos (ex: aglutinação em látex)	Fácil execução Alta sensibilidade	Necessidade de grandes quantidades de antígeno	(Fournier et al., 1993; Shijia Wu et al., 2016)
Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	Rapidez Facilidade do uso métodos de coloração combinada com a especificidade dos métodos moleculares	Teste limitado pela disponibilidade de antígenos Necessidade de recursos humanos especializados	(FrancoDuarte et al., 2019; Frickmann et al., 2017)
PCR em tempo real	Não necessita cultivo da amostra Específico Rapidez Menor risco de contaminação	Necessidade de recursos humanos especializados Tempo de realização Alto custo para aquisição de equipamentos e reagentes	(Girones et al., 2010; Maurin, 2012)
ADN microarrays	Permite a análise simultânea de diferentes genes e a sua expressão genética	Alto custo Necessidade de recursos humanos especializados	(Monecke et al., 2013; Shittu et al., 2015; Spence et al., 2008)
Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOFMS)	Rapidez Precisão Baixo custo por teste Fácil execução	Requer cultura pura Identificação limitada pela base de dados Alto custo inicial do equipamento MALDI-TOF	(Cobo, 2013; Dingle & Butler-Wu, 2013; Segawa et al., 2014; Singhal, Kumar, Kanaujia, & Viridi, 2015)

2.1.3 Epidemiologia

S. aureus é uma bactéria que se destaca por interagir com seu hospedeiro quer de forma inócua ou patogénica (Krismer, Weidenmaier, Zipperer, & Peschel, 2017). Estima-se que 20 % dos indivíduos da população mundial sejam portadores persistentes de *S. aureus* e que 60 % sejam portadores intermitentes (Elward, McAndrews, & Young, 2009). No entanto, Wertheim e colaboradores (2005) destacaram que os indivíduos reconhecidos como não portadores, podem na realidade ser portadores

intermitentes. Além disso, é importante referir que vários animais são considerados reservatórios naturais de *S. aureus*. Este agente patogénico pode causar infeções cutâneas clinicamente simples em indivíduos saudáveis, como furúnculos e abscessos (Foster, 2005). No entanto, *S. aureus* é um microrganismo oportunista que pode causar graves infeções em indivíduos mais vulneráveis (Stapleton & Taylor, 2002). Atualmente, *S. aureus* é uma das bactérias patogénicas humanas mais frequentes em todo o mundo, com a capacidade de ser o agente causador de uma ampla gama de doenças infecciosas (Brett & Bradfute, 2015; Otto, 2010). De acordo com a Rede Nacional de Segurança em Saúde, nos Estados Unidos da América (EUA), *S. aureus* foi a principal bactéria patogénica isolada de infeções na corrente sanguínea (Weiner-Lastinger et al., 2020). Na Europa, de modo semelhante, *S. aureus* também é o microrganismo mais comumente encontrado em infeções associadas às cirurgias (Monaco, Araujo, Cruciani, Coccia, & Pantosti, 2016) .

Esta bactéria pode ser isolada em diferentes locais do corpo, como pele, vagina, trato gastrointestinal, axila e narinas (Sakr, Brégeon, Mège, Rolain, & Blin, 2018). No entanto, o nariz é o local mais frequente de colonização para *S. aureus* (Wertheim et al., 2005). Para além disso, células de *S. aureus* podem sobreviver durante até 7 meses em diferentes tipos de superfícies abióticas, sendo estas, portanto, uma importante fonte de transmissão deste agente patogénico (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006).

2.2 *S. aureus* resistente à meticilina (SARM)

A descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, deu início a uma nova era na medicina. Em 1940, após o início da Segunda Guerra Mundial, a penicilina foi desenvolvida para fins terapêuticos em escala industrial (Elward et al., 2009). No entanto, apesar do seu potente efeito bactericida, *S. aureus* rapidamente desenvolveu resistência a este antibiótico (Elward et al., 2009), pois algumas estirpes possuem a capacidade de produzir penicilinase (também conhecida como β -lactamases). A resistência deriva do efeito da penicilinase, que hidrolisa o anel beta-lactâmico da penicilina, o fator essencial para a sua atividade antimicrobiana (Chambers & DeLeo, 2009). De modo a ultrapassar os mecanismos de resistência apresentados por *S. aureus*, o antibiótico meticilina (um derivado semi-sintético da penicilina) foi desenvolvido e, em 1959, foi introduzido na Europa (Harkins et al., 2017). Nos EUA a introdução do novo medicamento só aconteceu em 1961. Contudo, no mesmo ano foi relatado o primeiro surto de infeções causadas por isolados de SARM nos hospitais europeus (Chambers, 1997).

As estirpes SARM diferem das estirpes de *S. aureus* suscetível à meticilina (SASM) pela presença do gene *mecA* no seu genoma. Este gene encontra-se na cassete cromossómica SCCmec, um elemento

genético móvel, que provavelmente é proveniente da espécie estafilocócica *S. sciuri* (Stapleton & Taylor, 2002; Shang Wu, Lencastre, & Tomasz, 2001). Este gene codifica a proteína de ligação à penicilina (PBP-2A), uma proteína presente na parede celular bacteriana que tem uma menor afinidade para alguns antibióticos, conferindo, assim, resistência à metilina e aos medicamentos β -lactâmicos, tais como a penicilina e a cefalosporina (Berger-Bächli & Rohrer, 2002; Elhassan, Ozbak, Hemeg, Elmekki, & Ahmed, 2015; Elward et al., 2009; Lakhundi & Zhang, 2018; Stapleton & Taylor, 2002). Além de estarem associados com uma significativa taxa de mortalidade e morbidade, os isolados de SARM causam ainda um grande impacto económico (Elward et al., 2009). Nos EUA, por exemplo, foram investidos entre 830 milhões e 9,7 mil milhões de dólares no tratamento e na triagem de isolados SARM, em 2005 (Klein, Smith, & Laxminarayan, 2007). Apesar dos esforços, no mesmo ano ocorreram 18 mil mortes decorrentes de infeções por SARM (de um total de 94 mil casos de infeções invasivas) (Klein et al., 2007).

Historicamente, as infeções decorrentes de SARM eram adquiridas em ambiente hospitalar. Porém, no final da década de 1990 observou-se a manifestação de infeções por SARM em indivíduos sem histórico de internamento hospitalar (Elward et al., 2009). Esta observação culminou na categorização das infeções por SARM em dois grupos: SARM adquirido no ambiente hospitalar (HA-SARM) e SARM adquirido na comunidade (CA-SARM). É importante realçar que as estirpes de cada grupo diferem em relação às suas características clínicas, genéticas e em termos de suscetibilidade a agentes antimicrobianos (Kateete et al., 2019). As estirpes CA-SARM possuem, geralmente, SCCmec dos tipos IV ou V, são suscetíveis a antibióticos não- β -lactâmicos e possuem genes para a expressão da toxina panton-valentine leucocidina (PVL, Panton-Valentine Leukocidin), que, por sua vez, confere o aumento da virulência. Por outro lado, as estirpes HA-SARM transportam o SCCmec do tipo I, II ou III, são resistentes a múltiplas drogas e não produzem PVL (Choo, 2017; David & Daum, 2010; David Patrick Kateete et al., 2019). A idade avançada e o estado de saúde de um indivíduo são agravantes para o estabelecimento de infeções causadas por isolados HA-SARM. No entanto, tem-se observado que as infeções por CA-SARM ocorrem frequentemente em pacientes jovens e saudáveis (David & Daum, 2010; Elward et al., 2009).

2.3 Infeções associadas a SARM

As estirpes de SARM podem ser o agente etiológico de infeções como septicemia, pneumonia, meningite, endocardite, infeções osteoarticulares, infeções cutâneas e infeções relacionadas com dispositivos médicos (Tong et al., 2015). Uma vez que os isolados clínicos utilizados no presente trabalho são

provenientes de osteomielites, septicemias e úlceras em pés de diabéticos, o foco principal desta secção será dado às respectivas infeções.

2.3.1 Osteomielites

A osteomielite é uma infeção óssea que resulta em inflamação e necrose óssea (Birt, Anderson, Bruce Toby, & Wang, 2017; Lew & Waldvogel, 2004). Alguns fatores de risco como idade avançada, imunossupressão e diabetes mellitus são agravantes para o estabelecimento desta infeção (Akiyama et al., 2013; Bhavan et al., 2010; Lew & Waldvogel, 2004; McHenry, Easley, & Locker, 2002). No entanto, tem-se observado que osso saudável é geralmente muito resistente à infeção, ou seja, a infeção só acontece mediante a existência de um trauma direto ou um grande inóculo bacteriano (Tong et al., 2015). *S. aureus* é a causa predominante de osteomielite (Shi & Xianlong, 2012) e, através da produção de proteínas de adesão, as células bacterianas são capazes de se ligarem à matriz óssea e formarem biofilmes (Tong et al., 2015). Os biofilmes são comunidades bacterianas organizadas de modo a facilitar a colonização e a sobrevivência das células bacterianas num novo ambiente. As bactérias em biofilmes são menos sensíveis aos agentes antimicrobianos, o que pode explicar os casos de persistência da osteomielite (Brady, Leid, Calhoun, Costerton, & Shirtliff, 2008) (uma discussão detalhada é apresentada na secção 2.5.2). Além disso, *S. aureus* apresenta ainda outro mecanismo importante para a persistência e recorrência de osteomielite: a capacidade de invadir osteoblastos e formar pequenas colónias variantes ou SCVs (do inglês, small-colony variants) (Garzoni & Kelley, 2009; Shi & Xianlong, 2012). Em contraste com o fenótipo normal, as SCVs possuem características morfológicas e fisiológicas incomuns, como um crescimento lento, ausência de pigmentação em meio sólido, redução das reações bioquímicas e suscetibilidade alterada aos antibióticos (Proctor et al., 2006).

2.3.2 Septicemias

As septicemias desenvolvem-se a partir da presença de bactérias no sangue (bacteremia). Este tipo de infeção geralmente ocorre quando uma infeção bacteriana, presente em uma parte do organismo, entra na corrente sanguínea e é desencadeada uma resposta inflamatória sistémica no hospedeiro (Otto, 2017; Powers & Wardenburg, 2014). A septicemia é a infeção causada por *S. aureus* mais bem descrita (Tong et al., 2015). Esta infeção causa milhões de mortes em todo o mundo, sendo a mais frequente causa de morte em pacientes hospitalizados (Otto, 2017). A idade é um fator de risco importante para o estabelecimento de septicemias. Diversos estudos mostram altas taxas de incidência em crianças com até um 1 ano de idade, uma baixa incidência entre adultos jovens e um aumento da incidência em

pessoas acima dos 70 anos (Allard et al., 2008; Landrum et al., 2012; Laupland et al., 2013). As fontes de infecção para o desenvolvimento de um quadro de septicemia podem ser diversas, porém o uso de dispositivos médicos e algumas infecções precedentes específicas (infecções de pele, pleuropulmonares e osteoarticulares) são relatadas como os principais focos primários para o desenvolvimento de bacteremia (Hassoun, Linden, & Friedman, 2017; Tong et al., 2015).

2.3.3. Úlceras nos pés de diabéticos

As úlceras nos pés são um problema comum em pessoas com diabetes mellitus e facilitam o desenvolvimento de infecções (Mottola et al., 2016). As infecções em pés de diabéticos são definidas como infecções nos tecidos moles ou nos ossos abaixo dos maléolos (Gemechu, Seemant, & Curley, 2013). Apesar de geralmente serem infecções polimicrobianas (Vardakas, Horianopoulou, & Falagas, 2008), *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais prevalentes nesse tipo de infecção (Spichler, Hurwitz, Armstrong, & Lipsky, 2015). A colonização por bactérias patogênicas nos pés de pacientes portadores de diabetes mellitus é uma causa frequente de hospitalização que, em casos mais graves, pode resultar na amputação dos membros inferiores (Lavery et al., 2006; Mottola et al., 2016). Alguns traumas, como feridas que penetraram até os ossos, feridas com longa duração (cerca de 30 dias), feridas recorrentes e a presença de doença vascular periférica podem aumentar o risco de infecção (Lavery et al., 2006). Nos últimos anos, o principal problema para o tratamento de infecções nos pés de diabéticos tem sido o aumento da resistência às terapias antibióticas (Spichler et al., 2015). Sem dúvida, as infecções estafilocócicas são hoje uma preocupação mundial dado os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos estafilococos para evitar o sistema imunológico do hospedeiro e o tratamento com antibióticos (Kavanagh et al., 2018).

2.4 Fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade

Os estafilococos possuem uma grande variedade de fatores de virulência que promovem a sua adesão às células do hospedeiro, permitem a penetração nos tecidos e contribuem para a evasão das defesas imunológicas do hospedeiro (Santos et al., 2007). A capacidade de adesão aos componentes da matriz extracelular (MEC, do inglês extracellular matrix), às proteínas plasmáticas e às células do hospedeiro, é um fator crucial para permitir a colonização e a disseminação das células bacterianas durante a infecção (Clarke & Foster, 2006; Dastgheyb & Otto, 2015). O processo de adesão bacteriana pode ser mediado por adesinas presentes na superfície ou por adesinas secretadas (Heilmann, 2011). As adesinas de superfície são normalmente conhecidas como MSCRAMMs (do inglês microbial surface components

recognizing adhesive matrix molecules ou componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz) (Clarke & Foster, 2006; Foster & Höök, 1998). Entre as MSCRAMMs podem mencionar-se as proteínas de ligação à fibronectina A e B (FnBpA e FnBpB, fibronectin-binding protein – são capazes de se ligarem a fibronectina, fibrinogénio e a elastina) (Greene et al., 1995); a adesina de ligação ao colágeno (Cna, collagen-binding adhesin – é responsável pela adesão ao colágeno tipo I e IV) (Patti et al., 1995); e a proteína de ligação à elastina (EbpS, elastin-binding protein – promove a ligação com a elastina e tropoelastina) (Downer, Roche, Park, Mecham, & Foster, 2002). As adesinas secretadas são chamadas de moléculas adesivas de repertório expandido secretável (vulgarmente conhecidas como SERAMs, do inglês Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) (Chavakis, Wiechmann, Preissner, & Herrmann, 2005). Entre as SERAMs podem destacar-se proteína de adesão extracelular (Eap, extracellular adherence protein – permite a ligação entre a células bacterianas e as células do hospedeiro) (Athanasopoulos et al., 2006); a coagulase (Coa, coagulase – interage com o fibrinogénio e induz a formação de coágulos de fibrina através da ativação da protrombina) (McDevitt, Vaudaux, & Foster, 1992); e a proteína de ligação ao fibrinogénio extracelular (Efb, extracellular fibrinogen-binding protein – atrai fibrinogénio para a superfície bacteriana e forma um escudo para proteger as bactérias da fagocitose) (Wade et al., 1998). Para além de contribuírem para a adesão da célula bacteriana a uma superfície-alvo, as SERAMs podem ainda interferir com os mecanismos de defesa do hospedeiro (Hammel, Němeček, Keightley, Thomas, & Geisbrecht, 2007). A proteína Eap, por exemplo, bloqueia o recrutamento de neutrófilos (Eisenbeis et al., 2018; Hagggar, Ehrnfelt, Holgersson, & Flock, 2004). Além destas proteínas, *S. aureus* possui adesinas não proteicas, como o ácido teicóico da parede (WTA, wall teichoic acids) (Athanasopoulos et al., 2006; Heilmann, 2011), que promove a adesão ao tecido do hospedeiro e a superfícies abióticas, como vidro e poliestireno (Brown, Santa Maria, & Walker, 2013; Gross, Cramton, Go, & Peschel, 2001; Swoboda, Campbell, Meredith, & Walker, 2010). Após a colonização do hospedeiro, a produção de adesinas é importante para que as células de *S. aureus* possam iniciar a infeção (Foster & Höök, 1998).

A capacidade de secretar toxinas é outra característica importante de *S. aureus* (Arciola et al., 2011; Grumann, Nübel, & Bröker, 2014). As toxinas estafilocócicas podem ser divididas em três grupos: toxinas formadoras de poros (TFPs), toxinas esfoliativas (TEs) e superantígenos (SAGs) (Oliveira, Borges, & Simões, 2018). As TFPs contribuem para o efluxo de moléculas e metabolitos vitais, tendo, portanto, um efeito citolítico nas células do hospedeiro. Neste grupo, a α -hemolisina é provavelmente o fator de virulência mais caracterizado de *S. aureus* (Vandenesch, Lina, & Henry, 2012). É secretada na sua forma solúvel, que é capaz de penetrar na célula eucariota e, após a sua internalização, a toxina é oligomerizada

e, posteriormente, forma poros na membrana celular do hospedeiro (DuMont & Torres, 2014; Menestrina, Serra, & Prévost, 2001). Esta toxina possui efeito citolítico para uma ampla gama de células humanas, incluindo células epiteliais, células endoteliais, células T e macrófagos (Berube & Wardenburg, 2013; Nygaard et al., 2012). As leucotoxinas são uma série de toxinas que possuem capacidade citolítica contra monócitos, macrófagos e neutrófilos, tais como a PVL e γ -hemolisina (Ventura et al., 2010). As modulinas solúveis em fenol (PSMs, phenol-soluble modulins) fazem parte de uma família de pequenos peptídeos anfipáticos com propriedades citolíticas e pró-inflamatórias (Grumann et al., 2014) e têm diferentes papéis durante a patogênese estafilocócica, como a lise dos eritrócitos e leucócitos, e o estímulo de respostas inflamatórias (Peschel & Otto, 2013). A β -hemolisina também é uma toxina que provoca comprometimento da membrana celular. Esta toxina é capaz de hidrolisar as esfingomielinas (lípidio de membrana) presentes na superfície celular (Huseby et al., 2007). A hidrólise de esfingomielinas, provoca modificações na fluidez da membrana plasmática da célula do hospedeiro, levando a desestabilização da estrutura de bicamada (Vandenesch et al., 2012). A β -hemolisina é citolítica para queratinócitos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos e células T (Huseby et al., 2007; Katayama, Baba, Sekine, Fukuda, & Hiramatsu, 2013).

As TEs produzidas por *S. aureus* são proteases serínicas extremamente específicas que clivam as moléculas que promovem a adesão célula-célula entre os queratinócitos da epiderme (Nishifuji, Sugai, & Amagai, 2008). Essa perda de adesão celular facilita a invasão bacteriana e o estabelecimento de infecções cutâneas, como a síndrome da pele escaldada estafilocócica (staphylococcal scalded skin syndrome – SSSS) (Yamasaki et al., 2005). Várias toxinas estafilocócicas apresentam propriedades de SAGs, como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Lina et al., 2004). Os SAGs estimulam as células T, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (Xu & McCormick, 2012). Para além dos mecanismos de virulência mencionados, a formação de biofilme também é um importante mecanismo para o estabelecimento das infecções estafilocócicas, pois permite que as bactérias resistam às defesas do hospedeiro (Khoramian, Jabalameli, Niasari-Naslaji, Taherikalani, & Emaneini, 2015). E, como já referido também, as células em biofilme possuem diversos mecanismos que aumentam a tolerância aos antibióticos (uma discussão detalhada é apresentada na secção 2.5.2).

2.5 Biofilme: o estilo de vida bacteriano predominante

Os biofilmes são amplamente distribuídos nos ecossistemas naturais, em sistemas artificiais e no contexto clínico (Davey & O'toole, 2000; Donlan & Costerton, 2002). A primeira visualização deste tipo

de estrutura foi realizada por Antonie van Leeuwenhoek, em 1684, ao observar agregados microbianos provenientes dos seus próprios dentes (Donlan & Costerton, 2002). Nas últimas décadas, a definição de biofilme passou por diversas adaptações (Høiby, 2017). O termo “filme” foi inicialmente utilizado para distinguir bactérias que possuem a capacidade de formar camadas de células aderidas a uma superfície (sésseis) das bactérias de natação livre (planctónicas) (Zobell & Allen, 1935). Atualmente, é amplamente aceite que um biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana séssil em que as células estão aderidas a uma superfície e envolvidas por uma MEP (Donlan & Costerton, 2002; Kiedrowski & Horswill, 2011; Moormeier & Bayles, 2017). Além de considerar as características facilmente observáveis, devem também considerar-se atributos fisiológicos. Portanto, as células bacterianas em biofilmes apresentam um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e à transcrição de genes, comparativamente às bactérias planctónicas (Donlan & Costerton, 2002).

Os biofilmes maduros podem possuir uma alta densidade celular (10^8 a 10^{11} células g^{-1} de peso húmido) (Flemming et al., 2016). Na maioria dos biofilmes, a maior parte da biomassa não é composta por células microbianas, mas pela MEP. A MEP é constituída por água e por biomoléculas autoproduzidas como proteínas, hidratos de carbono, lípidos e e-ADN (Flemming & Wingender, 2010). Materiais inorgânicos, que variam de acordo com o ambiente em que o biofilme se desenvolveu, também podem estar presentes na constituição da MEP (Donlan, 2002). Diversas funções são atribuídas à MEP, como manter um microambiente altamente hidratado ao redor das células, dificultar a ação de agentes antimicrobianos, e servir como uma fonte de carbono, azoto e fósforo para a comunidade bacteriana no biofilme (Flemming & Wingender, 2010).

Os biofilmes são frequentemente encontrados na natureza em consórcios com várias espécies microbianas (Elias & Banin, 2012). Do ponto de vista clínico, uma das consequências desse tipo de interação está associada ao aumento da tolerância aos agentes antimicrobianos (Elias & Banin, 2012). Por exemplo, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são espécies que interagem sinergicamente durante infeções em fibrose cística (Harrison, 2007). *P. aeruginosa* é capaz de produzir 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO), que aumenta a resistência de *S. aureus* a agentes antimicrobianos (Hoffman et al., 2006) e, conseqüentemente, aumenta a sua capacidade de persistir e formar biofilmes (Singh, Ray, Das, & Sharma, 2009).

2.5.1 Etapas do desenvolvimento do biofilme de *S. aureus*

O desenvolvimento de um biofilme é um processo que varia de acordo com a espécie bacteriana e envolve diferentes etapas. O modelo clássico sobre o desenvolvimento de um biofilme consiste em três passos: (1) adesão, (2) acumulação/maturação e (3) destacamento/dispersão (Otto, 2013). No entanto, devido aos avanços das tecnologias microscópicas e da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes por *S. aureus*, um novo modelo foi proposto por Moormeier e Bayles (2017), sendo este modelo dividido em cinco etapas sequenciais: (1) adesão, (2) multiplicação, (3) êxodo, (4) maturação e (5) dispersão (Fig. 1).

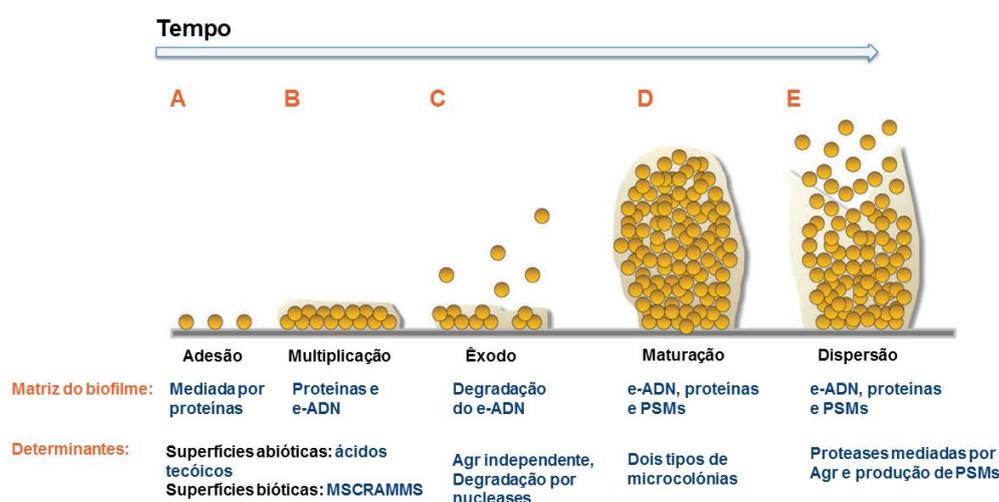


Figura 1 | Etapas do desenvolvimento do biofilme de *Staphylococcus aureus*: A) Adesão, B) Multiplicação, C) Êxodo, D) Maturação e E) Dispersão. e-ADN: ácido desoxirribonucleico extracelular, MSCRAMMs: componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz, PSMs: modulinas solúveis em fenol, *Agr*: accessory gene regulator. Adaptado de Moormeier e Bayles, 2017.

2.5.1.1 Adesão

A primeira etapa da formação do biofilme é marcada pela ligação das células planctônicas a uma superfície, biótica ou abiótica. A ligação a superfícies bióticas é mediada por proteínas presentes na parede celular ou por proteínas secretadas (conforme já referido na secção 2.4.1). Estas proteínas desempenham um papel fundamental na primeira etapa de formação do biofilme, pois são capazes de se ligarem a diferentes componentes da matriz do hospedeiro, como fibronectina, fibrinogénio e colagénio (Foster, Geoghegan, Ganesh, & Höök, 2014). Por outro lado, estas proteínas desempenham um papel menos relevante quando a ligação acontece em superfícies abióticas (Moormeier & Bayles, 2017). A adesão a superfícies inertes é realizada principalmente através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Gross et al., 2001; Kennedy & O’Gara, 2004). Contudo, alguns estudos destacam o papel dos WTAs e

da autolisina principal A (AtIA) no processo de fixação à superfícies de poliestireno e vidro (Biswas et al., 2006; Gross et al., 2001; Houston, Rowe, Pozzi, Waters, & O’Gara, 2011).

2.5.1.2 Multiplicação

A etapa de multiplicação é caracterizada pela divisão e acumulação celular após a adesão a uma superfície (Moormeier & Bayles, 2017). No início desta etapa as novas células estão vulneráveis às tensões de corte associadas ao fluxo de fluidos presentes no meio exterior e, de modo a evitar o destacamento das células do biofilme imaturo, as células de *S. aureus* produzem diversos fatores para manter a estabilidade do biofilme imaturo (McCourt, O’Halloran, McCarthy, O’Gara, & Geoghegan, 2014; Moormeier & Bayles, 2017). Algumas MSCRAMMs, como as proteínas FnBPs, possuem um duplo papel, participando tanto da etapa de adesão, como contribuindo para as interações célula-célula durante a multiplicação (Speziale, Pietrocola, Foster, & Geoghegan, 2014). A adesina polissacarídica intercelular (PIA), um polissacarídeo de superfície cuja composição química é poli- β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina (PNAG), tem um papel proeminente durante a etapa de multiplicação, uma vez que promove a adesão intercelular e, conseqüentemente, a acumulação das células bacterianas (O’Gara, 2007). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que estirpes que não produzem PIA/PNAG também são capazes de formar biofilmes (Boles, Thoende, Roth, & Horswill, 2010; Brooks & Jefferson, 2014). Durante a formação de biofilmes PIA-independentes, a produção da MEP é mediada por proteínas, como a proteína associada ao biofilme (Bap, biofilm-associated protein) (Tormo, Knecht, Götz, Lasa, & Penadés, 2005), Spa (Merino et al., 2009), FnBPA (O’Neill et al., 2008) e a proteína de superfície G (SasG, surface protein G) (Geoghegan et al., 2010). Ainda durante o estágio de multiplicação, algumas células são lisadas, através de mecanismos de morte celular programada, libertando proteínas citoplasmáticas e ADN no meio extracelular (Sadykov & Kenneth, 2012). Estas proteínas e o e-ADN são incorporados numa MEP inicial que envolve as células, formando um biofilme bidimensional (Moormeier & Bayles, 2017).

2.5.1.3 Êxodo

O êxodo é uma etapa caracterizada por uma dispersão inicial de células, originando uma reestruturação do biofilme (Moormeier & Bayles, 2017). Utilizando o sistema microfluidoico BioFlux, em combinação com imagens de campo claro, Moormeier e colaboradores (2014) observaram que 6 horas após o início desta etapa de multiplicação havia uma libertação de células do biofilme, formando diferentes focos de crescimento (microcolónias). O êxodo permite que uma subpopulação de bactérias seja libertada de forma coordenada de um biofilme imaturo. Para que esta dispersão inicial aconteça, é necessário que a

integridade da MEP seja comprometida. A dispersão inicial é mediada através da degradação do e-ADN presente na MEP de forma dependente de nuclease. O papel biológico desta etapa ainda não é plenamente compreendido, mas a dispersão de uma subpopulação celular parece ser um pré requisito para o estabelecimento de diferentes microcolônias com aspetos fisiológicos e metabólicos variáveis (Moormeier, Bose, Horswill, & Bayles, 2014), que por sua vez, dão origem a estruturas tridimensionais de biofilmes com características distintas (Moormeier & Bayles, 2017).

2.5.1.4 Maturação

A etapa de maturação é caracterizada pela formação de aglomerados bacterianos e de uma MEP robusta (Moormeier & Bayles, 2017). A formação dos aglomerados acontece a partir da proliferação celular de microcolônias distintas que emergem de uma camada basal de células do biofilme. A existência destas subpopulações confere maior diversidade ao biofilme que, por sua vez, necessita de um menor tempo para se adaptar ao stresse ambiental, como a falta de nutrientes ou a presença de antibióticos (Moormeier & Bayles, 2017). Durante esta etapa, o aumento do número de células e a produção contínua da MEP levam à expansão da espessura do biofilme, resultando na construção de uma estrutura tridimensional (Otto, 2008). Além da proliferação da MEP, fatores disruptivos (PSMs, nucleases e proteases) contribuem para a construção de poros e canais na MEP, permitindo que os nutrientes cheguem às células nas camadas mais profundas de biofilme (Otto, 2013).

2.5.1.5 Dispersão

A etapa final da formação de um biofilme, a dispersão, resulta na disseminação de células ou aglomerados celulares do biofilme maduro (Otto, 2013). A dispersão tanto pode ser influenciada por sinais provenientes do meio ambiente, incluindo alterações na disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigénio, como por sinais derivados da comunicação intercelular entre as bactérias confinadas na MEP, como os mecanismos de deteção quorum (QS, quorum-sensing) (McDougald, Rice, Barraud, Steinberg, & Kjelleberg, 2011). Em particular, a densidade celular tem um papel importante no estabelecimento dos mecanismos que promovem a dispersão. A dispersão pode ser entendida como uma vantagem seletiva quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis e como uma oportunidade de conquistar novos nichos (McDougald et al., 2011). Diversos estudos demonstram que a dispersão dos biofilmes de *S. aureus* estão sob o controlo do sistema *Agr* quorum sensing (*Agr*, gene regulador acessório, do inglês, accessory gene regulator) (Boles & Horswill, 2008; Moormeier et al., 2014; Periasamy et al., 2012; Yarwood, Bartels, Volper, & Greenberg, 2004). Em resposta à densidade

celular, este sistema coordena a expressão de genes e a ativação de proteases que contribuem para a desestruturação da MEP, levando à dispersão de células individuais ou aglomerados celulares (Moormeier et al., 2014). Durante a dispersão os genes relacionados com produção de fatores adesivos, como as MSCRAMMs e PIA, são menos expressos (Irie & Parsek, 2008; Zhang & Dong, 2004) enquanto se verifica um aumento da expressão dos genes relacionados com os fatores disruptivos, como os peptídeos surfactantes da família das PSMs (Le et al., 2014). Cabe ainda referir que, do ponto de vista clínico, a dispersão desempenha um papel muito importante nas infeções associadas a biofilmes, pois permite que as células se espalhem por todo o organismo (Fleming & Rumbaugh, 2018).

2.5.2 Relevância dos biofilmes em doenças infecciosas

É estimado que a formação de biofilmes representa mais de 80 % das infeções bacterianas (Davies, 2003) e contribui para o desenvolvimento de resistência e tolerância aos antibióticos (Lebeaux, Ghigo, & Beloin, 2014). Os biofilmes de *S. aureus* são extremamente difíceis de tratar, pois fornecem um nicho protegido para as bactérias, tornando-as altamente recalcitrantes (Paharik & Horswill, 2016; Schilcher et al., 2016). É importante mencionar ainda, que os biofilmes de *S. aureus* se têm destacado devido à sua capacidade de adesão aos dispositivos médicos implantados, como válvulas cardíacas artificiais e cateteres, e por contribuir com o estabelecimento de infeções crónicas associadas aos tecidos (Bhattacharya, Wozniak, Stoodley, & Hall-Stoodley, 2015).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos (bombas de efluxo, enzimas que degradam antibióticos, redução da permeabilidade da membrana celular, alteração do sítio de ligação do antibiótico, entre outros) não são suficientes para explicar como as bactérias em biofilmes são capazes de sobreviver às terapias antimicrobianas (Sharma, Misba, & Khan, 2019). Os biofilmes apresentam várias estratégias de tolerância aos antibióticos, sendo uma delas a penetração lenta ou incompleta dos agentes antimicrobianos (Stewart & Costerton, 2001). O confinamento da comunidade bacteriana numa MEP funciona tanto como uma proteção física, ao dificultar a penetração dos antibióticos, como uma barreira química, uma vez que os agentes antimicrobianos carregados positivamente ligam-se aos polímeros carregados negativamente presentes na MEP e, conseqüentemente, não atingem os alvos celulares (Dufour, Leung, & Lévesque, 2010). Além disso, a elevada densidade celular num biofilme maduro pode também dificultar a penetração de agentes antimicrobianos até as camadas mais profundas do biofilme (Dufour et al., 2010). A capacidade de exibir distintos fenótipos dentro do mesmo biofilme também contribui para o aumento da tolerância aos agentes antimicrobianos (Dufour et al., 2010). Gradientes em microescala nas concentrações de nutrientes são uma característica bem conhecida dos biofilmes;

por exemplo, o oxigênio pode ser completamente consumido nas camadas superficiais de um biofilme, levando a nichos anaeróbicos nas camadas profundas (Sharma et al., 2019). Estes gradientes podem resultar numa taxa mais lenta de crescimento bacteriano nas camadas mais profundas do biofilme, onde a disponibilidade de nutrientes é reduzida (Høiby et al., 2010). Além do facto de que alguns antibióticos não são ativos em condições anaeróbicas, diversos antibióticos são mais eficazes contra bactérias que se dividem rapidamente. Um microambiente quimicamente heterogéneo dentro do biofilme pode ainda antagonizar diretamente a ação de determinados antibióticos (Dufour et al., 2010). Além disso, células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC, viable but nonculturable) e células persistentes, encontram-se num estado metabólico menos ativo e são, portanto, menos suscetíveis (Li, Mendis, Trigui, Oliver, & Faucher, 2014; Stewart & Franklin, 2008).

Devido à existência de múltiplos mecanismos de resistência intrínsecos às bactérias e a tolerância resultante do fenótipo de biofilme, o tratamento convencional com antibióticos tem pouco sucesso em erradicar completamente as células bacterianas em biofilme (Sharma et al., 2019). A concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) pode ser 10 a 100 vezes superior à CIM para bactérias em crescimento planctónico. Essa tolerância aumentada costuma levar a situações em que não é adequado tratar infeções com terapias antibióticas comuns, uma vez que a concentração de antibiótico necessária para erradicar o biofilme é maior que a concentração máxima de antibiótico que o corpo humano pode suportar (pico de concentração sérica – PSC, do inglês peak serum concentration) (Cerca et al., 2005; Macià, Rojo-Molinero, & Oliver, 2014).

2.6 Tratamentos convencionais

As infeções estafilocócicas ocorrem regularmente em pacientes hospitalizados e o crescente aumento de infeções causadas por estirpes multirresistentes tem evidenciado a importância da prevenção de infeções estafilocócicas e da busca por abordagens terapêuticas não convencionais (Kluytmans, Belkum, & Verbrugh, 1997). Entre os antibióticos atualmente recomendados pela Sociedade de Doenças Infeciosas da América (IDSA, Infectious Diseases Society of America) para o tratamento de infeções por SARM estão vancomicina, clindamicina, daptomicina, linezolida, trimetoprim e tetraciclina (Liu et al., 2011). Além da resistência aos antibióticos, a capacidade de formar biofilmes contribui para a dificuldade do tratamento de infeções, dada a suscetibilidade reduzida de biofilmes a diversos antibióticos utilizados na prática clínica (Lebeaux et al., 2014). O desafio atual, face ao aumento da resistência aos antibióticos, é encontrar novos agentes antimicrobianos que sejam eficazes contra bactérias multiresistentes, que reduzam o desenvolvimento de resistência e que simultaneamente apresentem baixa toxicidade (Aslam

et al., 2018; Fitzgerald-Hughes, Devocelle, & Humphreys, 2012; Simões, Bennett, & Rosa, 2009; Wright, 2014).

2.7 Compostos derivados de plantas como alternativa terapêutica

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos resultou no surgimento de microrganismos resistentes (Lebeaux et al., 2014). Para superar a resistência desenvolvida, novos agentes antimicrobianos com novos modos de ação têm vindo a ser desenvolvidos, e as plantas aromáticas e medicinais (PAMs) têm demonstrado ser uma importante fonte de compostos bioativos (Savoia, 2012). As PAMs, também conhecidas como ervas e especiarias, são definidas como “plantas que possuem substâncias odoríferas sob a forma de óleos essenciais, exsudatos de goma, bálsamos e oleorresinas” (Singh & Osman, 1999). Estas plantas são exploradas pelo homem desde aproximadamente 5.000 a.C., devido às suas propriedades preservativas, medicinais e aromatizantes (Chang, 2000). Das várias atividades biológicas atribuídas às PAMs podem destacar-se as ações: 1) antibacteriana (Swamy, Akhtar, & Sinniah, 2016), 2) antifúngica (Nazzaro, Fratianni, Coppola, & De Feo, 2017), 3) antiviral (Lin, Hsu, & Lin, 2014), 4) antioxidante (Samarth, Samarth, & Matsumoto, 2017), 5) anticarcinogénica (Fitsiou & Pappa, 2019), 6) larvicida (Jayaraman, Senthilkumar, & Venkatesalu, 2015) e 7) repelente (Lalthazuali & Mathew, 2017)

O uso mundial de medicamentos à base de plantas aumentou de maneira significativa nas últimas décadas (Ekor, 2014). A OMS estima que atualmente 80 % da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, utilizam medicamentos derivados de plantas (Gurib-Fakim, 2006). Se por um lado a grande parte da população (70 a 95 %) da Ásia, África, América Latina e Oriente Médio depende da medicina popular para cuidados de saúde primários; por outro, a maior parte da população (70 a 90 %) do Canadá, França, Alemanha e Itália faz uso da medicina tradicional como “complementar” ou “alternativa” (Barata, Rocha, Lopes, & Carvalho, 2016). Além dos benefícios para a saúde, o crescente interesse por PAMs tem alto valor do ponto de vista socioeconómico, pois as PAMs são importantes para a subsistência local de populações carenciadas ao redor do mundo (Chauhan, 2010; Kunwar, Mahat, Acharya, & Bussmann, 2013; Sher, Aldosari, Ali, & de Boer, 2014).

Os compostos derivados de plantas de valor terapêutico são principalmente provenientes de metabolitos secundários (Savoia, 2012). Na natureza, estes metabolitos desempenham um papel importante na defesa das plantas contra predadores e pragas, e na resposta ao stresse ambiental, como as mudanças da temperatura e deficiência hídrica (Fraenkel, 1959; Isah, 2019; Zaynab et al., 2018). De modo geral, os compostos bioativos encontrados nas plantas são característicos da espécie, porém algumas

alterações em termos quantitativos e qualitativos podem ser observadas consoante o ciclo vegetativo e as condições de cultivo (Delgado-Adámez et al., 2017), um fenómeno conhecido como polimorfismo químico (Salgueiro et al., 1995).

2.7.1 Óleos essenciais

Os OEs são misturas complexas de compostos aromáticos, com carácter hidrofóbico e extremamente voláteis à temperatura ambiente, provenientes do metabolismo secundário das plantas (Turek & Stintzing, 2013). Os OEs são produzidos e armazenados nos órgãos secretores das plantas aromáticas, como os tricomas e osmóforos (Naeem, Abbas, Ali, & Hasnain, 2018). O confinamento em células especializadas protege a planta dos efeitos nocivos de alguns constituintes dos OEs, como o efeito fitotóxico dos terpenoides quando presentes em altas concentrações (Hallahan, 2000).

A extração de OEs pode ser realizada a partir de flores, raízes, casca, folhas, sementes, casca, frutas e madeira (Butnariu & Sarac, 2018; Christaki, Bonos, Giannenas, & Florou-Paneri, 2012). A destilação com vapor é a técnica mais amplamente utilizada na produção comercial de OEs, mas a extração também pode ser realizada através da utilização de solventes orgânicos (Burt, 2004). De salientar ainda que a composição do OE produzido por uma planta pode variar quer com as condições de cultivo e colheita, como com o método de utilizado para a extração (Canter, Thomas, & Ernst, 2005; Mith et al., 2014).

Mais de 3 mil espécies vegetais são utilizadas para a extração de OEs, sendo que cerca de 300 são utilizadas a nível comercial (Christaki et al., 2012). Cabe ainda referir que as famílias botânicas mais relevantes no que se refere à produção destes compostos bioativos são Asteraceae (= Compositae), Lamiaceae (= Labiateae) e Apiaceae (= Umbelliferae) (Christaki et al., 2012). Do ponto de vista económico, a exploração dos OEs tem forte impacto. Em 2011, o mercado mundial dos OEs foi estimado em 24 mil milhões de dólares americanos, com uma taxa anual de crescimento de 10 % (Boesl & Saarinen, 2016). Além das suas atividades biológicas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras, fungos e vírus (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008; Reichling, Schnitzler, Suschke, & Saller, 2009), os OEs têm um importante papel na indústria de perfumaria/cosmética e na indústria alimentar, por atuar como conservantes e por conferir aromas (Ali et al., 2015; Elshafie & Camele, 2017; Hayouni et al., 2008). Refira-se ainda que os OEs apresentam baixa toxicidade em mamíferos e o seu uso configura um baixo impacto ambiental (Nazzaro et al., 2017).

2.7.1.1 Óleo essencial de *Thymbra capitata*

Thymbra capitata (L.) Cav. (Lamiaceae) [= *Thymus capitatus* Hoffms. et Link., *Thymus creticus* Brot., *Corydorthymus capitatus* Rechenb. f., *Satureja capitata* L.] é uma erva perene, com época de floração de abril a outubro, nativa da Europa e da Ásia (Figueiredo et al., 2008), que ocorre frequentemente na região mediterrânica (Fig. 2). Em Portugal, esta espécie pode ser encontrada na região sul, nomeadamente no Algarve (Palmeira-De-Oliveira et al., 2012). É uma planta medicinal e aromática conhecida popularmente como tomilho, tomilho-de-creta ou tomilho-cabeçudo. Além do seu amplo uso na medicina tradicional, esta erva é amplamente utilizada para fins culinários, ornamentais e aromatizantes (Figueiredo et al., 2008).



Figura 2 | Flores (A) e troncos (B) de *Thymbra capitata* (L.) Cav. (Lamiaceae). Fotos retiradas do site do Jardim Botânico da UTAD (Disponível em: jb.utad.pt).

As propriedades biológicas das espécies do género *Thymbra* são conhecidas desde os tempos de antigas civilizações como os egípcios, gregos e romanos. A maioria das propriedades biológicas de *Thymbra* ssp. estão relacionadas com a presença de derivados de polifenóis e monoterpenóides nos seus extratos e nos seus OEs (Candela, Maggi, Lazzara, Rosselli, & Bruno, 2019). O OE de *T. capitata* mostra uma homogeneidade química caracterizada por elevadas quantidades de carvacrol (75,51 % nas flores e 74,27 % nos frutos), seguida por p -cymene (7,28 nas flores e 9,10 % nos frutos) e γ -terpinene (4,83 % nas flores e 4,14 % nos frutos) (Delgado-Adámez et al., 2017). Os compostos fenólicos são provavelmente os principais componentes antimicrobianos nos OEs (Abbaszadeh, Sharifzadeh, Shokri, Khosravi, & Abbaszadeh, 2014). No que se refere à ação dos OEs, esta pode estar associada a diferentes mecanismos, entre os conhecidos até o momento, está o aumento da permeabilidade da membrana, com consequente libertação dos constituintes do citoplasma, a lise celular, o comprometimento de vários

sistemas enzimáticos, a inibição da atividade respiratória, a redução do pH das células e a inibição da síntese proteica (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001; Ultee, Kets, & Smid, 1999).

Diversos estudos demonstram que o OE de *T. capitata* é um ótimo agente antibacteriano, tanto para bactérias gram-positivas quanto para gram-negativas (Deans & Ritchie, 1987; Delgado-Adámez et al., 2017; Machado et al., 2017). A sua capacidade antifúngica e antioxidante também tem sido demonstrada (Miguel et al., 2015; Salgueiro et al., 2004). Além destas atividades biológicas, o OE de *T. capitata* e seus compostos são fortes candidatos para o tratamento da doença de Alzheimer, uma vez que possuem a atividade antiacetilcolinesterase (Aazza, Lyoussi, & Miguel, 2011). Portanto, o OE de *T. capitata* é possivelmente um forte candidato para o combate das infecções decorrentes da formação de biofilme por estirpes SARM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estirpes e condições de crescimento bacteriano

Neste estudo foram utilizados 18 isolados clínicos de SARM. Os isolados foram obtidos após consentimento do paciente sob aprovação da Comissão de Ética da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal. Entre estes isolados, 6 são provenientes de septicemias, 6 de pés de diabéticos e 6 de osteomielites. Os isolados foram cedidos pelo Grupo de Investigação em Microbiologia e Resistência aos Antibióticos (MicroART, Microbiology and Antibiotic Resistance Team) da UTAD. A estirpe de *S. aureus* ATCC[®] 25923[™] (isolado clínico) foi utilizada como controlo positivo devido à sua grande capacidade de formação de biofilme (Bauer, Siala, Tulkens, & Van Bambeke, 2013; Rodríguez-Lázaro et al., 2018; Stepanović, Vuković, Dakić, Savić, & Švabić-Vlahović, 2000). Os isolados foram criopreservados a -80 °C em solução de Tryptic Soy Broth (TSB – Liofilchem, Teramo, Italy) com 30 % (v/v) de glicerol (Panreac, Barcelona, Spain). De modo a evitar um grande stresse térmico, os isolados foram mantidos a -20 °C por um período de 16 ± 1 h antes de serem transferidos para a arca a -80 °C. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Os isolados foram cultivados em placas de Tryptic Soy Agar (TSA – preparado adicionando 1,5 % (m/v) de agar (Liofilchem, Teramo, Italy) ao meio de cultura TSB (VWR, Pennsylvania, USA)) e incubados a 37 °C (MIR-154-PE, Panasonic Healthcare) por 16 ± 1 h. Em seguida, as placas foram conservadas a 4 °C por um período de até 1 mês. Após este período foi realizada uma nova repicagem para a obtenção de uma nova geração de isolados. A partir da quarta geração a repicagem foi realizada a partir dos isolados criopreservados.

3.2 Agentes antimicrobianos

3.2.1 Óleos essenciais extraídos de *Thymbra capitata*

A atividade antimicrobiana do OE de *T. capitata* foi investigada utilizando uma mistura (na proporção 1:1) de óleos de diferentes lotes, de modo a minimizar o efeito da variabilidade química existente nas PAMs (Palmeira-De-Oliveira et al., 2012; Salgueiro et al., 2004). Os OEs foram cedidos pelo Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. A composição de cada OE utilizado para a obtenção da mistura de óleos usada no presente estudo está descrita na tabela 2. A mistura de OEs foi preservada em frasco de vidro a 4 °C e protegida da luz.

Tabela 2 | Composição química dos três óleos essenciais de *Thymbra capitata* (L.) Cav. (Lamiaceae).

Amostras utilizadas ^a	Quantidades dos principais constituintes do óleo essencial (%)				
	Carvacrol	γ-Terpinene	ρ-Cymene	Linalool	α-Terpinene
A	75	5,1	5,0	2,0	1,5
B	73,9	7,4	4,9	<1,8	<1,8
C	80	3,4	4,1	<1,1	<1,1

^a Os óleos essenciais foram extraídos e caracterizados pelo CIEPQPF da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

3.2.2 Antibióticos

Os antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina, frequentemente utilizados para o combate de infeções estafilocócicas (Rayner e Munckhof, 2005), foram utilizados para comparar a suscetibilidade dos biofilmes ao OE de *T. capitata*. As soluções com antibióticos foram preparadas de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). A concentração de antibiótico utilizada em todos os ensaios foi o valor de PCS. Os mecanismos de ação e os valores de PCS dos antibióticos utilizados neste estudo podem ser consultados na tabela 3.

Tabela 3 | Mecanismos de ação e pico de concentração sérica (PCS) dos antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina.

Antibióticos	Mecanismo de ação ^a	PCS (mg/L) ^b
Ciprofloxacina	Inibidor da síntese de ácidos nucleicos	4,5
Tetraciclina	Inibidor da síntese de proteínas	16,0

^a O mecanismo de ação dos antibióticos foi obtido através das informações fornecidas pelo fabricante;

^b Os valores de PCS para ciprofloxacina e tetraciclina foram obtidos de acordo com Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc. (2004) e Clinical and Laboratory Standards Institute (1997), respetivamente.

3.3 Caracterização fenotípica referente à formação de biofilme

3.3.1 Otimização das condições de crescimento

Para determinar as condições adequadas de crescimento e de formação de biofilme, realizou-se um primeiro ensaio de formação de biofilme (descrito em detalhe na secção 3.3.2), utilizando a estirpe controlo positivo crescida em TSB, em TSB suplementado com NaCl (TSB_{NaCl}) ou em TSB suplementado com glicose (TSB_G). O meio TSB_{NaCl} foi preparado adicionando 3 % (m/v) de NaCl (VWR) ao meio de cultura TSB. O meio TSB_G foi preparado adicionando 0,5 % (v/v) de glucose (Fisher Scientific, Leicestershire, United Kingdom) ao meio de cultura TSB. Para além da suplementação do meio, foi também testada a influência da agitação mecânica na capacidade de formação de biofilme. Para tal, as placas de cultura utilizadas para a formação de biofilme foram submetidas a incubação sem agitação e com agitação a 120 rpm em agitador orbital durante 24 ± 1 h a 37 °C. Após incubação, a capacidade de formação de biofilme foi avaliada utilizando o método CVC (descrito em detalhe na secção 3.3.3). Todas as experiências foram repetidas pelo menos duas vezes com sete replicados técnicos.

3.3.2 Formação do biofilme

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados como anteriormente descrito por Oniciuc e colaboradores (2016), com algumas modificações. Foram preparados pré-inóculos a partir das colónias de cada isolado clínico em placas de TSA. As colónias recolhidas foram transferidas para Erlenmeyers de 10 mL de volume, com 2,5 mL de meio TSB e mantidas em incubação a 37 °C durante 16 ± 1 h com agitação de 120 rpm (ES-20 Shaker-Incubator, BioSan, Riga, Latvia). Após a incubação, a suspensão de bactérias foi ajustada em TSB a uma densidade ótica ($DO_{640\text{ nm}}$) de $0,25 \pm 0,05$, que corresponde a uma concentração de 2×10^8 UFCs (unidades formadoras de colónias)/mL (Freitas, Vasconcelos, Vilanova, & Cerca, 2014). De seguida, foram adicionados 198 µL de TSB_{NaCl} e 2 µL da suspensão bacteriana de diferentes isolados em cada poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica). A utilização de meio de cultura suplementado com NaCl e as condições estáticas de incubação foram escolhidas para induzir a formação de biofilme, uma vez que estas condições favoreceram a sua formação (secção 4.1). De forma a normalizar as possíveis variações no processo de quantificação dos biofilmes, entre cada experiência, foi incluída a estirpe de controlo positivo em todas as placas. Alguns poços foram mantidos apenas com TSB para garantir a esterilidade do meio (controlo negativo). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 ± 1 h. Todas as experiências foram repetidas pelo menos três vezes com sete replicados técnicos.

3.3.3 Quantificação da biomassa do biofilme

Após incubação, a biomassa de biofilme foi quantificada através do método de coloração violeta de cristal (CVC), como descrito anteriormente por Peeters e colaboradores (2008), com algumas modificações. Resumidamente, as células bacterianas em suspensão foram removidas cuidadosamente. As placas ficaram a secar à temperatura ambiente durante 2 ± 1 h antes do início da etapa de fixação. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de metanol (Fisher Scientific, Leicestershire, United Kingdom) em cada poço durante 15 min para fixação do biofilme. Posteriormente, o sobrenadante de metanol foi removido e as placas ficaram a secar à temperatura ambiente durante 10 min. Após esta etapa, 100 μ L de cristal de violeta (CV) a 1 % (v/v) (Acros Organics, New Jersey, USA) foram adicionados a cada poço. Após 5 min a solução de CV foi removida. Para remover o excesso de corante foram realizadas duas lavagens do biofilme com 200 μ L de água destilada. Por fim, adicionaram-se 150 μ L de ácido acético a 33 % (v/v) (Fisher Scientific) para solubilizar o CV. A DO foi medida a 595 nm ($DO_{595\text{ nm}}$) usando um leitor de microplacas (Biochrom, EZ Read 800 Plus). A formação de biofilme de todos os isolados foi normalizada à formação de biofilme da estirpe controlo positivo presente em cada ensaio independente.

3.3.4 Análise da estrutura dos biofilmes por microscopia de laser de varrimento confocal (CLSM)

Para estas experiências, a formação de biofilme foi realizada como descrito anteriormente (secção 3.3), mas com incubação em placas de 24 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica). No fundo de cada poço da placa de cultura foi colocada uma lamela estéril de plástico com 13 mm de diâmetro (Nunc® Thermomanox® Plastic Coverslips, Rochester, USA). Os volumes foram ajustados para 990 μ L de TSB_{NaCl} e 10 μ L da suspensão bacteriana à concentração de 2×10^8 UFCs/mL em cada poço (França & Cerca, 2016). Após incubação, o meio de cultura foi removido e os biofilmes foram lavados uma vez com 1 mL de solução de NaCl a 0,9 % (m/v). Em seguida, as lamelas com os biofilmes foram transferidas para lâminas de microscopia, antes de se proceder à sua coloração. Todos os procedimentos de coloração foram realizados no escuro e de acordo com as instruções do fabricante.

Foram utilizados dois corantes para permitir a análise da estrutura dos biofilmes de 24 h. A sonda fluorescente aglutinina de germe de trigo conjugada com tetrametilrodamina (WGA-TRITC) foi utilizada para permitir a coloração de resíduos de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), um polissacárido presente na matriz extracelular do biofilme (Jefferson & Cerca, 2006), e a sonda nuclear fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi utilizada para permitir a visualização das células, uma vez que se liga ao ADN. A

cada superfície foram adicionados 100 µL de WGA-TRITC (Invitrogen, CA, USA) a uma concentração de 10 µg/mL. Após 10 min de incubação, o excesso de corante foi removido. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA) à concentração de 100 µg/mL. Após 5 min de incubação, o excesso de corante foi removido. A fluorescência do WGA-TRITC foi detetada utilizando um laser (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) com comprimento de onda de excitação de 559 nm e um filtro de emissão de 505 - 605 nm. A fluorescência do DAPI foi detetada utilizando um laser com comprimento de onda de excitação de 405 - 635 nm e um filtro de emissão de 430 - 470 nm. Para visualização com maior campo de visão os biofilmes corados foram examinados utilizando o CLSM Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Lisboa, Portugal) com uma objetiva de 10 x e uma ampliação eletrônica de 2 x. Imagens de diferentes regiões de cada superfície foram adquiridas com resolução de 640 × 640 (pixels). Foram utilizados dois replicados técnicos para seleção das imagens representativas.

3.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima letal (CML) do OE de *T. capitata*

A CMI do OE de *T. capitata* foi avaliada através do método de macrodiluição seriada como descrito por Palmeira-de-Oliveira e colaboradores (2012). Foram analisadas as concentrações de 0,08 a 1,28 µL/mL do OE para a determinação da CMI. Inicialmente foi preparada uma solução stock (5,12 µL/mL) de TSB com o OE dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO – Scharlau, Barcelona, Espanha) na proporção 1:1. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TSB em frascos de vidro (do tipo Mc Cartney). Posteriormente, acrescentou-se 1 mL da solução stock do OE no frasco destinado para a maior concentração a ser testada. Após agitação em vórtex, retirou-se 1 mL da solução diluída no passo anterior e transferiu-se para o frasco destinado à concentração seguinte, e assim sucessivamente. Posteriormente, adicionou-se 1 mL do inóculo bacteriano ajustado à concentração 2×10^6 UFC/ mL, perfazendo um total de 2 mL por frasco. Foram preparados 2 controlos para cada isolado: controlos contendo TSB com DMSO e suspensão bacteriana foram utilizados para confirmar a ausência de interferência do solvente nos resultados, enquanto controlos com TSB e suspensão bacteriana foram preparados para confirmar o crescimento bacteriano. Além disso, um controlo negativo foi incluído em cada experiência para garantir a esterilidade do meio de cultura. As CMIs foram lidas após 24 ± 1 h de incubação a 37 °C, sem agitação. O crescimento da bactéria foi comparado visualmente com a amostra controlo (TSB e suspensão bacteriana) e apenas a inibição total do crescimento foi considerada como resultado para CMI, sendo o valor da CMI o resultado final de no mínimo três ensaios independentes e concordantes.

Após a determinação de CMI, transferiram-se 10 µL das suspensões presentes nos frascos contendo a concentração referente ao valor de CMI, ½ CMI e 2 CMI para placas de TSA, para determinar a CML. As placas foram incubadas por 24 ± 1 h a 37 °C. O valor de CML corresponde a concentração onde não houve crescimento bacteriano após a incubação.

3.5 Determinação da suscetibilidade de biofilmes pré-formados à ação dos antimicrobianos

3.5.1 Efeito na biomassa do biofilme

A formação de biofilme foi realizada como descrito na secção 3.3.2. Após as 24 h de incubação, as células bacterianas em suspensão foram removidas cuidadosamente. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de solução de TSB com a CML do OE. Para comparar a eficácia do OE com antibióticos utilizados para tratar infeções por *S. aureus*, foram incluídos controlos com ciprofloxacina (4,5 mg/L) e tetraciclina (16 mg/L). Para isso, foram adicionados 200 µL de solução de TSB com os antibióticos em diferentes poços. Foram ainda incluídos controlos com TSB e suspensão bacteriana ou TSB com DMSO e suspensão bacteriana à concentração utilizada para solubilizar o OE. Alguns poços foram mantidos apenas com meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 37 °C, sem agitação, por um período adicional de 24 ± 1 h. Após incubação com os agentes antimicrobianos, a biomassa foi quantificada utilizando o método CVC (descrito na secção 3.3.3).

3.5.2 Efeito na cultivabilidade celular

Para a determinação do efeito dos agentes antimicrobianos na viabilidade e cultivabilidade celular, efetuou-se o mesmo procedimento descrito na secção anterior, porém após o período de incubação com os agentes antimicrobianos, os biofilmes foram quantificados através da contagem de UFCs. Inicialmente, os biofilmes foram lavados uma vez com 200 µL de solução de NaCl a 0,9 % (m/v). Cada biofilme foi destacado por raspagem do fundo da placa de cultura e ressuspendido em 200 µL de solução de NaCl. Em seguida, realizou-se a homogeneização celular na própria placa, submetendo a suspensão de cada poço a um pulso de 10 s de sonicação com amplitude de 30 % (Homogeneizador de ultrassons de 750-Watts Cole-Parmer®, Illinois, EUA 230 VCA, com uma micropona de 13 mm). Como demonstrado anteriormente por Freitas e colaboradores (2014), este ciclo de sonicação não tem efeito significativo na cultivabilidade celular. A placa contendo as amostras foi mantida em gelo durante todo o procedimento. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais da suspensão previamente homogeneizada, adicionando 20 µL de suspensão de biofilme em 180 µL de solução salina. Após

agitação em vórtex, retiraram-se 20 µL da solução diluída no passo anterior e transferiu-se para o tubo Eppendorf destinado à concentração seguinte, e assim sucessivamente até à diluição 10⁻⁷. Em seguida, foram colocados 10 µL de cada diluição em placas de TSA. As placas foram incubadas 24 ± 1 h a 37 °C antes da contagem do número de UFCs. Todas as experiências foram repetidas pelo menos três vezes com dois replicados técnicos.

3.5.3 Efeito na atividade metabólica

Para a determinação do efeito dos agentes antimicrobianos na atividade metabólica, efetuou-se o mesmo procedimento descrito na seção 3.5.1, contudo após o período de incubação com os agentes antimicrobianos, os biofilmes foram quantificados através do método colorimétrico XTT, como descrito por Logu e colaboradores (2003). Após a lavagem dos biofilmes com 200 µL de solução de NaCl a 0,9 % (p/v), adicionou-se a cada poço 200 µL de uma solução contendo 250 µg de XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida] (Panreac Applichem)/mL e 25 µg de MSF (metossulfato de fenazina) (Acros Organics). As soluções com XTT e MSF foram preparadas em água ultrapura estéril de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram cobertas com papel alumínio e foram incubadas no escuro por 3 h a 37 °C. Posteriormente, 150 µl da solução de cada poço foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL seguindo-se uma centrifugação de 5 min a 10000 rcf. Para a realização das leituras espectrofotométricas, 100 µl do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de microtitulação. Foram adicionados 100 µl de água ultrapura estéril em cada poço para diluir a solução de XTT. A absorvância foi medida a 490 nm. Todas as experiências foram repetidas pelo menos três vezes com dois replicados técnicos.

3.6 Análise estatística

Os resultados estão representados como média ± desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a distribuição Gaussiana dos dados. A significância estatística foi determinada utilizando um Teste-*t* não paramétrico ou através da análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey's. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism 8 (versão experimental; San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da suplementação do meio de cultura e das condições hidrodinâmicas na formação de biofilmes

Está atualmente bem descrito que a capacidade de formação de biofilmes depende não apenas das características genótípicas da estirpe (Croes et al., 2009), mas também pode ser influenciada pelas condições de cultura (Lade et al., 2019). Diversos fatores ambientais como a fonte de carbono, pH, presença de glucose, osmolaridade, temperatura e anaerobiose podem influenciar a capacidade de formação de biofilmes (Götz, 2002; Liu, Zhang, & Ji, 2020). Considerando que um fenótipo variável em termos da formação de biofilme pode ser observado quando os biofilmes são formados sob diferentes condições (Liu et al., 2020), no presente estudo investigou-se a influência da composição do meio de cultura e de diferentes condições hidrodinâmicas (com ou sem agitação). Foi possível observar que a suplementação do meio de cultura (TSB) com 0,9 % de glucose (TSB_g) ou com 3 % de NaCl (TSB_{NaCl}) aumentou significativamente a capacidade de acumulação de biomassa da estirpe *S. aureus* ATCC 25923, quando os biofilmes foram formados em incubação sem agitação (Figura 3). Cabe realçar que, nestas condições de incubação sem agitação, a produção de biomassa foi superior no meio de cultura TSB_{NaCl} em comparação ao meio de cultura TSB_g. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a capacidade de produção de biomassa quando os biofilmes foram formados em diferentes meios de cultura com 120 rpm de agitação. Estes resultados sugerem que a suplementação do meio de cultura, principalmente com 3 % de NaCl, e a ausência de agitação promovem a produção de biomassa de biofilmes de *S. aureus*. O meio de cultura TSB é amplamente utilizado para o estudo da formação de biofilmes por isolados de *S. aureus* (Lade et al., 2019; Lee et al., 2014; Singh, Prakash, Achra, Singh, & Das, 2017). No entanto, apesar de ser um meio de cultura que permite um crescimento abundante de diferentes agentes patogênicos, a quantidade de nutrientes presente na sua composição pode ser insuficiente para promover a formação de biofilmes (Lade et al., 2019; Sugimoto et al., 2018). Apesar de já possuir na sua composição 2,5 g/L de glucose e 5,0 g/L de NaCl, este meio de cultura é frequentemente suplementado com glucose e/ou NaCl para a realização de estudos relacionados com formação de biofilmes de *S. aureus* (DeFrancesco et al., 2017; Sugimoto et al., 2018; Yu et al., 2017).

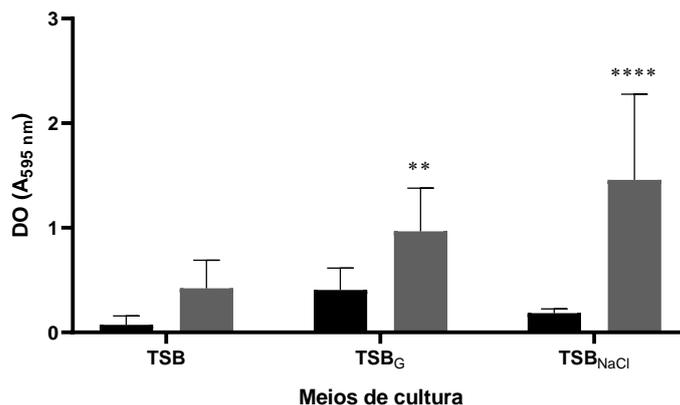


Figura 3 | Formação de biofilmes em diferentes condições de cultura. Quantificação da capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após incubação em TSB, TSB_G e TSB_{NaCl}, com (■) e sem (■) agitação. Os dados são representados como média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes. As diferenças significativas são representadas como: ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$.

Diversos autores relatam que condições de stresse osmótico, como a presença de 3 % de NaCl no meio de cultura, aumentam a capacidade de formação de biofilme por *S. aureus* (Rachid et al., 2000; Valle et al., 2003). Por outro lado, a baixa concentração de glucose no meio de cultura pode ser um fator limitante para a produção de PIA/PNAG, e, conseqüentemente, para a acumulação de biofilme (Ammendolia, Rosa, Montanaro, Arciola, & Baldassarri, 1999). No entanto, existem vários estudos com resultados contraditórios. No trabalho realizado por Lade e colaboradores (2019), tanto a suplementação de TSB com 0,5 - 1 % de glucose quanto a suplementação com 1 - 2 % de NaCl aumentaram a formação de biofilme. Por outro lado, Singh e colaboradores (2017) observaram que a suplementação do meio de cultura com glucose ou com NaCl não aumentou significativamente a capacidade de acumulação de biomassa. Tais observações confirmam que o fenótipo de produção de biofilme por isolados clínicos de *S. aureus* pode variar consideravelmente em função da composição do meio de cultura utilizado. É importante referir que a adição de glucose ou NaCl ao meio de cultura contribui para a formação de biofilme por diferentes mecanismos, como através da indução da produção de PIA/PNAG (Agarwal & Jain, 2013; O'Neill et al., 2007). A glucose pode ainda induzir a formação de biofilme em isolados PIA-independentes (Agarwal & Jain, 2013). A glucose favorece a formação de biofilmes de *S. aureus* através da acidificação do meio de cultura, uma vez que a secreção de ácidos gordos de cadeia curta resultantes do metabolismo da glucose reduz o pH do meio circundante (Olson, King, Yahr, & Horswill, 2013). Por sua vez, um pH ácido reprime a produção de protease extracelular (Boles e Horswill, 2011), estimula a associação de proteínas da matriz do biofilme às superfícies celulares (Foulston, Elsholz, DeFrancesco, & Losick, 2014) e resulta na repressão do sistema *Agr* quorum sensing (Regassa, Novick, & Betley, 1992).

Um outro aspeto que influencia fortemente a capacidade de formação de biofilme prende-se com as condições hidrodinâmicas: é comum realizarem-se ensaios com agitação (Fernández-Barat et al., 2018; Melo et al., 2016) ou em condição estática (Kong et al., 2018; Ster et al., 2017). Contrariamente aos resultados apresentados na Figura 3, Berlutti e colaboradores (2014) constataram que a incubação com agitação aumentou a capacidade de formação de biofilme, sugerindo que as condições de fluxo podem favorecer a formação de biofilme. Por outro lado, noutro estudo (Vanhommerig et al., 2014) não foram observadas diferenças na capacidade de formação de biofilme entre incubação com e sem agitação. No presente estudo, uma vez que a formação de biofilme em TSB_{NaCl} em condições estáticas de incubação se mostrou favorável para acumulação de biomassa, todos os ensaios que se seguem foram realizados nestas condições.

4.2 Caracterização fenotípica de isolados clínicos de SARM

4.2.1 Análise da resistência antimicrobiana e capacidade de produção de biofilme

A capacidade de formação de biofilme por isolados de SARM tem sido bem reportada na literatura (Lade et al., 2019; Neopane, Nepal, Shrestha, Uehara, & Abiko, 2018), porém a sua correlação com o tipo de infeção e o perfil de resistência antimicrobiana ainda não é completamente compreendida (Kwiecinski, Jacobsson, Horswill, Josefsson, & Jin, 2019). O estudo do padrão de resistência antimicrobiana de *S. aureus* é de extrema importância uma vez que (i) a multirresistência aos antibióticos frequentemente utilizados para o tratamento de infeções é um problema crescente (Neopane et al., 2018) e (ii) as diferenças fenotípicas observadas podem implicar diferentes condições seletivas de persistência no hospedeiro (Pompilio et al., 2011). O perfil de resistência de todos os isolados investigados no presente estudo foi previamente caracterizado pelo grupo de investigação MicroART- UTAD (Anexo 1). De forma geral, a maioria dos isolados foi resistente a ciprofloxacina (77,7 %) e sensível a tetraciclina (77,7 %). Por esta razão, estes antibióticos foram escolhidos para serem utilizados como controlo nos ensaios para determinação do potencial anti-biofilme do OE de *T. capitata*. Os resultados encontrados suportam as observações realizadas em outros estudos que reportam que os isolados de SARM são normalmente resistentes à ciprofloxacina (Alaklobi et al., 2015; Neopane et al., 2018; Yameen, Nasim, Akhtar, Iram, & Javed, 2010) e sensíveis à tetraciclina (Neopane et al., 2018). Apesar de estar reportado na literatura que os isolados melhores produtores de biofilmes são mais resistentes a vários antibióticos (Charankaur e Khare, 2013; Neopane et al., 2018), no presente estudo, mesmo os isolados que produziram menos biofilme foram multirresistentes. No entanto, todos os isolados de SARM selecionados para este trabalho,

quer sejam provenientes de septicemias, úlceras de pés de diabéticos ou osteomielites, foram produtores de biofilme sob as condições avaliadas. Na figura 4 é possível observar diferentes graus de capacidade formação de biofilme por isolados SARM em comparação com a estirpe controlo (*S. aureus* ATCC 25923).

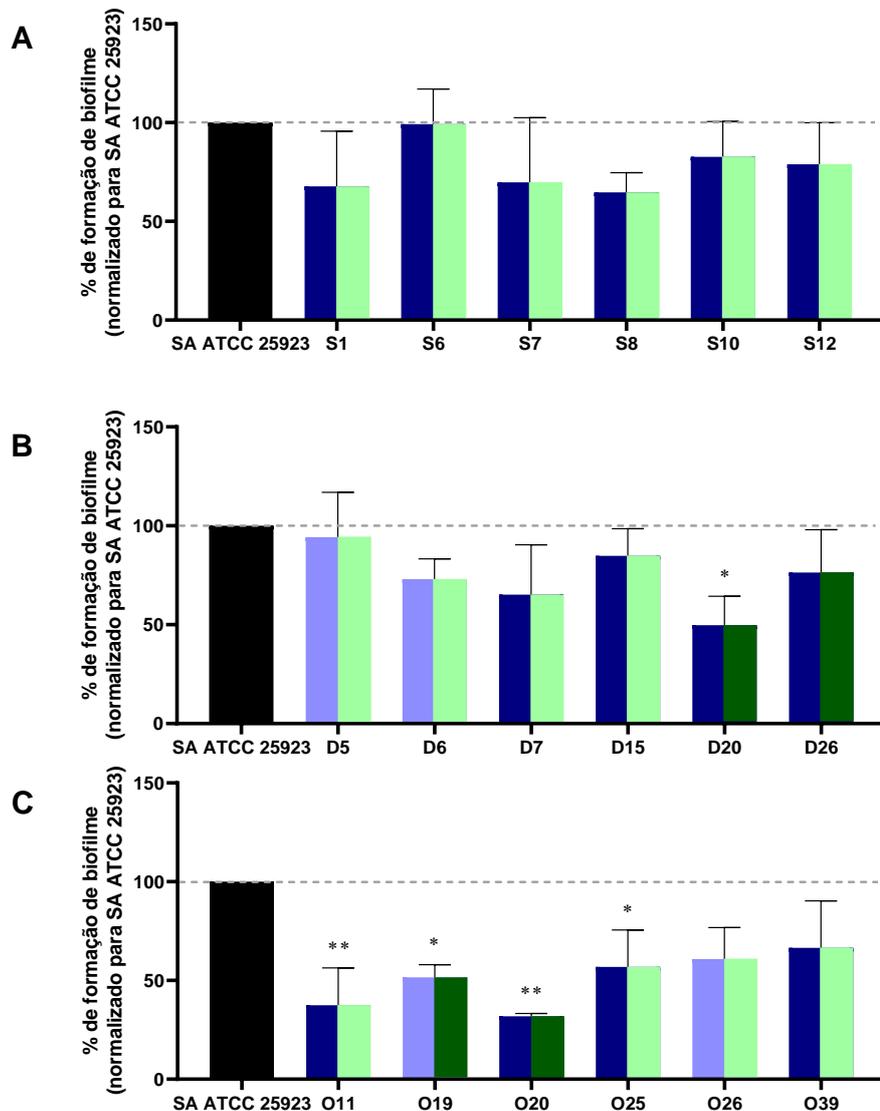


Figura 4 | Capacidade de formação de biofilme e perfil de resistência antimicrobiana de isolados clínicos de SARM. A percentagem de formação de biofilme foi avaliada através da capacidade de acumulação de biomassa por isolados clínicos provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabéticos (D) e osteomielites (O) comparativamente com a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O perfil de resistência dos isolados de *S. aureus* em relação aos antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina estão representados como: CIP – R (■, Resistente à ciprofloxacina), CIP – S (□, Sensível à ciprofloxacina), TET – R (■, Resistente à tetraciclina) e TET – S (□, Sensível à tetraciclina). Os antibiogramas foram realizados pelo grupo de investigação MicroART- UTAD. Os dados são representados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. As diferenças significativas são representadas como: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na capacidade de produção de biomassa entre os isolados provenientes de septicemias comparativamente com a estirpe controlo. No entanto, a maioria dos isolados de osteomielites (66, 66 %) e um dos isolados proveniente de úlceras de pés de diabéticos (16,66 %) produziram menos biofilme do que a estirpe controlo. De forma geral, é possível observar que os isolados provenientes de septicemias e úlceras de pés de diabéticos são bons produtores de biofilme, havendo pouca variabilidade entre as estirpes. Por outro lado, os isolados de osteomielites apresentam uma maior variabilidade, por vezes formando biofilmes robustos e outras vezes produzindo uma menor quantidade de biomassa. Os resultados observados reforçam que a capacidade de formação de biofilme é uma característica frequentemente presente entre os isolados clínicos de SARM.

S. aureus é um dos agentes patogénicos mais comuns em septicemias (Paulsen et al., 2015) e a utilização de dispositivos médicos, como cateteres venosos e próteses ortopédicas, tem sido apontada como importante fator de risco para o estabelecimento destas infeções (Thomer, Schneewind, & Missiakas, 2016). Para além disso, os isolados clínicos de SARM provenientes de bacteremia têm sido reportados como bons produtores de biofilme (Guembe et al., 2018; Kwiecinski et al., 2019), sendo o desenvolvimento de endocardite infecciosa uma das complicações mais preocupantes da presença de *S. aureus* na corrente sanguínea (Rasmussen et al., 2011). No entanto, uma vez na corrente sanguínea, os estafilococos podem desencadear uma resposta inflamatória aguda, que pode causar danos os tecidos do hospedeiro ou até mesmo resultar em morte (Singer et al., 2016). De acordo com estudos anteriores, a etapa de dispersão de células dos biofilmes pode permitir a passagem de células planctónicas para a corrente sanguínea, resultando em septicemia (Fleming & Rumbaugh, 2018; Koo, Allan, Howlin, Stoodley, & Hall-Stoodley, 2017). A alta capacidade de formação de biofilme apresentada pelos isolados provenientes de septicemias investigados no presente trabalho pode indicar que estes isolados são provenientes de uma infeção preexistente causada por biofilme.

No que se refere aos isolados provenientes de úlceras de pés de diabéticos, os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com estudos anteriores que observaram que os isolados provenientes deste tipo de infeção são bons formadores de biofilmes (Kwiecinski et al., 2019; Podbielska, Galkowska, Stelmach, Mlynarczyk, & Olszewski, 2010). Sabe-se que as úlceras em pé de diabéticos contribuem para a diminuição da qualidade de vida do paciente, podendo resultar em amputações dos membros inferiores, aumento da mortalidade e desenvolvimento de outras infeções, como osteomielite (Davis, Martinez, & Kirsner, 2006). A formação de biofilme é uma característica comum entre os isolados de *S. aureus* provenientes de infeções de pele e esta capacidade contribui para o caráter crónico e

recorrente das úlceras em pés de diabéticos (Kwiecinski, Kahlmeter, & Jin, 2015). A próprio diabetes aumenta a suscetibilidade do paciente a infecções relacionadas com biofilmes, uma vez que além de possuir problemas no sistema imune inato, as células de pacientes diabéticos são mais suscetíveis a adesão de microrganismos (Calvet e Yoshikawa, 2001; Peleg et al., 2007). No entanto, a natureza crónica das úlceras em pés de diabéticos não é apenas atribuída à suscetibilidade do hospedeiro, mas também a características fenotípicas da bactéria (Kwiecinski et al., 2015).

S. aureus também é o agente infeccioso mais comum em quadros de osteomielite (Brady et al., 2008). As bactérias podem entrar em contacto com o osso por diversas maneiras, como através de um trauma ou infecção subjacente (Lew & Waldvogel, 2004). Uma vez em contacto com o osso, as células bacterianas formam biofilmes, ocasionando danos ao tecido do hospedeiro (Archer et al., 2011). Contrariamente aos resultados encontrados no presente trabalho, os isolados provenientes de osteomielites têm sido reportados como bons produtores de biofilmes (Kahl & Becker, 2016; Kwiecinski et al., 2019), sendo inclusive reportados como melhores produtores de biofilme dos que os isolados provenientes de bacteremia (Kahl & Becker, 2016). Os resultados observados no presente trabalho são assim intrigantes, uma vez que a formação de biofilme faz parte da patogénese de osteomielites (Archer et al., 2011). No entanto, a capacidade de invadir osteoblastos e formar pequenas colónias variantes (Small-Colony Variants - SCVs) também é um mecanismo de patogenicidade importante no desenvolvimento de osteomielites (Garzoni & Kelley, 2009; Shi & Xianlong, 2012), o que pode justificar uma menor importância da capacidade de formação de biofilme para o desenvolvimento deste tipo de infecção. De forma geral, os resultados encontrados no presente trabalho indicam que há diferenças na capacidade de formação de biofilme *in vitro*. No entanto, não há uma completa compreensão se as estirpes melhores produtoras de biofilmes causam preferencialmente infecções associadas a biofilmes ou se a capacidade de produzir biofilme é aumentada enquanto as bactérias se adaptam ao novo ambiente durante o desenvolvimento da infecção (Kwiecinski et al., 2019).

4.2.2 Análise da estrutura do biofilme por CLSM

A utilização de CLSM em conjunto com as sondas fluorescentes DAPI e WGA-TRIC permitiu a observação da distribuição das células bacterianas e de polissacáridos presentes na MEP dos biofilmes. Na figura 5 é possível visualizar a distribuição individual e simultânea (colocalização) de ácidos nucleicos e polissacáridos presentes no biofilme formado pela estirpe controlo.

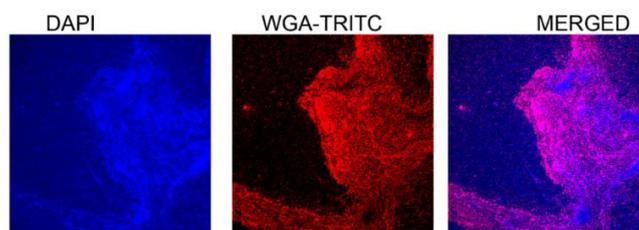


Figura 5| Composição macromolecular da matriz do biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obtida por microscopia confocal. A coloração com DAPI (azul) permite a detecção de ácidos nucleicos e a visualização de células bacterianas. A coloração WGA-TRITC (vermelho) indica a presença do conteúdo de polissacáridos atribuído à produção de PIA. Análise de colocalização de ambas as sondas é indicada como MERGED. Os biofilmes foram observados com uma objetiva de 10 x.

Após 24 h de incubação, os biofilmes de *S. aureus* são bastante heterogêneos, sendo formados por áreas de alta densidade (presença de aglomerados com várias camadas – Fig. 6A) e de baixa densidade (presença de microcolônias de apenas uma camada – Fig. 6B). Dada a heterogeneidade observada, foi priorizada a realização de uma análise qualitativa relativamente à estrutura dos biofilmes formados pelos isolados clínicos investigados no presente trabalho (Fig. 7). De uma forma geral, todos os isolados foram capazes de formar biofilmes com as mesmas estruturas da estirpe controlo, variando, no entanto, a distribuição entre zonas de alta e baixa densidade.

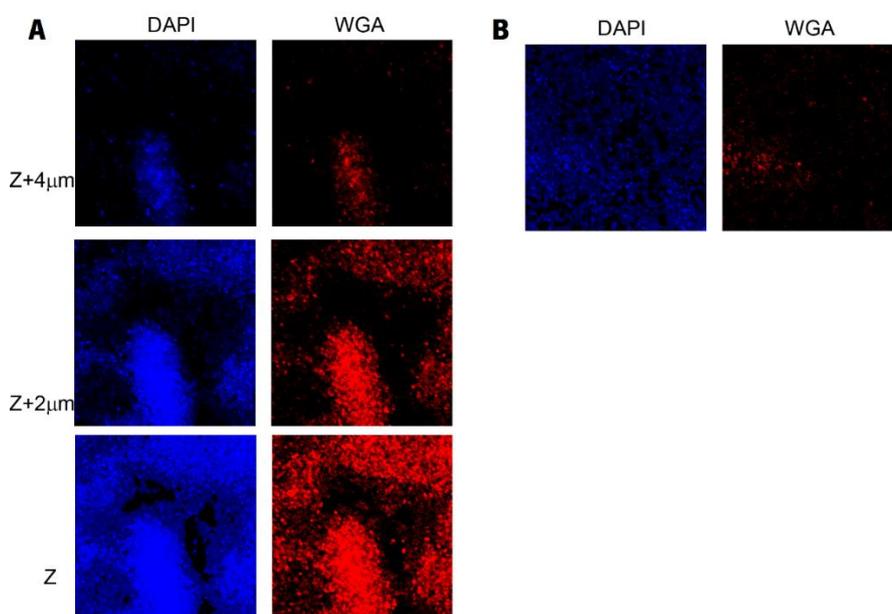


Figura 6| Imagem representativa da composição macromolecular da matriz de biofilmes de *Staphylococcus aureus* obtida por CLSM. Matriz do biofilme do isolado proveniente de úlceras de pés de diabéticos (D15). A) regiões de alta densidade e B) regiões de baixa densidade. Imagens no eixo z foram conseguidas em intervalos de 2 µm. As regiões coradas com DAPI (azul) indicam a presença de ácidos nucleicos e as regiões coradas com WGA-TRITC (vermelho) indicam a presença de polissacáridos.

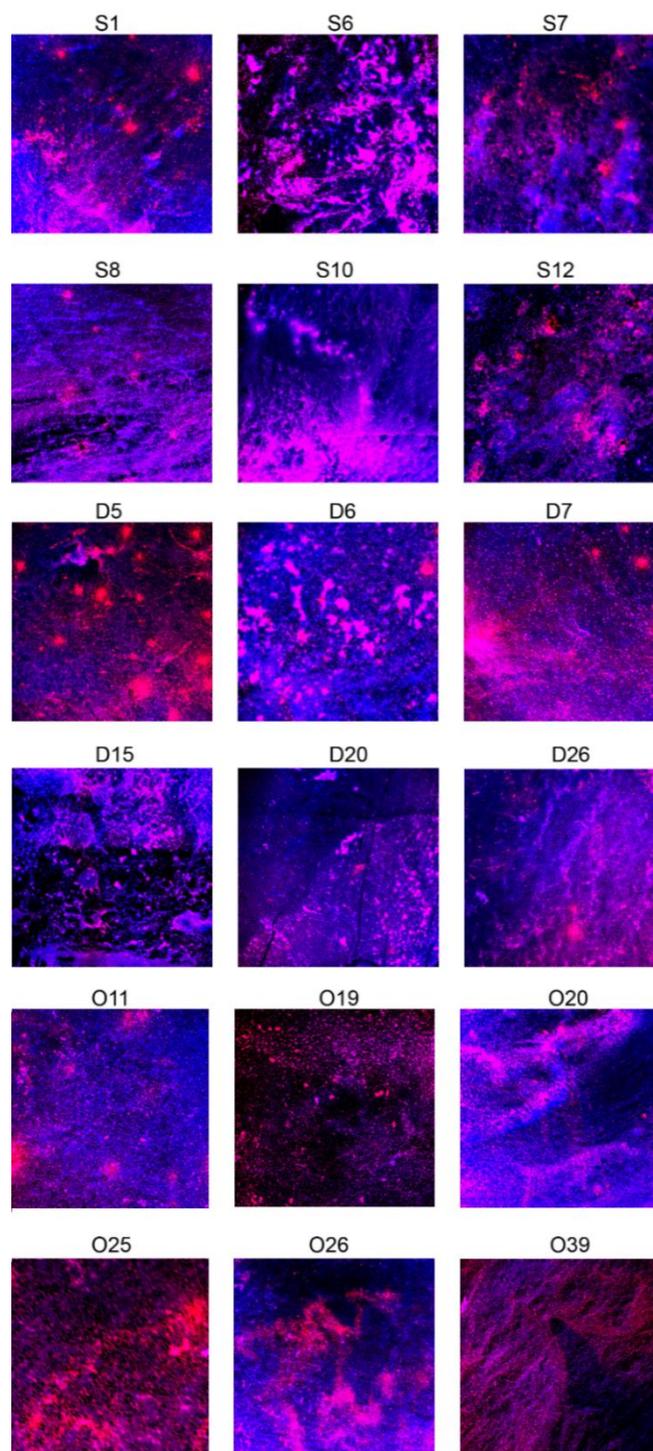


Figura 7 | Estrutura de biofilmes de isolados clínicos de SARM. Imagens representativas da colocalização de ácidos nucleicos e polissacáridos presentes em biofilmes de isolados clínicos provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabético (D) e osteomielites (O), após coloração com DAPI e WGA-TRITC. Um eixo z é apresentado para cada biofilme. Os biofilmes foram observados com uma objetiva de 10 x.

Os isolados D20, O11 e O19 foram aqueles que mostraram a presença de maiores regiões compostas por pequenos aglomerados dispersos e uma maior presença de microcolônias. Curiosamente, estes isolados tiveram uma menor capacidade de produção de biomassa comparativamente à estirpe controle,

como é possível observar na secção anterior. Além disso, os resultados observados sugerem que os isolados clínicos provenientes de septicemias, de úlceras de pés de diabéticos e osteomielites possuem a capacidade de formar biofilmes com alto teor polissacáridos, uma vez que as células presentes no biofilme foram frequentemente circundadas por estas biomoléculas. Os polissacáridos presentes na MEP desempenham diversas funções como a de promover a adesão das células bacterianas a superfícies, atuar como barreira protetora contra as células do sistema imune e antibióticos, promover a retenção de água e realizar a desintoxicação de xenobióticos (Flemming & Wingender, 2010). Os resultados observados no presente estudo podem ser úteis para direcionar a investigação de compostos anti-biofilmes (Rodríguez-Lázaro et al., 2018). No entanto, como os polissacáridos não são os únicos componentes presentes na MEP de biofilmes, novos estudos devem ser realizados para permitir a visualização de outros constituintes como proteínas e e-ADN.

4.3 Avaliação da atividade antibacteriana do OE *T. capitata* em células planctónicas de SARM

Nos últimos anos, o aumento da resistência aos antibióticos disponíveis para o tratamento de infeções resultantes da colonização por SARM levaram à busca de novas estratégias terapêuticas (Kaur & Chate, 2015). Nesta procura, os produtos de origem vegetal têm vindo a receber especial atenção (Kavanaugh & Ribbeck, 2012; Sartoratto et al., 2004; Thielmann, Muranyi, & Kazman, 2019). O amplo espectro de atividades antimicrobianas dos OEs é reconhecido desde a antiguidade. No entanto, o aumento do interesse pelo “consumo verde” tem levado a um aumento do interesse científico por estes produtos (Burt, 2004). Para além disso, um provável baixo risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana tem sido associado aos OEs (Hammer, Carson, & Riley, 2012). Diversos estudos têm demonstrado que o OE de *T. capitata* possui um largo espectro de atividade antimicrobiana (Delgado-Adámez et al., 2017; Faleiro et al., 2005; Machado et al., 2017; Palmeira-De-Oliveira et al., 2012). Porém, o seu potencial antibacteriano contra isolados clínicos de SARM permanece pouco claro, razão pela qual foi investigado no presente estudo. Para isso, a atividade antibacteriana do OE de *T. capitata* foi avaliada contra células planctónicas de isolados de clínicos de SARM (Tab. 4).

A determinação da CMI e da CML mostra uma forte atividade antibacteriana com valores de CIM e de CML entre 0,32 e 0,64 µL/mL. Constatam-se efeitos semelhantes do OE contra todos os isolados clínicos de SARM estudados, de forma independente ao tipo de infeção. Os valores de CMI e CML são apresentados como um intervalo de diluições, uma vez que nem sempre foi possível definir apenas um único valor. Foi possível observar ainda, que os valores de CML obtidos foram frequentemente o dobro

dos valores de CMI. Esta observação realça a importância da realização de ensaios para a determinação das concentrações letais, uma vez que a inspeção visual ou leituras de absorvâncias podem ser insuficientes para esta finalidade (Teixeira et al., 2012).

Tabela 4 | Determinação das concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) do óleo essencial de *Thymbra capitata* L. contra isolados clínicos SARM provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabético (D) e osteomielites (O).

Isolados	Óleo essencial de <i>Thymbra capitata</i>	
	CMI ^a	CML ^a
SA ATCC 25923	0,32 - 0,64	0,32 - 0,64
S1	0,64	0,64
S6	0,32 - 0,64	0,32 - 0,64
S7	0,32 - 0,64	0,64
S8	0,32 - 0,64	0,64
S10	0,32 - 0,64	0,64
S12	0,32 - 0,64	0,64
D5	0,32 - 0,64	0,32 - 0,64
D6	0,32 - 0,64	0,64
D7	0,32 - 0,64	0,32 - 0,64
D15	0,64	0,64
D20	0,32 - 0,64	0,64
D26	0,32 - 0,64	0,64
O11	0,64	0,64
O19	0,64	0,64
O20	0,32 - 0,64	0,64
O25	0,64	0,64
O26	0,64	0,64
O39	0,32 - 0,64	0,64

Os resultados são provenientes de pelo menos três ensaios independentes;

^a Os valores de CMI e CML foram determinados pelo método de macrodiluição e são expressos em $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Os resultados encontrados no presente trabalho foram concordantes com estudos publicados anteriormente que mostram que o OE de *T. capitata* apresenta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas (Casiglia, Bruno, Scandolera, Senatore, & Senatore, 2019). Os valores de CMI e CML foram semelhantes aos observados por Salgueiro e colaboradores (2004) contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, confirmando, assim, o potencial do OE de *T. capitata* para diferentes microrganismos. Porém, Machado e colaboradores (2017) observaram uma concentração de CMI e CML 4 vezes inferior (0,16 $\mu\text{L}/\text{mL}$) para isolados de *Gardnerella* spp.

O DMSO, uma molécula anfipática capaz de solubilizar substâncias polares e apolares e transpor barreiras hidrofóbicas, é amplamente utilizado para solubilizar drogas de aplicações terapêuticas (Costa et al., 2017; Timm, Saaby, Moesby, & Hansen, 2013). Por este motivo, o DMSO foi utilizado para

promover uma difusão mais uniforme do OE no meio de cultura. Não foi possível observar efeito inibitório da presença do DMSO no crescimento bacteriano após 24 h de incubação através do método de microdiluição. De acordo com Basch e Gadebusch (1968), a CMI do DMSO para estirpes de *S. aureus* é de 8 - 30 % (v/v), portanto a concentração de 0,128 % (v/v) utilizada no presente estudo não tem efeito inibitório.

Diversos OEs, como o de *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Cinnamomum verum* (canela), *Cymbopogon flexuosus* (capim limão), *Backhousia citriodora* (murta Limão) e *Satureja montana* (segurelha das montanhas), demonstraram efeito forte inibitório contra SARM, com zonas de inibição entre 60 e 83 mm num ensaio de difusão em disco (Chao et al., 2008). No trabalho realizado por Abed e colaboradores (2014), foi possível observar que o efeito inibitório do OE de *T. capitata* variou entre moderado e forte com zonas de inibição entre 20 e 75 mm. No entanto, contrariamente as observações realizadas no presente trabalho, através do método de microdiluição os autores observaram valores de CMI de 0,32 a 5 mg/mL. Uma comparação da eficiência entre os diferentes OEs analisados em diferentes estudos é por vezes difícil devido ao uso de diferentes métodos (Thielmann et al., 2019). Por esta razão, não é possível realizar uma comparação fiável dos resultados do potencial antibacteriano do OE de *T. capitata* observado com os resultados observados para diferentes OEs.

A atividade dos OEs é justificada pelo tipo de componentes que o constituem. O OE de *T. capitata* é rico em polifenóis e monoterpenóides. Tem sido reportado na literatura que os compostos fenólicos são responsáveis pelas atividades antibacterianas dos OEs (Jaberian, Piri, & Nazari, 2013). O carvacrol, um monoterpeno fenólico abundante no OE de *T. capitata*, pode ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana observada. Isto foi demonstrado no caso de biofilmes de *Gardnerella vaginalis* (Machado et al., 2017), um dos principais microorganismos associados aos biofilmes presentes em infeções de vaginose bacteriana (Rosca, Castro, Sousa, & Cerca, 2020). No entanto, os OEs são misturas complexas e a influência dos outros compostos não deve ser negligenciada (Delgado-Adámez et al., 2017). Por esse motivo, deve ter-se em consideração que a atividade biológica pode ser devida ao efeito sinérgico dos diferentes compostos presentes nos OEs ou, ainda, um efeito antagónico entre os diferentes componentes pode ser verificado, o que leva a uma menor atividade antibacteriana (Caesar & Cech, 2019).

De acordo com Candela e colaboradores (2019), o principal mecanismo de ação deste OE está relacionado com a sua capacidade de interagir com a membrana celular e causar alteração na estrutura

da bicamada lipídica. Apesar do carvacrol ser referido como o composto mais ativo do OE de *T. capitata*, um efeito sinérgico é atribuído à presença de p-cimeno e γ -terpineno. Estes compostos são responsáveis por causar desestabilização da membrana e, assim, facilitar a penetração do carvacrol na célula (Arfa, Combes, Preziosi-Belloy, Gontard, & Chaliier, 2006; Candela et al., 2019). Para além de se pensar que os OEs não promovem a aquisição de resistência, diversos autores relatam que o uso combinado com antibióticos pode ser uma estratégia interessante para a erradicação de infeções causadas por SARM (Aljaafari, Alhosani, Abushelaibi, Lai, & Erin Lim, 2020; Yap, Yiap, Ping, & Lim, 2014). Cabe destacar ainda que os OEs são produtos de obtenção relativamente fácil, apresentam baixa toxicidade em mamíferos e degradam-se rapidamente na água e no solo, tornando-os relativamente ecológicos (Kavanaugh & Ribbeck, 2012). No entanto, embora sejam amplamente conhecidos pelas suas propriedades terapêuticas, os OEs ainda não são largamente utilizados para o tratamento de infeções (Edwards-Jones, Buck, Shawcross, Dawson, & Dunn, 2004).

4.4 Avaliação da atividade anti-biofilme do OE *T. capitata* contra isolados SARM

Nos últimos anos, a importância clínica da capacidade de formação de biofilme por bactérias vem sendo reconhecida (Davies, 2003; Stewart & Franklin, 2008). A sensibilidade reduzida aos antibióticos das células bacterianas em biofilme contribui para o estabelecimento de inúmeras infeções crónicas e recalcitrantes (Stewart & Costerton, 2001). Para além disso, as células em biofilmes são mais resistentes e tolerantes aos antibióticos (Lebeaux et al., 2014). Por esse motivo, a busca de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de infeções decorrentes do desenvolvimento de biofilmes é essencial (Marini et al., 2019). No entanto, o tratamento de infeções associadas a biofilmes depende dos relatórios laboratoriais de suscetibilidade aos antibióticos realizados com células planctónicas (Brady, Lavery, Gilpin, Kearney, & Tunney, 2017). Diversos estudos demonstram que a suscetibilidade das células em biofilme é diferente das células planctónicas (Brady et al., 2017; Cerca et al., 2005; Frank, Reichert, Piper, & Patel, 2007). Por este motivo, o efeito anti-biofilme do OE de *T. capitata* foi investigado selecionando-se dois isolados clínicos de cada infeção com diferentes perfis de suscetibilidade a antibióticos e diferentes capacidades de formação de biofilme.

A redução da produção de biomassa após incubação com diferentes agentes antimicrobianos é apresentada na figura 8A. Embora não exista uma grande variabilidade em termos da CML do OE de *T. capitata* contra células planctónicas de SARM, o efeito na capacidade de redução da biomassa foi muito diverso. Notavelmente, a concentração de OE necessária para a erradicação das células planctónicas

(0,64 $\mu\text{L}/\text{mL}$) foi insuficiente para reduzir a biomassa de alguns isolados. O efeito do OE foi também comparado com o efeito de 2 antibióticos utilizados para tratar infecções por SARM, com distintos mecanismos de ação. De acordo com o esperado, o inibidor da síntese de ácidos nucleicos (ciprofloxacina) não apresentou um efeito significativo a nível da redução da biomassa para a maioria dos isolados, uma vez que a maioria dos isolados investigados são resistentes a este antibiótico. No entanto, apesar de maioria dos isolados terem sido considerados suscetíveis ao inibidor da síntese de proteínas (tetraciclina), foi possível observar que este antibiótico também não foi capaz de induzir uma grande redução da biomassa.

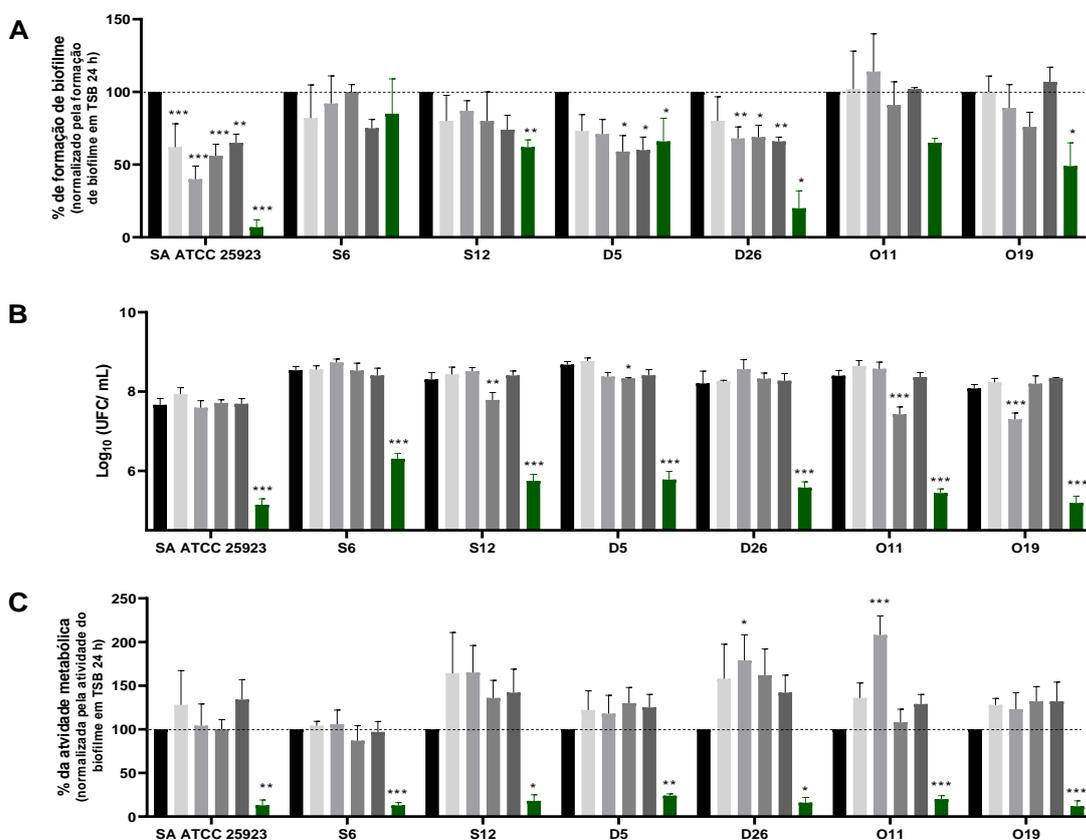


Figura 8 | Avaliação do potencial anti-biofilme do óleo essencial de *T. capitata*. Quantificação da (A) biomassa de biofilmes, (B) cultivabilidade celular e (C) atividade metabólica de isolados de SARM provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabéticos (D) e osteomielites (O) após incubação com TSB 24 h (■), TSB 48 h (▒), ciprofloxacina (▓), tetraciclina (■), TSB e DMSO (■) e OE (■). As concentrações utilizadas de cada antibiótico correspondem ao valor de Pico de Concentração Sérica (PCS), sendo 4,5 mg/L para ciprofloxacina e 16,0 mg/L para tetraciclina. TSB 24 h indica a incubação por 24 h em TSB e TSB 48 h indica a incubação por 48 h em TSB. A concentração de OE e DMSO utilizadas correspondem a 0,64 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Os valores são apresentados como média de três ensaios independentes e as barras indicam desvio padrão. As diferenças significativas são representadas como: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Curiosamente, um dos isolados resistentes a ambos os antibióticos (D26) teve uma redução relativa da biomassa superior a muitos isolados que eram suscetíveis a este antibiótico, o que confirma que a tolerância dos biofilmes a antibióticos depende de mecanismos distintos dos mecanismos de ação clássicos, estudados em células planctônicas (Dufour et al., 2010; Sharma et al., 2019). Curiosamente, o efeito dos antibióticos e do OE na estirpe controlo foi significativamente superior ao dos isolados clínicos. Além disso, é possível observar que após 48 h de incubação em TSB e em TSB com DMSO houve uma redução da produção de biomassa. Esta observação pode indicar a existência de estímulos favoráveis à dispersão de biofilme como uma resposta as mudanças ambientais (Sauer et al., 2004). De forma geral, os resultados observados estão de acordo com o esperado, visto que as células em biofilmes são mais resistentes a fatores externos, como antibióticos, detergentes, exposição a raios UV, desidratação, salinidade e fagocitose (Watnick & Kolter, 2000).

Os biofilmes são comunidades heterogêneas formadas por células bacterianas numa ampla variedade de estados fisiológicos, sendo composto por células metabolicamente ativas, células dormentes e células viáveis mas não cultiváveis (Ayrapetyan, Williams, & Oliver, 2018; Stewart & Franklin, 2008). Por isso, é importante ter em consideração que a utilização de apenas um método para determinação do efeito de diferentes agentes antimicrobianos pode ser insuficiente. A coloração com CV é um ensaio rápido e barato para analisar a capacidade de produção de biofilmes. Por ser um corante básico, o CV liga-se as moléculas de carga negativa como os polissacáridos da MEP e ao ADN (Brady et al., 2017; Li, Yan, & Xu, 2003). Esta técnica pode, até certo ponto, inferir a viabilidade celular, uma vez que a maioria das células aderidas em biofilme se libertam durante a morte celular (Peeters et al., 2008). No entanto, como todas as células coram, mesmo as mortas, devem combinar-se diferentes métodos para avaliar este efeito antimicrobiano contra os biofilmes (Azeredo et al., 2017; Pitts, Hamilton, Zilver, & Stewart, 2003). Contrariamente ao observado a nível de produção de biomassa, todos os isolados testados apresentaram uma redução significativa da cultivabilidade celular após incubação com o OE, reduzindo a cultivabilidade em cerca de 2 log₁₀ UFC/mL (99 % de redução) (Fig. 8B). De modo semelhante ao observado a nível da produção de biomassa, o antibiótico ciprofloxacina não reduziu a cultivabilidade celular na maioria dos isolados investigados. Por outro lado, a tetraciclina apresentou uma significativa capacidade de redução da cultivabilidade celular para isolados previamente considerados suscetíveis através do ensaio de difusão em disco. A diferença observada em termos de formação de biomassa e cultivabilidade não foi surpreendente, tendo sido já reportado anteriormente em outros estudos (Azeredo et al., 2017; Chavez-Dozal, Nourabadi, Erken, McDougald, & Nishiguchi, 2016).

Na figura 8C pode observar-se a redução média da atividade metabólica de biofilmes de SARM após exposição a diferentes agentes antimicrobianos. Os resultados encontrados foram muito semelhantes aos observados a nível da cultivabilidade celular no que se refere ao potencial do OE de *T. capitata*. No entanto, é possível observar que tanto a ciprofloxacina quanto a troca do meio de cultura por meio fresco podem contribuir para o aumento da atividade metabólica do biofilme. Os procedimentos de substituição de meio cultura em sistemas fed-batch tanto contribuem para o desprendimento de células do biofilme devido às forças de cisalhamento (França, Carvalhais, Vilanova, Pier, & Cerca, 2016) como também fornecem mais nutrientes as células (Cerca, Pier, Vilanova, Oliveira, & Azeredo, 2004), o que pode culminar no aumento da atividade metabólica. No entanto, tem sido reportado que a atividade metabólica não é afetada apenas pelo número de células viáveis (Kuhn, Balkis, Chandra, Mukherjee, & Ghannoum, 2003) e que a presença de certos produtos químicos pode causar uma redução abiótica de XTT (Al-Bakri & Afifi, 2007). Deste modo, os resultados observados no presente trabalho podem indicar que condições de stresse e um maior suprimento de nutrientes podem aumentar a atividade metabólica das células de SARM em biofilme, mas novos estudos devem ser realizados neste sentido.

Tem sido reportado que o uso de antibióticos parece não erradicar os biofilmes em muitos dos casos de infeções, mas apenas o suprime temporariamente até que as condições do meio ambiente voltem a estar favoráveis (Verderosa, Totsika, & Fairfull-Smith, 2019). Nos últimos anos, há uma tendência crescente de busca por estratégias terapêuticas para o tratamento do biofilme e os OEs são consideradas fontes potenciais de novos fármacos quimioterapêuticos devido ao seu potencial antibacteriano e baixa toxicidade (Algburi, Comito, Kashtanov, Dicks, & Chikindas, 2017; Anand, Jacobo-Herrera, Altemimi, & Lakhssassi, 2019). Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que o OE de *T. capitata* é um forte candidato para o tratamento de biofilmes decorrentes de infeções causadas por SARM. Para além disso, a incapacidade do antibiótico de penetrar nos biofilmes é um fator que geralmente influencia na resistência aos antibióticos, uma vez que reduz a capacidade do antibiótico interagir com as bactérias do biofilme (Davies, 2003). Dado que os OEs podem penetrar e danificar biofilmes (Nuryastuti et al., 2009), este produto natural pode servir para facilitar a entrada de antibióticos nos biofilmes. Além disso, por ser um produto de baixo custo, o uso de combinações de OEs com antibióticos pode reduzir significativamente o custo das terapias (Nuryastuti et al., 2009).

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5.1 Principais conclusões

O potencial antimicrobiano do OE de *T. capitata* tem vindo a ser alvo de vários estudos, mas as informações sobre o seu efeito em isolados de SARM são limitadas. No presente trabalho, foi demonstrado que o OE de *T. capitata* tem atividade antimicrobiana tanto em células planctónicas quanto em biofilmes de isolados SARM provenientes de septicemias, úlceras de pés de diabéticos e osteomielites. Foi possível observar ainda que a suscetibilidade ao OE pode ser independente do perfil de suscetibilidade a antibióticos, indicando o seu uso potencial como agente antibacteriano para o tratamento de infeções resultantes da colonização por bactérias resistentes a antibióticos. No entanto, a concentração de OE suficiente para erradicar as células planctónicas não foi suficiente para erradicar as células em biofilmes. O presente estudo mostrou o promissor potencial anti-biofilme do OE de *T. capitata*, porém novos estudos devem ser realizados para permitir uma compreensão mais profunda do potencial antibacteriano deste OE.

5.2 Perspetivas futuras

O presente trabalho destacou o potencial antimicrobiano do OE de *T. capitata* contra isolados clínicos de SARM, porém algumas limitações podem ser destacadas. Uma vez que o principal mecanismo de ação dos OEs está relacionado com danos na membrana celular, é pouco provável que os OEs sejam seletivamente citotóxicos como os antibióticos (Owen & Laird, 2018). Por esta razão, o desenvolvimento de nanoencapsulados com o EO de *T. capitata* podem representar uma abordagem eficiente para combater bactérias de SARM dentro de biofilmes (Khezri, Farahpour, & Mounesi Rad, 2019).

Atualmente, certos OEs e alguns de seus compostos são classificados como geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, do inglês generally recognized as safe) pela Food and Drug Administration (FDA). No entanto, existem ainda poucos estudos que analisam a citotoxicidade dos OEs em diferentes contextos clínicos (Owen & Laird, 2018). Cabe referir que tem sido reportado que alguns OEs são citotóxicos para células procarióticas às concentrações com atividade antimicrobiana, mas as informações disponíveis ainda permanecem ambíguas (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015). Por esse motivo, é interessante investigar o potencial mutagénico e genotóxico do OE de *T. capitata* contra linhagens celulares humanas.

Alguns estudos têm apontado a utilização simultânea de OEs e antibióticos como uma solução para potenciar a atividade dos antibióticos atualmente em uso (Langeveld et al., 2014; Magi et al., 2015; Yap

et al., 2014). Tem ainda sido citado na literatura que as formulações contendo OEs e antibióticos podem permitir uma ressensibilização ao antibiótico em isolados previamente considerados resistentes (Schelz, Molnar, & Hohmann, 2006; Yap, Lim, Hu, & Yiap, 2013). No entanto, os efeitos sinérgicos não são comumente explorados para além de uma identificação preliminar da atividade antibacteriana, além de que os mecanismos de ação envolvidos são raramente explorados. Por esse motivo, para que seja possível o desenvolvimento de novas formulações antibacterianas, em trabalhos futuros deve explorar-se o potencial antimicrobiano de combinações entre OE de *T. capitata* com diferentes antibióticos, bem como investigar os mecanismos de ação envolvidos.

Cabe ainda destacar que, apesar do OE de *T. capitata* possuir uma homogeneidade química caracterizada por altas quantidades de carvacrol, p -cymene e γ -terpinene (Delgado-Adámez et al., 2017), a existência de variabilidade química na composição de OEs de diferentes lotes pode resultar numa alteração do seu potencial antimicrobiano (Figueiredo et al., 2008; Tommasi et al., 2007). Por esta razão, a utilização dos compostos purificados provenientes do OE vem sendo apontada como uma alternativa para esta limitação (Machado et al., 2017; Palmeira-De-Oliveira et al., 2012). Por esse motivo, a realização de estudos que busquem comparar o potencial antimicrobiano do OE de *T. capitata* com o potencial antimicrobiano dos seus componentes poderá superar os problemas relacionados com a variabilidade química dos OEs, garantindo uma maior reprodutibilidade dos efeitos antibacterianos observados.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, *16*(9), 7672–7690. <https://doi.org/10.3390/molecules16097672>
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, *24*(2), e51–e56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Agarwal, A., & Jain, A. (2013). Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian Journal of Medical Research*, *138*(AUG), 262–266.
- Akineden, Ö., Hassan, A. A., Schneider, E., & Usleber, E. (2011). A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. *Journal of Dairy Research*, *78*(1), 38–42. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000774>
- Akiyama, T., Chikuda, H., Yasunaga, H., Horiguchi, H., Fushimi, K., & Saita, K. (2013). Incidence and risk factors for mortality of vertebral osteomyelitis: A retrospective analysis using the japanese diagnosis procedure combination database. *BMJ Open*, *3*(3), 1–6. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002412>
- Al-Bakri, A. G., & Afifi, F. U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, *68*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.013>
- Alaklobi, F., Aljobair, F., Alrashod, A., Alhababi, R., Alshamrani, M., Alamin, W., ... Mertz, D. (2015). The prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among outpatient children in a tertiary hospital: A prospective observational study in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine*, *2*(3–4), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2015.09.001>
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017). Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(8), 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Aljaafari, M., Sultan Alhosani, M., Abushelaibi, A., Lai, K.-S., & Erin Lim, S.-H. (2020). Essential Oils: Partnering with Antibiotics. *Essential Oils - Oils of Nature*, 1–17. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86575>
- Allard, C., Carignan, A., Bergevin, M., Boulais, I., Tremblay, V., Robichaud, P., ... Pepin, J. (2008). Secular changes in incidence and mortality associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Quebec, Canada, 1991–2005. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(5), 421–428. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01965.x>
- Ammendolia, M. G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C. R., & Baldassarri, L. (1999). Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(10), 3235–3238. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.10.3235-3238.1999>
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, *9*(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/metabo9110258>
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirliff M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, *2*(5), 445–459.
- Arciola, C. R., Visai, L., Testoni, F., Arciola, S., Campoccia, D., Speziale, P., & Montanaro, L. (2011). Concise survey of *Staphylococcus aureus* virulence factors that promote adhesion and damage to peri-implant tissues. *International Journal of Artificial Organs*, *34*(9), 771–780. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000046>

- Arfa, A. Ben, Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Rasool, M. H., Nisar, M. A., ... Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 1645–1658.
- Assis, L. M., Nedeljković, M., & Dessen, A. (2017). New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Resistance Updates*, 31, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2017.03.001>
- Athanasopoulos, A. N., Economopoulou, M., Orlova, V. V., Sobke, A., Schneider, D., Weber, H., ... Chavakis, T. (2006). The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood*, 107(7), 2720–2727. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3140>
- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of Bacteriology*, 200(20), 1–15.
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., ... Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barata, A. M., Rocha, F., Lopes, V., & Carvalho, A. M. (2016). Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. *Industrial Crops and Products*, 88, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.035>
- Basch, H., & Gadebusch, H. (1968). In vitro antimicrobial activity of rifampicin. *Applied Microbiology*, 16(12), 1953. <https://doi.org/10.11250/chemotherapy1953.18.334>
- Bauer, J., Siala, W., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2013). A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2726–2737. <https://doi.org/10.1128/AAC.00181-13>
- Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc. (2004). *CIPRO (ciprofloxacin hydrochloride)*.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Berger-Bächli, B., & Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of Microbiology*, 178(3), 165–171. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0436-0>
- Berlutti, F., Frioni, A., Natalizi, T., Pantanella, F., & Valenti, P. (2014). Influence of sub-inhibitory antibiotics and flow condition on *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 biofilm development and biofilm growth rate: BioTimer Assay as a study model. *Journal of Antibiotics*, 67(11), 763–769. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.66>
- Berube, B. J., & Wardenburg, J. B. (2013). *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5(6), 1140–1166. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>
- Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2015). Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(12), 1499–1516. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1100533>
- Bhavan, K. P., Marschall, J., Olsen, M. A., Fraser, V. J., Wright, N. M., & Warren, D. K. (2010). The epidemiology of hematogenous vertebral osteomyelitis: A cohort study in a tertiary care hospital. *BMC Infectious Diseases*, 10, 2–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-158>
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/601905>

- Birt, M. C., Anderson, D. W., Bruce Toby, E., & Wang, J. (2017). Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *Journal of Orthopaedics*, *14*(1), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2016.10.004>
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G., & Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters*, *259*(2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x>
- Boesl, R., & Saarinen, H. (2016). Essential oil education for health care providers. *Integrative Medicine*, *15*(6), 38–40.
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathogens*, *4*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*, *19*(9), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.06.004>
- Boles, B. R., Thoende, M., Roth, A. J., & Horswill, A. R. (2010). Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS ONE*, *5*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010146>
- Brady, A., Laverty, G., Gilpin, D. F., Kearney, P., & Tunney, M. (2017). Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: Should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *Journal of Medical Microbiology*, *66*(4), 461–469. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000466>
- Brady, R., Leid, J. G., Calhoun, J. H., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *52*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>
- Brett, M., & Bradfute, S. (2015). *Staphylococcus aureus*: Current State of Prevalence, Impact, and Vaccine Development. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(16), 2131–2135. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150310101347>
- Brooks, J. L., & Jefferson, K. K. (2014). Phase Variation of Poly-N-Acetylglucosamine Expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathogens*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004292>
- Brown, D., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., & Wren, M. W. D. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(6), 1000–1018. <https://doi.org/10.1093/jac/dki372>
- Brown, S., Santa Maria, J. P., & Walker, S. (2013). Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *67*(1), 313–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
- Buldain, D., Buchamer, A. V., Marchetti, M. L., Aliverti, F., Bandoni, A., & Mestorino, N. (2018). Combination of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* as an alternative against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00177>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Butnariu, M., & Sarac, I. (2018). Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, *1*(4), 35–43. <https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489>
- Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, *36*(6), 869–888. <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>
- Calvet, H. M., & Yoshikawa, T. T. (2001). Infections in diabetes. *Infectious Disease Clinics of North America*, *15*(2), 407–421. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70153-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70153-7)
- Candela, R. G., Maggi, F., Lazzara, G., Rosselli, S., & Bruno, M. (2019). The essential oil of *Thymbra capitata* and

- its application as a biocide on stone and derived surfaces. *Plants*, 8(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants8090300>
- Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.002>
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F., & Senatore, F. (2019). Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 2704–2712. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.05.017>
- Cerca, N., Martins, S., Cerca, F., Jefferson, K. K., Pier, G. B., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2005). Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 331–336. <https://doi.org/10.1093/jac/dki217>
- Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2004). Influence of batch or fed-batch growth on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 420–424. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01601.x>
- Chambers, H. F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.781>
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Epidemic Waves of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200.Waves>
- Chang, J. (2000). Medicinal herbs: Drugs or dietary supplements? *Biochemical Pharmacology*, 59(3), 211–219. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00243-9)
- Chao, S., Young, G., Oberg, C., & Nakaoka, K. (2008). Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 444–449. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Charankaur, D., & Khare, A. S. (2013). Biofilm formation and antibiotic susceptibility pattern in MRSA strains in a tertiary care rural hospital. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*, 3(1), 37–44.
- Chauhan, R. S. (2010). Socioeconomic improvement through medicinal and aromatic plants (MAPs) cultivation in Uttarakhand, India. *Journal of Sustainable Agriculture*, 34(6), 647–658. <https://doi.org/10.1080/10440046.2010.493390>
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K. T., & Herrmann, M. (2005). The role of bacterial “Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis and Haemostasis*, 94, 278–285. <https://doi.org/10.1160/TH05>
- Chavez-Dozal, A. A., Nourabadi, N., Erken, M., McDougald, D., & Nishiguchi, M. K. (2016). Comparative analysis of quantitative methodologies for Vibrionaceae biofilms. *Folia Microbiologica*, 61(6), 449–453. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0456-9.Comparative>
- Chen, C., Zhao, Q., Guo, J., Li, Y., & Chen, Q. (2017). Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Simultaneous Detection of *mecA*, *nuc*, and *femB* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Current Microbiology*, 74(8), 965–971. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1274-2>
- Choo, E. J. (2017). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infections. *Infection and Chemotherapy*, 49(2), 143–144. <https://doi.org/10.3947/ic.2017.49.2.143>
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228–243. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>
- Clarke, S. R., & Foster, S. J. (2006). Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in Microbial Physiology*, 51, 187–224. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)51004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)51004-5)
- Clements, M. O., & Foster, S. J. (1999). Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 7(11), 458–462. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01607-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01607-8)

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (1997). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006* (5th ed.). <https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1943>
- Cobo, F. (2013). Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review. *The Open Virology Journal*, *7*(1), 84–90. <https://doi.org/10.2174/1874357920130927003>
- Costa, L. de A., Ottoni, M. H. F., Dos Santos, M. G., Meireles, A. B., De Almeida, V. G., De Fátima Pereira, W., ... Brito-Melo, G. E. A. (2017). Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- α , IFN-, and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. *Molecules*, *22*(11), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules22111789>
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, *41*(1), 435–464. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- Croes, S., Deurenberg, R. H., Boumans, M. L. L., Beisser, P. S., Neef, C., & Stobberingh, E. E. (2009). *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiology*, *9*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-229>
- Crosby, H., Kwiecinski, J., & Horswill, A. (2016). *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host-pathogen interactions Heidi. *Advances in Applied Microbiology*, *96*, 1–41. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.07.018>
- Dastgheyb, S. S., & Otto, M. (2015). Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: An overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. *Future Microbiology*, *10*(12), 1981–1995. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.116>
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000>
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(3), 616–687. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, *2*(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Davis, S. C., Martinez, L., & Kirsner, R. (2006). The diabetic foot: The importance of biofilms and wound bed preparation. *Current Diabetes Reports*, *6*(6), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s11892-006-0076-x>
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, *5*(2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90034-1)
- DeFrancesco, A. S., Masloboeva, N., Syed, A. K., DeLoughery, A., Bradshaw, N., Li, G. W., ... Losick, R. (2017). Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(29), E5969–E5978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704544114>
- Delgado-Adámez, J., Garrido, M., Bote, M. E., Fuentes-Pérez, M. C., Espino, J., & Martín-Vertedor, D. (2017). Chemical composition and bioactivity of essential oils from flower and fruit of *Thymbra capitata* and *Thymus* species. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(7), 1857–1865. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2617-5>
- Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, *33*(3), 589–609. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(2), 277–281. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010226>

- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- Donlan, R. M., & Costerton, W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>
- Downer, R., Roche, F., Park, P. W., Mecham, R. P., & Foster, T. J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 243–250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107621200>
- Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- DuMont, A. L., & Torres, V. J. (2014). Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: It's not just about lipids. *Trends in Microbiology*, 22(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.004>
- Edwards-Jones, V., Buck, R., Shawcross, S. G., Dawson, M. M., & Dunn, K. (2004). The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*, 30(8), 772–777. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.06.006>
- Eisenbeis, J., Saffarzadeh, M., Peisker, H., Jung, P., Thewes, N., Preissner, K. T., ... Bischoff, M. (2018). The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein Eap Is a DNA binding protein capable of blocking neutrophil extracellular trap formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00235>
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology*, 4 JAN(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., ... Ben Hadj Ahmed, S. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of thymus capitata essential oil with its preservative effect against listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/152487>
- Elasri, M. O., Thomas, J. R., Skinner, R. A., Blevins, J. S., Beenken, K. E., Nelson, C. L., & Smelter, M. S. (2002). *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone*, 30(1), 275–280. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00632-9](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00632-9)
- Elhassan, M. M., Ozbak, H. A., Hemeg, H. A., Elmekki, M. A., & Ahmed, L. A. (2015). Absence of the mecA gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens in Shendi City, Sudan. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/89586>.
- Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 990–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>
- Elshafie, H. S., & Camele, I. (2017). An overview of the biological effects of some mediterranean essential oils on human health. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9268468>
- Elward, A. M., McAndrews, J. M., & Young, V. L. (2009). Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Preventing Surgical Site Infections Following Plastic Surgery. *Aesthetic Surgery Journal*, 29(3), 232–244. <https://doi.org/10.1016/j.asj.2009.01.010>
- Euzéby, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 590–592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>
- Fairbrother, R. W. (1940). Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 50(1), 83–88. <https://doi.org/10.1002/path.1700500112>
- Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., ... Pedro, L. G. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8162–8168. <https://doi.org/10.1021/jf0510079>

- Fernández-Barat, L., Ben-Aicha, S., Motos, A., Vila, J., Marco, F., Rigol, M., ... Torres, A. (2018). Assessment of in vivo versus in vitro biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from endotracheal tubes. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30494-7>
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Salgueiro, L., Miguel, M., & Faleiro, M. (2008). Portuguese Thymbra and Thymus Species Volatiles: Chemical Composition and Biological Activities. *Current Pharmaceutical Design*, *14*(29), 3120–3140. <https://doi.org/10.2174/138161208786404218>
- Fitsiou, E., & Pappa, A. (2019). Anticancer activity of essential oils and other extracts from aromatic plants grown in Greece. *Antioxidants*, *8*(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/antiox8080290>
- Fitzgerald-Hughes, D., Devocelle, M., & Humphreys, H. (2012). Beyond conventional antibiotics for the future treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: Two novel alternatives. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *65*(3), 399–412. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00954.x>
- Fleming, D., & Rumbaugh, K. (2018). The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(12), 948–958. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, *6*(12), 484–488. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01400-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01400-0)
- Foulston, L., Elsholz, A. K. W., Francesco, A. S., & Losick, R. (2014). The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. *MBio*, *5*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01667-14>. Editor
- Fournier, J. M., Bouvet, A., Mathieu, D., Nato, F., Boutonnier, A., Gerbal, R., ... Mazie, J. C. (1993). New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(5), 1342–1344. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.5.1342-1344.1993>
- Fraenkel, G. S. (1959). The Raison d'Être of Secondary Plant Substances. Linked references are available on JSTOR for this article: The Raison d'Être of Secondary Plant Substances, *129*, 1466–1470.
- França, A., Carvalhais, V., Vilanova, M., Pier, G. B., & Cerca, N. (2016). Characterization of an in vitro fed - batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0197-9>
- França, A., & Cerca, N. (2016). Plasma is the main regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilms virulence genes transcription in human blood. *Pathogens and Disease*, *74*(2), 1–5. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv125>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., ... Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*, *7*(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Frank, K. L., Reichert, E. J., Piper, K. E., & Patel, R. (2007). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

51(3), 888–895. <https://doi.org/10.1128/AAC.01052-06>

- Freitas, A. I., Vasconcelos, C., Vilanova, M., & Cerca, N. (2014). Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms. *Journal of Basic Microbi*, 54(7), 750–757.
- Frickmann, H., Zautner, A. E., Moter, A., Kikhney, J., Hagen, R. M., Stender, H., & Poppert, S. (2017). Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 263–293. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1169990>
- Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., & Berche, P. (2000). Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1587–1591. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.4.1587-1591.2000>
- Gaio, V., Lima, C. A., Oliveira, F., França, Â., & Cerca, N. (2017). Carvacrol is highly disruptive against coagulase-negative staphylococci in in vitro biofilms. *Future Microbiology*, 12, 1487–1496. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0122>
- Garzoni, C., & Kelley, W. L. (2009). *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends in Microbiology*, 17(2), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.005>
- Gemechu, F. W., Seemant, F., & Curley, C. A. (2013). Diabetic foot infection. *American Academy of Family Physicians*, 88(3), 177–184. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00096.7>
- Geoghegan, J. A., Corrigan, R. M., Gruszka, D. T., Speziale, P., O’Gara, J. P., Potts, J. R., & Foster, T. J. (2010). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5663–5673. <https://doi.org/10.1128/JB.00628-10>
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., ... Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44(15), 4325–4339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.030>
- Götz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1367–1378. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.11.130>
- Götz, F., Bannerman, T., & Schleifer, K.-H. (2006). *The Genera Staphylococcus and Micrococcus. The Prokaryotes*. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1
- Graf, A. C., Leonard, A., Schäuble, M., Rieckmann, L. M., Hoyer, J., Maass, S., ... Riedel, K. (2019). Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(6), 1036–1053. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001120>
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. E., Lew, D. P., & Poster, T. J. (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Molecular Microbiology*, 17(6), 1143–1152. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061143.x
- Gross, M., Cramton, S. E., Go, F., & Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*, 69(5), 3423–3426. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3423>
- Grumann, D., Nübel, U., & Bröker, B. M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>
- Guembe, M., Alonso, B., Lucio, J., Pérez-Granda, M. J., Cruces, R., Sánchez-Carrillo, C., ... Bouza, E. (2018). Biofilm production is not associated with poor clinical outcome in 485 patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(6), 659.e1-659.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.018>
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>

- Haggar, A., Ehrnfelt, C., Holgersson, J., & Flock, J.-I. (2004). The Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Inhibits Neutrophil Binding to Endothelial Cells. *Infection and Immunity*, *72*(10), 6164–6167. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6167.2004>
- Hallahan, D. L. (2000). Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiate plants. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 31, pp. 77–120). [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(00\)31007-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(00)31007-2)
- Hammel, M., Němeček, D., Keightley, J. A., Thomas, G. J., & Geisbrecht, B. V. (2007). The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap) adopts an elongated but structured conformation in solution. *Protein Science*, *16*(12), 2605–2617. <https://doi.org/10.1110/ps.073170807>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Rileya, T. V. (2012). Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(2), 909–915. <https://doi.org/10.1128/AAC.05741-11>
- Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., ... Holden, M. T. G. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biology*, *18*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1252-9>
- Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G., Lambert, P., Stickler, D., & Eley, A. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, *4*, 39–60. <https://doi.org/10.22203/ecm.v004a04>
- Harrison, F. (2007). Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, *153*(4), 917–923. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004077-0>
- Hassoun, A., Linden, P. K., & Friedman, B. (2017). Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care (London, England)*, *21*(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1801-3>
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., & Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(3), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.005>
- Heilmann, C. (2011). Advances in Experimental Medicine and Biology. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 715, pp. 105–123). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9>
- Hoffman, L. R., Déziel, E., D'Argenio, D. A., Lépine, F., Emerson, J., McNamara, S., ... Miller, S. I. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(52), 19890–19895. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606756104>
- Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *125*, 272–275. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *35*(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M., & O'Gara, J. P. (2011). Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infection and Immunity*, *79*(3), 1153–1165. <https://doi.org/10.1128/IAI.00364-10>
- Huseby, M., Shi, K., Kent Brown, C., Digre, J., Mengistu, F., Keun, S. S., ... Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *189*(23), 8719–8726. <https://doi.org/10.1128/JB.00741-07>
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, *3*(JAN), 1–24.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

- Irie, Y., & Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *322*, 67–84. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, *52*(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Jaberian, H., Piri, K., & Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry*, *136*(1), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.084>
- Jayaraman, M., Senthilkumar, A., & Venkatesalu, V. (2015). Evaluation of some aromatic plant extracts for mosquito larvicidal potential against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, *114*(4), 1511–1518. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4335-0>
- Jefferson, K. K., & Cerca, N. (2006). Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy. *Methods in Molecular Biology*, *341*, 119–126. <https://doi.org/10.1385/1-59745-113-4:119>
- Johnson, E. J., Zemanick, E. T., Accurso, F. J., Wagner, B. D., Robertson, C. E., & Harris, J. K. (2016). Molecular identification of *Staphylococcus aureus* in airway samples from children with cystic fibrosis. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147643>
- Kahl, B. C., & Becker, K. (2016). Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony. *American Society for Microbiology*, *29*(2), 401–427. <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-15.Address>
- Karampoula, F., Giaouris, E., Deschamps, J., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., & Dubois-Brissonnet, F. (2016). Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(17), 5309–5319. <https://doi.org/10.1128/AEM.01351-16>
- Katayama, Y., Baba, T., Sekine, M., Fukuda, M., & Hiramatsu, K. (2013). Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *195*(6), 1194–1203. <https://doi.org/10.1128/JB.01786-12>
- Kateete, David P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., ... Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *9*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>
- Kateete, David Patrick, Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., ... Joloba, M. L. (2019). CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0551-1>
- Kaur, D. C., & Chate, S. S. (2015). Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *Journal of Global Infectious Diseases*, *7*(2), 78–84. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.157245>
- Kavanagh, N., Ryan, E. J., Widaa, A., Sexton, G., Fennell, J., O'Rourke, S., ... Kerrigana, S. W. (2018). Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges,. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(2), 1–25.
- Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. And *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(11), 4057–4061. <https://doi.org/10.1128/AEM.07499-11>
- Kennedy, C. A., & O'Gara, J. P. (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, *53*(11), 1171–1173. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45764-0>
- Khezri, K., Farahpour, M. R., & Mounesi Rad, S. (2019). Accelerated infected wound healing by topical application

- of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 980–988. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1582539>
- Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., & Emaneini, M. (2015). Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial Pathogenesis*, 88, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.007>
- Kiedrowski, M. R., & Horswill, A. R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 104–121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06281.x>
- Klein, E., Smith, D. L., & Laxminarayan, R. (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1840–1846. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070629>
- Kloss, W. E. (1980). Natural Populations Of The Genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology*, 34, 559–592. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-8>
- Kluytmans, J., Van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 505–520. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.505>
- Ko, Y. P., Kang, M., Ganesh, V. K., Raviraja, D., Li, B., & Hook, M. (2016). Coagulase and Efb of *Staphylococcus aureus* Have a Common Fibrinogen Binding Motif. *MBio*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01885-15>. Copyright
- Kong, C., Chee, C. F., Richter, K., Thomas, N., Abd. Rahman, N., & Nathan, S. (2018). Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21141-2>
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 740–755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6(130), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A., & Peschel, A. (2017). The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.104>
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 506–508. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.506-508.2003>
- Kunwar, R. M., Mahat, L., Acharya, R. P., & Bussmann, R. W. (2013). Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine _ Full text _ Medicinal plants, traditional medicine, markets and management in far-west Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9(24), 1–10. <https://doi.org/doi:10.1186/1746-4269-9-24>
- Kwieceński, J., Jacobsson, G., Horswill, A. R., Josefsson, E., & Jin, T. (2019). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates correlates with the infection type. *Infectious Diseases*, 51(6), 446–451. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1593499>
- Kwieceński, J., Kahlmeter, G., & Jin, T. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections. *Current Microbiology*, 70(5), 698–703. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0770-x>
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J.-M., Joo, H.-S., & Kim, J.-S. (2019). Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1853. <https://doi.org/10.3390/jcm8111853>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization,

- Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–103.
- Lalthazuali, & Mathew, N. (2017). Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. *Parasitology Research*, 116(2), 821–825. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5351-4>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462. <https://doi.org/10.2523/92513-ms>
- Lampila, L. E., & McMillin, K. W. (2012). Major microbial hazards associated with packaged seafood. In *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging* (pp. 59–85). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095718.1.59>
- Landrum, M. L., Neumann, C., Cook, C., Chukwuma, U., Ellis, M. W., Hospenthal, D. R., & Murray, C. K. (2012). Epidemiology of *Staphylococcus aureus* blood and skin and soft tissue infections in the US Military Health System, 2005-2010. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 308(1), 50–59. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.7139>
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76–94. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>
- Laupland, K. B., Lyytikäinen, O., Søgaard, M., Kennedy, K. J., Knudsen, J. D., Ostergaard, C., ... Schönheyder, H. C. (2013). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: A multinational population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(5), 465–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03903.x>
- Lavery, L. A., Armstrong, D. G., Wunderlich, R. P., Mohler, M. J., Wendel, C. S., & Lipsky, B. A. (2006). Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care*, 29(6), 1288–1293. <https://doi.org/10.2337/dc05-2425>
- Le, K. Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V., & Otto, M. (2014). Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00167>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 510–543. <https://doi.org/10.1128/mmr.00013-14>
- Lee, S., Choi, K. H., & Yoon, Y. (2014). Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(2), 257–261. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.257>
- Lew, P. D., & Waldvogel, F. A. (2004). Osteomyelitis. *Lancet*, 364, 369–379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5)
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353–362. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25932-0>
- Liang, C., Liebeke, M., Schwarz, R., Zühlke, D., Fuchs, S., Menschner, L., ... Dandekar, T. (2011). *Staphylococcus aureus* physiological growth limitations: Insights from flux calculations built on proteomics and external metabolite data. *Proteomics*, 11(10), 1915–1935. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000151>
- Lin, L. T., Hsu, W. C., & Lin, C. C. (2014). Antiviral natural products and herbal medicines. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(1), 24–35. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.124335>
- Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., & Mariuzza, R. (2004). Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of Infectious Diseases*,

- 189(12), 2334–2336. <https://doi.org/10.1086/420852>
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., ... Chambers, H. F. (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases*, 52(3). <https://doi.org/10.1093/cid/ciq146>
- Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y. (2020). Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Science Progress*, 103(1), 1–14. <https://doi.org/10.1177/0036850419898659>
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Gutiérrez-Praena, D., ... Cameán, A. M. (2015). In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 9–27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.030>
- Loeb, L. (1903). The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood. *The Journal of Medical Research*, 10(3), 407–419.
- Logu, A., Pellerano, M. L., Sanna, A., Pusceddu, M. C., Uda, P., & Saggi, B. (2003). Comparison of the susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by the XTT colorimetric method and the NCCLS standards method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(3), 244–250. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00350-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00350-3)
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, 1–11.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 53–59. <https://doi.org/10.1172/JCI200318535>
- Lynch, A. S., & Robertson, G. T. (2008). Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annual Review of Medicine*, 59(1), 415–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>
- Machado, D., Gaspar, C., Palmeira-De-Oliveira, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Martinez-De-Oliveira, J., & Cerca, N. (2017). *Thymbra capitata* essential oil as potential therapeutic agent against *Gardnerella vaginalis* biofilm-related infections. *Future Microbiology*, 12(5), 407–416. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0184>
- Macià, M. D., Rojo-Moliner, E., & Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 981–990. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165>
- Mahato, N. K., Gupta, V., Singh, P., Kumari, R., Verma, H., Tripathi, C., ... Lal, R. (2017). Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(10), 1357–1371. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0928-1>
- Malinowski, E., Lassa, H., Kłossowska, A., Smulski, S., & Kaczmarowski, M. (2009). Atypical *Staphylococcus aureus* as an aetiological agent of mastitis in cows. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53(3), 383–387.
- Marini, E., Di Giulio, M., Ginestra, G., Magi, G., Di Lodovico, S., Marino, A., ... Nostro, A. (2019). Efficacy of carvacrol against resistant rapidly growing mycobacteria in the planktonic and biofilm growth mode. *PLoS ONE*, 14(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219038>
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (1998). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 618–623. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.3.618-623.1998>
- Maurin, M. (2012). Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 12(7), 731–754. <https://doi.org/10.1586/erm.12.53>
- McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in staphylococcus aureus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*,

- 5(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00001>
- McCourt, J., O'Halloran, D. P., McCarthy, H., O'Gara, J. P., & Geoghegan, J. A. (2014). Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. *FEMS Microbiology Letters*, *353*(2), 157–164. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12424>
- McDevitt, D., Vaudaux, P., & Foster, T. J. (1992). Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. *Infection and Immunity*, *60*(4), 1514–1523. <https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1514-1523.1992>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- McHenry, M. C., Easley, K. A., & Locker, G. A. (2002). Vertebral Osteomyelitis: Long-Term Outcome for 253 Patients From 7 Cleveland-Area Hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, *11*(3), 1342–1350. <https://doi.org/10.1097/00019048-200203000-00027>
- Melo, T. A., Dos Santos, T. F., De Almeida, M. E., Junior, L. A. G. F., Andrade, E. F., Rezende, R. P., ... Romano, C. C. (2016). Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by Lactobacillus isolated from fine cocoa. *BMC Microbiology*, *16*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0871-8>
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Flores-Treviño, S., González-González, G. M., ... Garza-González, E. (2013). Microbiological and Molecular Characterization of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061161>
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., & Prévost, G. (2001). Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -hemolysin family. *Toxicon*, *39*(11), 1661–1672. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00153-2)
- Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., ... Lasa, I. (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *191*(3), 832–843. <https://doi.org/10.1128/JB.01222-08>
- Miguel, M. G., Gago, C., Antunes, M. D., Megias, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J., ... Figueiredo, A. C. (2015). Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Essential Oils from *Thymbra capitata* and *Thymus* Species Grown in Portugal. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/851721>
- Mith, H., Duré, R., Dalcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, *2*(4), 403–416. <https://doi.org/10.1002/fsn3.116>
- Monaco, M., Araujo, F., Cruciani, M., Coccia, E., & Pantosti, A. (2016). Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis* (Vol. 409, p. 435). <https://doi.org/10.1007/82>
- Monecke, S., Ruppelt, A., Wendlandt, S., Schwarz, S., Slickers, P., Ehricht, R., & Jäckel, S. C. de. (2013). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from diseased poultry. *Veterinary Microbiology*, *162*(2–4), 806–812. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.018>
- Monteiro, J. M., Fernandes, P. B., Vaz, F., Pereira, A. R., Tavares, A. C., Ferreira, M. T., ... Pinho, M. G. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nature Communications*, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9055>
- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, *104*(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>
- Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R., & Bayles, K. W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio*, *5*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>

- Mottola, C., Semedo-Lemsaddek, T., Mendes, J. J., Melo-Cristino, J., Tavares, L., Cavaco-Silva, P., & Oliveira, M. (2016). Molecular typing, virulence traits and antimicrobial resistance of diabetic foot staphylococci. *Journal of Biomedical Science*, *23*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0250-7>
- Muray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (1990). *Medical Microbiology* (8th ed., Vol. 155). Elsevier. <https://doi.org/10.1093/milmed/155.7.a26>
- Naeem, A., Abbas, T., Ali, T. M., & Hasnain, A. (2018). Essential Oils: Brief Background and Uses. *Annals of Short Reports*, *1*(1), 1–6.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, *10*(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Neopane, P., Nepal, H. P., Shrestha, R., Uehara, O., & Abiko, Y. (2018). In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International Journal of General Medicine*, *11*, 25–32. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S153268>
- Nishifuji, K., Sugai, M., & Amagai, M. (2008). Staphylococcal exfoliative toxins: “Molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *Journal of Dermatological Science*, *49*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.007>
- Nuryastuti, T., Van Der Mei, H. C., Busscher, H. J., Iravati, S., Aman, A. T., & Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(21), 6850–6855. <https://doi.org/10.1128/AEM.00875-09>
- Nygaard, T. K., Pallister, K. B., DuMont, A. L., DeWald, M., Watkins, R. L., Pallister, E. Q., ... Voyich, J. M. (2012). Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036532>
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(2), 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., ... O’Gara, J. P. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology*, *190*(11), 3835–3850. <https://doi.org/10.1128/JB.00167-08>
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D. A., & O’Gara, J. P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(5), 1379–1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- Olson, M. E., King, J. M., Yahr, T. L., & Horswill, A. R. (2013). Sialic acid catabolism in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *195*(8), 1779–1788. <https://doi.org/10.1128/JB.02294-12>
- Olson, M. E., Nygaard, T. K., Ackermann, L., Watkins, R. L., Zurek, O. W., Pallister, K. B., ... Voyich, J. M. (2013). *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. *Infection and Immunity*, *81*(4), 1316–1324. <https://doi.org/10.1128/IAI.01242-12>
- Oniciuc, E. A., Cerca, N., & Nicolau, A. I. (2016). Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAR), 2014–2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00390>
- Onyango, L. A., Dunstan, R. H., Gottfries, J., Eiff, C., & Roberts, T. K. (2012). Effect of low temperature on growth and ultra-structure of staphylococcus spp. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029031>
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, *322*, 207–228.
- Otto, M. (2010). Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, *64*(1), 143–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134309>

- Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, *64*(1), 175–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>
- Otto, M. (2017). Staphylococcus epidermidis: A major player in bacterial sepsis? *Future Microbiology*, *12*(12), 1031–1033. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0143>
- Owen, L., & Laird, K. (2018). Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(4), 414–435. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1423616>
- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. In I. T. Kudva, N. A. Cornick, P. J. Plummer, Q. Zhang, T. L. Nicholson, J. P. Bannantine, & B. H. Bellaire (Eds.), *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (5th ed., pp. 529–566). Washington: ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819286>
- Palmeira-De-Oliveira, A., Gaspar, C., Palmeira-De-Oliveira, R., Silva-Dias, A., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., ... Rodrigues, A. G. (2012). The anti-Candida activity of *Thymbra capitata* essential oil: Effect upon pre-formed biofilm. *Journal of Ethnopharmacology*, *140*(2), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.029>
- Patti, J. M., House-Pompeo, K., Boles, J. O., Garza, N., Gurusiddappa, S., & Hook, M. (1995). Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.12005>
- Paulsen, J., Mehl, A., Askim, Å., Solligård, E., Åsvold, B. O., & Damås, J. K. (2015). Epidemiology and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and sepsis in a Norwegian county 1996-2011: An observational study. *BMC Infectious Diseases*, *15*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0849-4>
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, *72*(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Peleg, A. Y., Weerathna, T., McCarthy, J. S., & Davis, T. M. E. (2007). Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *23*, 13–23. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- Periasamy, S., Joo, H. S., Duong, A. C., Bach, T. H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., ... Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(4), 1281–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>
- Perry, J. D. (2017). A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, *30*(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-17>
- Peschel, A., & Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection Andreas. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(10), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Pitts, B., Hamilton, M. A., Zelter, N., & Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, *54*(2), 269–276. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00034-4)
- Podbielska, A., Galkowska, H., Stelmach, E., Mlynarczyk, G., & Olszewski, W. L. (2010). Slime production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with diabetic foot ulcers. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *58*(4), 321–324. <https://doi.org/10.1007/s00005-010-0079-9>
- Pompilio, A., Pomponio, S., Crocetta, V., Gherardi, G., Verginelli, F., Fiscarelli, E., ... Di Bonaventura, G. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiology*, *11*(159), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-159>
- Powers, M. E., & Wardenburg, J. B. (2014). Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the

- Pathogenesis of Sepsis. *PLoS Pathogens*, *10*(2), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003871>
- Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(4), 295–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>
- Qian, Q., Eichelberger, K., & Kirby, J. E. (2014). Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from bactec blood culture broth by the BinaxNOW S. Aureus test. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(1), 319–320. <https://doi.org/10.1128/JCM.02291-13>
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., & Ziebuhr, W. (2000). Alternative transcription factor σ B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *Journal of Bacteriology*, *182*(23), 6824–6826. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6824-6826.2000>
- Rasmussen, R. V., Høst, U., Arpi, M., Hassager, C., Johansen, H. K., Korup, E., ... Bruun, N. E. (2011). Prevalence of infective endocarditis in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia: The value of screening with echocardiography. *European Journal of Echocardiography*, *12*(6), 414–420. <https://doi.org/10.1093/ejechocard/jer023>
- Rayner, C., & Munckhof, W. J. (2005). Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal*, *35*(3), 3–16.
- Regassa, L. B., Novick, R. P., & Betley, M. J. (1992). Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, *60*(8), 3381–3388. <https://doi.org/10.1128/iai.60.8.3381-3388.1992>
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview. *Forschende Komplementarmedizin*, *16*(2), 79–90. <https://doi.org/10.1159/000207196>
- Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E. A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., ... Hernández, M. (2018). Characterization of biofilms formed by foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>
- Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, *272*(6), 541–561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, *14*(11), 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.01.005>
- Rosca, A. S., Castro, J., Sousa, L. G. V., & Cerca, N. (2020). *Gardnerella* and vaginal health: the truth is out there. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(1), 73–105.
- Sadykov, M. R., & Kenneth, W. B. (2012). The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(2), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.010>
- Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M., & Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02419>
- Salgueiro, L., Pinto, E., Gonçalves, M. J., Pina-Vaz, C., Cavaleiro, C., Rodrigues, A. G., ... Martinez-De-Oliveira, J. (2004). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. *Planta Medica*, *70*(6), 572–575. <https://doi.org/10.1055/s-2004-827162>
- Salgueiro, L., Vila, R., Tomas, X., Tomi, F., Cañigual, S., Casanova, J., ... Adzet, T. (1995). Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochemistry*, *38*(2), 391–396. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00657-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00657-F)
- Samarth, R. M., Samarth, M., & Matsumoto, Y. (2017). Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity. *Future Science OA*, *3*(4). <https://doi.org/10.4155/foa-2017-0061>

- Sandle, T. (2016). Microbial identification. In *Pharmaceutical Microbiology* (pp. 103–113). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100022-9.00009-8>
- Santos, A. L. dos, Santos, D. O., Freitas, C. C. de, Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *43*(6), 413–423. <https://doi.org/10.1021/ed067p473>
- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*(4), 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., & Gilbert, P. (2004). Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *Journal of Bacteriology*, *186*(21), 7312–7326. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7312>
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, *7*(8), 979–990.
- Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, *77*(4), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>
- Schilcher, K., Andreoni, F., Haunreiter, V. D., Seidl, K., Hasse, B., & Zinkernagel, A. S. (2016). Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(10), 5957–5967. <https://doi.org/10.1128/AAC.00463-16>
- Schmidt, V. M., Williams, N. J., Pinchbeck, G., Corless, C. E., Shaw, S., McEwan, N., ... Nuttall, T. (2014). Antimicrobial resistance and characterisation of staphylococci isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *BMC Veterinary Research*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-17>
- Segawa, S., Sawai, S., Murata, S., Nishimura, M., Beppu, M., Sogawa, K., ... Nomura, F. (2014). Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clinica Chimica Acta*, *435*, 59–61. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.024>
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Sher, H., Aldosari, A., Ali, A., & de Boer, H. J. (2014). Economic benefits of high value medicinal plants to Pakistani communities: An analysis of current practice and potential. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-71>
- Shi, S., & Xianlong, Z. (2012). Interaction of *Staphylococcus aureus* with osteoblasts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *3*(3), 367–370. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.423>
- Shittu, A. O., Oyedara, O., Okon, K., Raji, A., Peters, G., von Müller, L., ... Ruffing, U. (2015). An assessment on DNA microarray and sequence-based methods for the characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Nigeria. *Frontiers in Microbiology*, *6*(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01160>
- Simões, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. S. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, *26*(6), 746–757. <https://doi.org/10.1039/b821648g>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., ... Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, *315*(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, A., Prakash, P., Achra, A., Singh, G. P., & Das, A. (2017). Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Infectious Diseases*, *9*(3), 93–101. <https://doi.org/10.4103/jgid.jgid>
- Singh, R. P., & Osman, M. (1999). *Sustainable Alternate Land Use Systems for Drylands* (2nd ed.). Dehra Dun

(India): Oriental Enterprises.

- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2009). Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. *Journal of Medical Microbiology*, 58(8), 1067–1073. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009720-0>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Spence, R. P., Wright, V., Ala-Aldeen, D. A. A., Turner, D. P., Wooldridge, K. G., & James, R. (2008). Validation of virulence and epidemiology DNA microarray for identification and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1620–1627. <https://doi.org/10.1128/JCM.02453-07>
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J., & Geoghegan, J. A. (2014). Protein-based biofilm matrices in staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00171>
- Spichler, A., Hurwitz, B. L., Armstrong, D. G., & Lipsky, B. A. (2015). Microbiology of diabetic foot infections: From Louis Pasteur to “crime scene investigation.” *BMC Medicine*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0232-0>
- Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2002). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science Progress*, 85, 57–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00017-0>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Ster, C., Lebeau, V., Leclerc, J., Fugère, A., Veh, K. A., Roy, J. P., & Malouin, F. (2017). In vitro antibiotic susceptibility and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine intramammary infections that persisted or not following extended therapies with cephapirin, pirlimycin or ceftiofur. *Veterinary Research*, 48(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0463-0>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358, 135–138. <https://doi.org/10.4103/0974-8237.167866>
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., & Mizunoe, Y. (2018). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20485-z>
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C., & Walker, S. (2010). Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition Jonathan. *Chembiochem.*, 11(1), 35–45. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., ... Nunes, M. L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.011>
- Thielmann, J., Muranyi, P., & Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6), e01860. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>
- Thomer, L., Schneewind, O., & Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol*, 11, 343–364. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

- Timm, M., Saaby, L., Moesby, L., & Hansen, E. W. (2013). Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*, *65*(5), 887–894. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9530-6>
- Tommasi, L., Negro, C., Cerfeda, A., Nutricati, E., Zuccarello, V., De Bellis, L., & Miceli, A. (2007). Influence of environmental factors on essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) cav. Growing wild in southern puglia (Italy). *Journal of Essential Oil Research*, *19*(6), 572–580. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699335>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tormo, M. Á., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: Evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, *151*(7), 2465–2475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Ultee, A., Kets, E., & Smid, J. (1999). Mecanisms of action of carvacrol on the Food-Borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(10), 4606–4610. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1561-1568.2002>
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J. M., Amorena, B., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2003). SarA and not σ B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *48*(4), 1075–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x>
- Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*(February), 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012>
- Vanhommerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J. P., De Greve, H., ... Malhotra-Kumar, S. (2014). Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104561>
- Váradi, L., Luo, J. L., Hibbs, D. E., Perry, J. D., Anderson, R. J., Orenga, S., & Groundwater, P. W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, *46*(16), 4818–4832. <https://doi.org/10.1039/c6cs00693k>
- Vardakas, K. Z., Horianopoulou, M., & Falagas, M. E. (2008). Factors associated with treatment failure in patients with diabetic foot infections: An analysis of data from randomized controlled trials. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *80*(3), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.01.009>
- Ventura, C. L., Malachowa, N., Hammer, C. H., Nardone, G. A., Robinson, M. A., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2010). Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE*, *5*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011634>
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, *7*(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>
- Wade, D., Palma, M., Löfving-Arholm, I., Sällberg, M., Silberring, J., & Flock, J. I. (1998). Identification of functional domains in Efb, a fibrinogen binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *248*(3), 690–695. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9028>
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, *182*(10), 2675–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>
- Weiner-Lastinger, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., ... Dudeck, M. A. (2020). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *41*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.296>

- Wertheim, H., Melles, D. C., Margreet, C. V., Leeuwena, W. van, Belkuma, A. van, Venbrugh, H. A., & Nouwena, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *5*(1), 751–762. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00565.x>
- World Health Organization (WHO). (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2018-001820>
- Wright, G. D. (2014). Something old, something new: Revisiting natural products in Antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, *60*(3), 147–154. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063>
- Wu, Shang, Lencastre, H., & Tomasz, A. (2001). Recruitment of the *mecA* Gene Homologue of *Staphylococcus sciuri* into a Resistance Determinant and Expression of the Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *183*(8), 2417–2424. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2417>
- Wu, Shijia, Duan, N., Gu, H., Hao, L., Ye, H., Gong, W., & Wang, Z. (2016). A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/toxins8070176>
- Xu, S. X., & McCormick, J. K. (2012). Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*(April), 52. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00052>
- Yamasaki, O., Yamaguchi, T., Sugai, M., Chapuis-Cellier, C., Arnaud, F., Vandenesch, F., ... Lina, G. (2005). Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(4), 1890–1893. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1890-1893.2005>
- Yameen, M. A., Nasim, H., Akhtar, N., Iram, S., & Javed, I. (2010). Antibiotic susceptibility profile of methicillin-resistant staphylococci isolated from nasal samples of hospitalized patients. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(3), 204–209.
- Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., Hu, C. P., & Yiap, B. C. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, *20*(8–9), 710–713. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.013>
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal*, *8*(1), 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>
- Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M., & Greenberg, E. P. (2004). Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *186*(6), 1838–1850. <https://doi.org/10.1128/JB.186.6.1838-1850.2004>
- Yu, L., Hisatsune, J., Hayashi, I., Tatsukawa, N., Sato'o, Y., Mizumachi, E., ... Sugai, M. (2017). A Novel Repressor of the *ica* Locus Discovered in Clinically Isolated Super- Biofilm-Elaborating *Staphylococcus aureus*. *MBio*, *8*(1), 1–17.
- Zapotoczna, M., McCarthy, H., Rudkin, J. K., O'Gara, J. P., & O'Neill, E. (2015). An essential role for coagulase in *Staphylococcus aureus* biofilm development reveals new therapeutic possibilities for device-related infections. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(12), 1883–1893. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv319>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, *124*(July), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zhang, L. H., & Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: Diverse implications. *Molecular Microbiology*, *53*(6), 1563–1571. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04234.x>
- Zobell, C. E., & Allen, E. C. (1935). The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *Journal of Bacteriology*, *29*(3), 239–251.

7. ANEXO

Anexo 1 | Padrão de suscetibilidade aos antibióticos de isolados clínicos de SARM provenientes de septicemias (S), úlceras de pés de diabéticos (D) e osteomielites (O)^a.

Isolados	Antibióticos ^b														
	PEN	FOX	TET	STX	CIP	ERY	DA	CN	OX	FD	TOB	KAN	LZN	C	MUP
S1	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
S6	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
S7	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
S8	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
S10	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S12	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
D5	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
D6	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
D7	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D15	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D20	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
D26	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
O11	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
O19	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
O20	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S
O25	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
O26	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
O39	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

^a O perfil de suscetibilidade foi realizado pelo grupo de investigação MicroART- UTAD utilizando o método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do CLSI.

^bR: resistente, S: sensível, PEN: penicilina, FOX: cefoxitina, TET: tetraciclina, STX: Trimetoprim-sulfametoxazol, CIP: ciprofloxacina, ERY: eritromicina, DA: clindamicina, CN: gentamicina, OX: oxacilina, FD: ácido fusídico, TOB: tobramicina, KAN: kanamicina, LZN: linezolida, C: cloranfenicol, MUP: mupirocina.