



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA PERUGINI BIASI GARBIN

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EUGENOL
SOBRE O CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Streptococcus agalactiae* E SINERGISMO
COM NANOPARTÍCULA DE PRATA PRODUZIDA
POR *Fusarium oxysporum***

RENATA PERUGINI BIASI GARBIN

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EUGENOL
SOBRE O CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Streptococcus agalactiae* E SINERGISMO
COM NANOPARTÍCULA DE PRATA PRODUZIDA
POR *Fusarium oxysporum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada
Ogatta.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B579a Biasi-Garbin, Renata Perugini.

Atividade antibacteriana do eugenol sobre o crescimento e formação de biofilme de *Streptococcus agalactiae* e sinergismo com nanopartícula de prata produzida por *Fusarium oxysporum* / Renata Perugini Biasi-Garbin. – Londrina, 2015. 46 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015. Inclui bibliografia.

1. Streptococcus agalactiae – Teses. 2. Biofilme – Teses. 3. Prata – Teses. 4. Nanopartículas – Teses. 5. Agentes antibacterianos – Teses. 6. Fusarium oxysporum – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.862

RENATA PERUGINI BIASI GARBIN

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EUGENOL SOBRE O
CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Streptococcus
agalactiae* E SINERGISMO COM NANOPARTÍCULA DE PRATA
PRODUZIDA POR *Fusarium oxysporum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profª. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 06 de março de 2015.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
por toda educação e oportunidade que
me deram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força, saúde e sabedoria para concluir mais esta etapa da minha vida profissional.

À minha orientadora Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela confiança, compreensão, oportunidade, paciência, dedicação, aprendizado e por compartilhar sua valiosa experiência em Microbiologia.

À Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pelo apoio e presença constante durante a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato pela disponibilidade e parceria na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey pelo auxílio, incentivo, colaboração e por ter acompanhado, desde o início, o desenvolvimento deste estudo.

À Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini, por estimular a busca pelo mestrado, por ser exemplo e por acreditar sempre no meu potencial.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos colegas do laboratório NIP 5, por todos os momentos agradáveis de convivência, especialmente a Alexandre Tadachi Morey, César Armando Contreras Lancheros, Danielle Kian, Eliane Saori Otaguiri e Mayara Fernandes da Silva pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos colegas de turma, pelo companheirismo e amizade durante as disciplinas.

Agradeço carinhosamente aos meus pais, Blaura e Djauma e aos meus irmãos, Rodrigo e Guilherme, pelo esforço, compreensão e colaboração em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao meu amado esposo, Vitor, pelo carinho e pela torcida incondicional, me motivando sempre a alcançar os meus objetivos.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

“A ostra, para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. Sofrendo, a ostra diz para si mesma: Preciso envolver essa areia pontuda que me machuca com uma esfera lisa que lhe tire as pontas.

Ostras felizes não fazem pérolas...Pessoas felizes não sentem a necessidade de criar. O ato criador, seja na ciência ou na arte, surge sempre de uma dor. Não é preciso que seja uma dor doída...por vezes a dor aparece como aquela coceira que tem o nome de curiosidade.”

Rubem Alves

BIASI-GARBIN, Renata Perugini. **Atividade antibacteriana do eugenol sobre o crescimento e formação de biofilme de *Streptococcus agalactiae* e sinergismo com nanopartícula de prata produzida por *Fusarium oxysporum***. 2015. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Streptococcus agalactiae (estreptococo do grupo B – EGB) é um importante agente de infecções em recém-nascidos associadas à colonização vaginal materna. A doença neonatal de início precoce pode ser prevenida com a antibioticoterapia profilática intraparto (API) para as mulheres colonizadas por EGB. Penicilina e ampicilina são os fármacos de primeira escolha, sendo que, no caso de resistência ou alergia, recomenda-se o uso de clindamicina, eritromicina e vancomicina. No entanto, a resistência de EGB, *in vitro*, à clindamicina e eritromicina é crescente em diversos países. Além disso, o desenvolvimento de vacinas contra EGB ainda está em progresso, o que indica que novas alternativas terapêuticas, seguras e eficazes, devem ser desenvolvidas para prevenir a transmissão dessa bactéria. Os produtos naturais são fontes promissoras de novas substâncias para tratamento das infecções causadas por patógenos resistentes, sendo o eugenol um dos compostos mais estudados e amplamente utilizado por suas propriedades medicinais. O objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antibacteriana *in vitro* do eugenol contra *S. agalactiae* e analisar o efeito da combinação deste composto com nanopartículas de prata produzidas por *Fusarium oxysporum* (AgNPbio). Foram testadas seis amostras clínicas e uma cepa de referência (ATCC 13813) de *S. agalactiae*. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo e para a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram retirados 10 µL dos poços onde não havia crescimento bacteriano e inoculados em ágar sangue (AS). A faixa de concentração avaliada para o eugenol foi de 0,015% a 1%. A CIM e a CBM variaram de 0,125% até 0,5%. A determinação do efeito bactericida tempo-dependente do eugenol foi realizada pela análise da curva de morte, determinando a contagem de UFC em placa de AS. Nenhuma unidade formadora de colônia foi detectada após 2, 4 e 10 h de incubação na presença de concentrações de eugenol iguais às respectivas CIMs para as amostras EGB 89, EGB 121 e a cepa de referência, respectivamente. Após 10h de exposição ao eugenol, as células de EGB tratadas apresentaram coloração vermelho fluorescente, utilizando o Kit LIVE/DEAD *baclight* (Molecular Probes) indicando bactérias mortas em contraste com as células não tratadas verde - fluorescentes. A combinação do eugenol com AgNPbio mostrou efeito sinérgico para todas as amostras de EGB estudadas, provocando redução de 4 a 8 nos valores de CIM do eugenol e de 4 a 256 vezes para AgNPbio. As alterações morfológicas e ultraestruturais provocadas pelo eugenol foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e mostraram células tratadas fragmentadas, apresentando extravasamento do conteúdo celular, além de alterações na morfologia bacteriana, rompimento da parede celular e diminuição da eletrodensidade celular. Eugenol apresentou efeito inibitório na viabilidade de células sésseis, como mostrado pelo ensaio de redução do XTT, tanto durante a formação dos biofilmes, com SMIC₁₀₀ variando de 0,06% a 0,5%, como sobre biofilmes maduros, com SMIC₅₀ variando de 0,02% a 0,25%. Os resultados obtidos neste estudo comprovam a efetividade do eugenol contra células planctônicas e sésseis de EGB, reforçando o potencial deste composto como um antibacteriano adicional no tratamento da colonização vaginal materna.

Palavras-chaves: *Streptococcus agalactiae*. Biofilme. Eugenol. Nanopartícula de prata. *Fusarium oxysporum*.

BIASI-GARBIN, Renata Perugini. **Antibacterial activity of eugenol on growth and biofilm formation of *Streptococcus agalactiae*, and synergistic interaction with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum***. 2015. 46p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae (group B streptococcus - GBS) is an important agent of infections in newborns associated with maternal vaginal colonization. Neonatal early onset disease can be prevented with intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) in women colonized with GBS. Penicillin and ampicillin are the first choice-drug, and erythromycin, clindamycin and vancomycin are the agents recommended in cases of pregnant colonization with beta-lactams resistant GBS or beta-lactams-allergy. However, resistances to erythromycin and clindamycin among GBS isolates have emerged in different regions of the world. Furthermore, the development of vaccines against GBS is still in progress, indicating that new safe and effective therapeutic alternatives should be developed to prevent the transmission of this bacterium. Natural products are potential sources of new substances for the treatment of infections caused by resistant pathogens and eugenol is one of the most studied compounds and widely used for its medicinal properties. The aim of this study was to investigate the *in vitro* antibacterial activity of eugenol against *S. agalactiae* and analyze the effect of the combination of this compound with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* (AgNPbio). Six clinical strains of *S. agalactiae* and the reference strain *S. agalactiae* (ATCC 13813) were tested. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of eugenol was determined by broth microdilution method and for the minimum bactericidal concentration (MBC), the content from the wells (10 μ L) showing no growth were transferred to Tryptic Soy Agar (TSA) containing 5% sheep blood plates. The concentration range evaluated to eugenol was 0.015 % to 1 %. The MIC and MBC ranging from 0.125 % to 0.5 %. The determination of time-dependent bactericidal effect of eugenol was performed by time-kill curves determining the CFU counts in TSA plus 5% sheep blood plates. No colony forming unit were detected after 2, 4 and 10 h of incubation in the presence of eugenol concentrations equal to the respective MIC for samples GBS 89, GBS 121 and the reference strain, respectively. After 10 h exposure, the GBS cells treated with eugenol presented red fluorescent staining, by using LIVE/DEAD® BacLight™ staining kit, indicating dead bacteria in contrast to green fluorescent untreated cells. The combination of eugenol with AgNPbio reduced significantly the MIC values of both compounds for all studied GBS strains, causing decrease of MIC values by 4 to 8 for eugenol and 4 to 256 fold for AgNPbio. The morphological and ultrastructural changes caused by eugenol were analyzed by scanning and transmission electron microscopy and showed fragmented treated cells, with leakage of cytoplasmic contents, in addition to changes in bacterium morphology, disruption of the cell wall and decreased in electron cell density. Eugenol showed inhibitory effect on viability of sessile cells, as analyzed by XTT reduction assay, in both during the formation of biofilms with SMIC₁₀₀ ranging from 0.06 % to 0.5%, and on mature biofilms with SMIC₅₀ ranging from 0.02% to 0.25%. The results of this study prove the effectiveness of eugenol against GBS planktonic and sessile cells, reinforcing the potential of this compound as an additional antibacterial treatment of maternal vaginal colonization.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*. Biofilm. Eugenol. Silver nanoparticle. *Fusarium oxysporum*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3	REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1	<i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	11
3.1.1	Epidemiologia e Patogênese das Infecções por EGB	11
3.1.2	Prevenção e Tratamento da Infecção Neonatal por <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
3.1.2.1	Profilaxia Antimicrobiana	14
3.1.2.2	Antissépticos Vaginais.....	16
3.1.3	Resistência Antimicrobiana	17
3.1.4	Consequências não intencionais da Antibioticoterapia Profilática Intraparto.....	18
3.2	ANTIMICROBIANOS NATURAIS DERIVADOS DE PLANTAS	18
3.2.1	Produtos Naturais com Ação em <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
3.2.2	Óleos Essenciais	20
3.2.3	Eugenol	22
3.2.3.1	Atividades Biológicas do Eugenol	23
3.2.3.1.1	<i>Atividade Antimicrobiana</i>	24
3.2.4	Combinação entre Substâncias Antimicrobianas	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	ARTIGO.....	27
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae (EGB – Estreptococo do grupo B de Lancefield) é uma bactéria Gram positiva que pode causar doenças severas em indivíduos de todas as idades, variando de infecções da corrente sanguínea (sepse) e pneumonia a meningite e infecções de pele. Atualmente, EGB continua sendo uma importante causa de infecção em gestantes e recém-nascidos no mundo inteiro, provocando significativa morbidade e mortalidade entre essa população (PHARES et al., 2008; VERANI et al., 2010). Adicionalmente, EGB tem emergido como patógeno importante de infecções entre os adultos, principalmente idosos e imunocomprometidos em diversos países (SKOFF et al., 2009; LAMAGNI et al., 2013). Esses dados são preocupantes quando observado que a mortalidade associada a esses pacientes é frequentemente maior do que em recém-nascidos (PHARES et al., 2008).

Embora a implantação de diretrizes para detecção e antibioticoprofilaxia intraparto (API) em gestantes portadoras de EGB tenha conduzido a uma redução significativa na incidência de infecção neonatal precoce (SHRAG et al., 2000; VERANI et al., 2010), alguns trabalhos têm mostrado que a API não previne o desenvolvimento de doença tardia entre os recém-nascidos (PHARES et al., 2008). Além disso, apesar de ser uma prática comum em diversas instituições, em alguns países ainda não há consenso em relação à estratégia de prevenção de infecção neonatal por EGB.

A disseminação do uso da API também tem levantado preocupações sobre a emergência de resistência de EGB aos antimicrobianos e aumento de infecções perinatais por outros patógenos (PHARES et al., 2008). A resistência à penicilina representa uma ameaça ao sucesso das estratégias de prevenção da doença de início precoce e leva a falhas na terapia, já que esse medicamento é a primeira escolha para o tratamento de infecções por EGB. Além disso, o aumento da resistência aos antimicrobianos de segunda linha, clindamicina e eritromicina, limita a prevenção e tratamento para pacientes que apresentam alergia à penicilina.

Em geral, EGB isolados de gestantes têm se mostrado sensíveis aos beta-lactâmicos (PALMEIRO et al., 2010, GARLAND et al., 2011; TURNER et al., 2012). Entretanto, relatos de isolados de gestantes (LINHARES et al., 2011) e não gestantes (KIMURA et al., 2008; NAGANO et al., 2012) resistentes a penicilina foram descritos nos últimos anos. Por outro lado, a resistência a macrolídeos e clindamicina entre isolados de EGB de gestantes têm emergido em diferentes regiões do mundo (GARLAND et al., 2011; LINHARES et al., 2011; LAMBIASE et al., 2012; TURNER et al., 2012).

Esses resultados reforçam a necessidade de determinação do perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos para o sucesso da API na prevenção de infecção neonatal por EGB. Além disso, novas alternativas terapêuticas, eficazes e seguras, devem ser desenvolvidas para prevenção da transmissão dessa enfermidade. Visto que os estudos para o desenvolvimento de vacinas contra EGB ainda estão em progresso, a quimioterapia, juntamente com a prevenção da transmissão, permanece como importante medida no controle da infecção por EGB.

Considerando a grande necessidade de desenvolvimento de novas substâncias com atividade antimicrobiana e a diversidade molecular dos produtos naturais, estes compostos continuam sendo alvo de interesse para pesquisadores e a indústria farmacêutica. Neste contexto, estudos sobre o efeito antimicrobiano de produtos naturais extraídos de plantas são de extrema importância, uma vez que são fontes promissoras para o isolamento de novas substâncias que apresentam diferentes mecanismos de ação e que podem ser utilizadas como antimicrobianos alternativos, diminuindo, assim, o risco de desenvolvimento de resistência aos antibióticos disponíveis comercialmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana *in vitro* do eugenol contra *Streptococcus agalactiae* e analisar o efeito da combinação deste composto com nanopartículas de prata produzidas por *Fusarium oxysporum* (AgNPbio).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do eugenol sobre células planctônicas de EGB.
- Avaliar o efeito do eugenol sobre a cinética de crescimento de EGB.
- Avaliar o efeito da combinação entre o eugenol e as nanopartículas de prata produzidas por *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) sobre o crescimento de EGB.
- Identificar as alterações morfológicas e ultraestruturais provocadas pelo eugenol sobre as células planctônicas de EGB.
- Investigar a atividade do eugenol sobre a formação de biofilme e sobre biofilmes maduros de EGB.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Streptococcus agalactiae são cocos Gram-positivos, beta-hemolíticos, que se apresentam agrupados em cadeias ou dispostos aos pares. Estes micro-organismos foram originalmente classificados por Rebecca Lancefield, que definiu dois antígenos de carboidratos específicos da parede celular em *S. agalactiae*: o antígeno específico do grupo B, um polissacarídeo composto por ramnose, N-acetil-glicosamina e galactose, comum para todas as cepas e que define esta espécie como um estreptococo do grupo B (EGB) e o antígeno capsular, um polissacarídeo rico em ácido siálico, que atualmente possibilita a classificação dos EGBs em dez sorotipos diferentes [Ia, Ib, II a IX] e representa um dos principais fatores de virulência dessa espécie (LANCEFIELD, 1934; DORAN; NIZET, 2004; SLOTVED et al., 2007). Podem ser encontrados na microbiota humana, colonizando o trato gastrointestinal e geniturinário de adultos saudáveis, porém são considerados patógenos oportunistas, podendo causar infecções graves em gestantes, recém-nascidos e em adultos não-gestantes, principalmente idosos e indivíduos imunocomprometidos (SCHUCHAT, 1998; SCHRAG et al., 2000; SKOFF et al., 2009; LE DOARE; HEATH, 2013).

3.1.1 Epidemiologia e Patogênese das Infecções por EGB

Streptococcus agalactiae foi primeiramente descrito como agente etiológico de mastite bovina (NOCARD; MOLLEREAU, 1887) e apenas na década de 1930 foi identificado em *swabs* vaginais e associado a casos de doenças fatais em mulheres no período pós-parto (LANCEFIELD; HARE, 1935; FRY, 1938). Já na década de 1970, este micro-organismo surgiu como importante causa de infecções invasivas em humanos e se tornou o principal agente de sepse, pneumonia e meningite no período neonatal (BAKER; GORDON; YOW, 1973). Atualmente, EGB ainda é considerado a maior causa infecciosa de morbidade e mortalidade neonatal nos Estados Unidos (PHARES et al., 2008; VERANI et al., 2010).

A infecção sistêmica em recém-nascidos apresenta duas formas distintas de manifestação clínica: a doença neonatal de início precoce (*early-onset disease* - EOD) e a de início tardio (*late-onset disease* - LOD). A doença neonatal de início precoce é definida como a infecção que se manifesta nos primeiros seis dias de vida, representando cerca de 60-70% de todas as doenças causadas por EGB, e se apresenta tipicamente como sepse ou

pneumonia (VERANI et al., 2010; LE DOARE; HEATH, 2013). Por outro lado, a doença neonatal de início tardio, que ocorre a partir da primeira semana até o terceiro mês de vida, está geralmente associada com prematuridade extrema (LIN et al., 2003) e em mais de 50% dos casos se manifesta como meningite (HEATH et al., 2004; WEISNER et al., 2004).

O processo de infecção neonatal é complexo e multifatorial. Fatores do hospedeiro são fundamentais para o estabelecimento do estado patogênico de EGB, porém os atributos de virulência bacterianos também auxiliam na progressão da doença (MELIN, 2011).

A primeira fase da patogênese da doença invasiva neonatal é o estabelecimento da colonização vaginal em mulheres grávidas, incluindo a aderência às células do epitélio do trato geniturinário e resistência às defesas imunológicas da mucosa vaginal (DORAN; NIZET, 2004). O trato gastrointestinal é o reservatório natural de EGB e a fonte para a colonização vaginal na mulher (SCHUCHAT, 1999). Estima-se que mais de 30% dos adultos sejam comumente colonizados com EGB, mas permanecem assintomáticos. A colonização vaginal pode ser transiente, intermitente ou persistente e ocorre mais comumente na adolescência (CDC, 1996). Estudos epidemiológicos mostraram que a taxa de colonização de gestantes por EGB varia de acordo com a região geográfica avaliada sendo, no entanto, similar em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que 10-37% das gestantes são colonizadas com EGB e aproximadamente 30-70% dos recém-nascidos dessas mulheres tornam-se colonizados, sendo que 1 - 3% deles desenvolvem doença invasiva (VERANI et al., 2010; MELIN, 2011). Além disso, mulheres colonizadas com EGB durante a gestação apresentam risco aumentado de ter bebês natimortos ou parto prematuro (SCHRAG et al., 2000).

Embora a colonização vaginal materna com EGB durante o trabalho de parto seja pré-requisito para desencadear a doença invasiva em recém-nascidos, outros fatores maternos e obstétricos podem também estar relacionados como, bacteriúria por EGB durante a gestação, o que indica alta taxa de colonização vaginal; corioamnionite; ruptura das membranas por mais de 18 h antes do trabalho de parto, levando a prolongada exposição do feto ao EGB e parto prematuro, devido à incompleta transferência de anticorpos maternos ao feto. Outros fatores de risco ainda incluem as mulheres de raça negra, o uso de dispositivos intrauterinos, obesidade e ausência de lactobacilos na microbiota gastrointestinal (SCHUCHAT, 1999).

O mecanismo de infecção neonatal de início precoce ocorre primeiramente pela ascensão de EGB até a cavidade amniótica durante o trabalho de parto ou após a ruptura prematura das membranas, sendo que a transmissão vertical pode também ocorrer durante a

passagem do feto pelo canal de parto ou por aspiração do líquido amniótico infectado (DORAN; NIZET, 2004; VERANI et al., 2010). Após o nascimento, EGB consegue se multiplicar no interior dos alvéolos do neonato, aderir ao epitélio respiratório e evadir da ação dos macrófagos pulmonares. Este mecanismo provoca prejuízos à integridade do epitélio pulmonar resultando em pneumonia, que é característica da doença de início precoce e parece estar relacionada com as propriedades citotóxicas da β -hemolisina/citolisina (β -HC) de EGB (DORAN; NIZET, 2004). A invasão do epitélio pulmonar e das células endoteliais auxiliam EGB a alcançar e se disseminar na corrente sanguínea, causando sepse, meningite e osteomielite (MELIN, 2011).

Um dos principais fatores de virulência de EGB é a expressão da cápsula polissacarídica, que auxilia na evasão bacteriana do sistema imune do hospedeiro por interferir no processo de ingestão pelos fagócitos. Para que a fagocitose ocorra de maneira eficiente, as células bacterianas precisam sofrer opsonização por anticorpos específicos ou por componentes do sistema complemento que estão presentes no soro dos neonatos, porém em quantidades insuficientes. Além disso, outros fatores produzidos por EGB e que interferem com as defesas do hospedeiro foram também identificados, como a produção da C5a peptidase, que inativa a C5 humana, produzida durante a ativação do complemento (DORAN; NIZET, 2004).

Outro importante fator de virulência de EGB, que pode ser considerado um pré-requisito para a invasividade e para o desenvolvimento da doença por EGB, é a habilidade de aderir ao endotélio e epitélio vascular, particularmente no tecido vaginal, membranas coriônicas e epitélio pulmonar dos neonatos. *Pilus* ou fimbrias são estruturas presentes na superfície da célula de EGB que parecem ter uma função fundamental em promover a aderência às células epiteliais do hospedeiro e a migração transepitelial (TELFORD et al., 2006), além de estarem envolvidos com a formação de biofilmes, favorecendo a colonização persistente (RINAUDO et al., 2010). Além disso, componentes da parede celular podem ainda desencadear a resposta inflamatória no hospedeiro e induzir a síndrome séptica (DORAN; NIZET, 2004).

Em contraste, a patogênese da infecção de início tardio é pouco conhecida e sabe-se que esta doença nem sempre está associada com a transmissão vertical. A transmissão horizontal durante o período neonatal pode ocorrer da mãe para o recém-nascido ou a partir de outras fontes hospitalares ou comunitárias (AL-MAANI et al., 2014). Já foi relatado também que a amamentação pode ser fonte deste tipo de infecção tardia (FILLERON et al., 2014).

Doenças causadas por EGB não são restritas somente aos neonatos, sendo comuns também entre as gestantes, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Em mulheres grávidas ou no período pós-parto, a colonização do trato genital por EGB é geralmente assintomática, porém manifestações clínicas podem incluir infecções do trato urinário, corioamnionites, endometrites, infecções de feridas associadas com cesárea ou episiotomia, sepse puerperal e, ocasionalmente, meningite, tromboflebite séptica e outras complicações (SCHRAG et al., 2000).

As manifestações clínicas mais comuns em idosos e indivíduos imunocomprometidos incluem infecções de pele e tecidos moles, bacteremia sem foco, pneumonia e osteomielite, além de meningite e endocardite, que são raras, mas frequentemente associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade (PHARES et al., 2008; SKOFF et al., 2009). Em contraste com neonatos e gestantes, a incidência de doenças causadas por EGB entre os adultos não gestantes aumentou significativamente em diversos países. Um estudo realizado nos Estados Unidos, no período de 1990 a 2007, mostrou que entre os adultos com idade entre 15 e 64 anos, a incidência da doença por EGB aumentou em 48% e entre aqueles com idade maior que 65 anos, houve aumento de 20%, sendo que, na maioria dos casos (88%) os pacientes apresentavam mais de uma condição médica subjacente, como, por exemplo, diabetes (SKOFF et al., 2009). Lamagni e colaboradores (2013) analisaram a emergência das infecções por EGB no Reino Unido, no período de 1991 a 2010, e mostraram que a taxa anual de casos dobrou de 1,48 para 2,99 por 100.000 habitantes, sendo que aumentos significativos foram observados em todas as faixas etárias, porém mais pronunciados em adultos. Esses dados são preocupantes quando observado que a mortalidade associada a esses pacientes é frequentemente maior do que em recém nascidos (PHARES et al., 2008).

3.1.2 Prevenção e Tratamento da Infecção Neonatal por *Streptococcus agalactiae*

3.1.2.1 Profilaxia Antimicrobiana

A emergência de infecções neonatais graves por EGB na década de 1970 incentivou a realização de diversos estudos focados principalmente na busca por medidas de prevenção, visto que a doença já se manifestava no momento do nascimento, limitando as oportunidades de intervenção (MELIN, 2011). No final de 1980, ensaios clínicos mostraram que a doença precoce por EGB poderia ser evitada pela administração de profilaxia antibacteriana durante

o trabalho de parto em mulheres colonizadas, sendo o tratamento intravenoso com antimicrobianos beta-lactâmicos a melhor e mais efetiva prática de prevenção para reduzir ou eliminar a transmissão de EGB aos neonatos (BOYER; GOTOFF, 1986; SCHUCHAT, 1999; PHARES et al., 2008). Porém, apenas em 1996, o *Center for Disease Control and Infection* (CDC), em colaboração com associações profissionais americanas relevantes, publicou diretrizes para a prevenção da doença precoce por EGB (CDC, 1996), que foram atualizadas em 2002 (SCHRAG et al., 2002) e posteriormente em 2010, quando foram estabelecidas novas orientações referentes ao uso racional dos antibióticos, triagem de urina e ampliação das metodologias laboratoriais para detecção de EGB, incluindo a identificação a partir de meios cromogênicos e diretamente de meios enriquecidos, utilizando testes de amplificação de ácido nucléico, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (VERANI et al., 2010).

Entre as recomendações, foi proposta a cultura para triagem de *Streptococcus agalactiae* entre a 35^a e 37^a semana de gestação para todas as gestantes, com o objetivo de estabelecer a prática de administração de antibioticoterapia profilática intraparto (API) durante o trabalho de parto para aquelas colonizadas por estreptococos β -hemolíticos (CDC, 1996; SCHRAG et al., 2000; VERANI et al., 2010; VERANI; SCHRAG, 2010). Com a implementação dessas medidas, houve redução de 27% na incidência de doença invasiva em recém-nascidos, passando de 0,47 para 0,34 casos por 1000 nascidos vivos (VERANI et al., 2010; VERANI; SCHRAG, 2010).

Baseado nos fatores de risco que aumentam a probabilidade de infecção por EGB, além do resultado positivo da cultura do *swab*, outros fatores também são considerados para inclusão materna na API, principalmente bacteriúria por EGB em qualquer período da gestação, histórico de filho com doença invasiva por EGB, parto prematuro (< 37 semanas de gestação), ruptura das membranas por tempo superior a 18 h e febre intraparto (> 38 °C) (VERANI et al., 2010).

Em relação aos agentes antimicrobianos utilizados na API, a penicilina é considerada o fármaco de primeira escolha para a profilaxia e tratamento das infecções causadas por EGB, pois seu espectro antimicrobiano, mais estreito do que o da ampicilina, reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência em outros micro-organismos, além de que a maioria das cepas de EGB permanece sensível a este medicamento (SCHUCHAT, 1999).

Em contrapartida, os protocolos internacionais sugerem que para mulheres alérgicas à penicilina deve ser considerado o uso de cefazolina, clindamicina, eritromicina ou vancomicina, embora a eficácia desses antimicrobianos não tenha sido comprovada por

ensaios controlados. O uso da cefazolina tem sido indicado como segunda linha para mulheres alérgicas à penicilina com baixo risco de anafilaxia, dada a similaridade da farmacocinética e farmacodinâmica deste fármaco com a penicilina, embora seja estimado que aproximadamente 10% dessas mulheres também apresentem reações de hipersensibilidade imediata a cefalosporinas. Já para as mulheres alérgicas que apresentam alto risco de anafilaxia (histórico de anafilaxia, angioedema, dificuldade respiratória ou urticária após administração de penicilina), as diretrizes sugerem o uso de clindamicina/eritromicina ou vancomicina. A escolha de um ou mais antibióticos é feita de acordo com os resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Clindamicina deve ser indicada caso o isolado de EGB seja sensível a este antimicrobiano e à eritromicina ou ainda, se é resistente à eritromicina, mas sensível à clindamicina, desde que o teste de indução de resistência à clindamicina seja negativo. Caso contrário, se a sensibilidade para ambos os agentes é desconhecida, essas mulheres devem receber vancomicina. No entanto, a habilidade de clindamicina, eritromicina e vancomicina atingirem concentrações satisfatórias na corrente sanguínea fetal ainda é limitada (VERANI et al., 2010).

3.1.2.2 Antissépticos Vaginais

Uma abordagem menos invasiva para reduzir a colonização materna e a transmissão vertical de EGB é a utilização de antissépticos vaginais no início do trabalho de parto (SCHUCHAT, 1999; VERANI et al., 2010). Estudos têm mostrado a possibilidade de utilização de uma solução antisséptica de clorexidina, que tem ampla eficácia contra bactérias Gram negativas aeróbicas e anaeróbicas e também micro-organismos Gram-positivos. Soluções de clorexidina na forma de acetato, diacetato, digluconato e gluconato têm sido avaliadas em concentrações que variam de 0,25% a 0,5%, as quais não apresentam efeitos secundários (CUTLAND et al., 2009).

Embora alguns trabalhos tenham mostrado redução da colonização bacteriana e diminuição de mortes por sepse em recém-nascidos após assepsia vaginal com clorexidina (BAKR; KARKOUR, 2005; TIELSCH et al., 2007), estudos randomizados publicados recentemente não mostraram nenhum benefício materno ou neonatal (CUTLAND et al., 2009; SALEEM et al., 2010). Ainda que a assepsia vaginal seja provavelmente menos eficaz do que a profilaxia com antibióticos sistêmicos, a vantagem no uso de microbicidas tópicos é que estes produtos não promovem a seleção de patógenos resistentes (SCHUCHAT, 1999).

3.1.3 Resistência Antimicrobiana

A disseminação do uso da API para a prevenção de doenças neonatais por EGB tem sido preocupante diante da possibilidade do desenvolvimento de resistência entre os isolados bacterianos ou aumento das infecções perinatais por outros patógenos, como *Escherichia coli* (PHARES et al., 2008). Embora na maioria dos países os isolados de EGB continuem sensíveis à penicilina, desde 1994, estudos identificaram isolados com sensibilidade reduzida a este antimicrobiano, sendo que o acúmulo de mutações nas proteínas de ligação à penicilina PBP1, PBP2b e PBP2x, que participam da biossíntese da parede celular, são as mais descritas (BETRIU et al., 1994; KIMURA et al., 2008; NAGANO et al., 2008, NAGANO et al., 2009, LONGTIN et al., 2011; NAGANO et al., 2012). Nestes casos, como descrito anteriormente, os macrolídeos, em especial a eritromicina, e a clindamicina são recomendados como agentes de segunda escolha, sendo, no entanto, a primeira alternativa para a profilaxia intraparto em gestantes alérgicas à penicilina e com alto risco de anafilaxia (VERANI; SCHRAG, 2010). Porém, resistência a esses antimicrobianos entre isolados de EGB tem sido descrita em diversos países. De acordo com relatórios publicados nos Estados Unidos, no período de 2006 a 2009, a resistência de EGB, *in vitro*, à clindamicina e eritromicina tem sido crescente, variando de 25% a 32% para a eritromicina e de 13% a 20% para clindamicina (BORCHARDT et al., 2006; CASTOR et al., 2008; PHARES et al., 2008). Além disso, estudos em outros países, como Suíça, Itália e Brasil, também mostraram taxas significativas de resistência a estes antimicrobianos, variando de 14,5% a 70% para eritromicina e de 8,2% a 70% para clindamicina (LAMBIASE et al., 2012; OTAGUIRI et al., 2013; FRÖHLICHER et al., 2014).

Os mecanismos de resistência aos macrolídeos mais comuns em espécies do gênero *Streptococcus* incluem a metilação pós-transcricional dos resíduos de adenina presentes no RNA ribossomal 23S, mediada por uma metilase codificada pelos genes *erm* (*ermB*, *ermA* (subclasse *ermTR*) ou *ermC*) e o efluxo do antimicrobiano, mediado por uma proteína ligada à membrana codificada pelos genes *mef* (variantes *mefA* ou *mefE*). A expressão dos genes *erm* resulta em fenótipo MLS_B, responsável por gerar resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, podendo ser constitutiva (cMLS_B), bem como indutiva (iMLS_B) (LECLERCQ, 2002). Por outro lado, o fenótipo M, codificado pelos genes *mef*, conferem resistência apenas aos membros 14- e 15- dos macrolídeos (eritromicina e azitromicina), enquanto que as lincosamidas, estreptograminas e membros 16- dos macrolídeos permanecem ativos (CLANCY et al., 1996; KLAASSEN; MOUTON, 2005).

Os problemas relacionados com a resistência aos antibióticos podem, futuramente, se tornar um obstáculo para o tratamento das mulheres alérgicas. Se for considerado estável o número de mulheres alérgicas com risco de anafilaxia e o aumento do número de mulheres colonizadas, pode-se prever que mais mulheres serão tratadas com antibióticos alternativos, potencialmente ineficazes, o que pode levar ao aumento do espectro de resistência entre os isolados de EGB (LAMBIASE et al., 2012).

3.1.4 Consequências não intencionais da Antibioticoterapia Profilática Intraparto

Pode-se observar que ainda há controvérsias sobre os benefícios trazidos pela API, principalmente devido aos efeitos adversos do tratamento, como o risco de anafilaxia materna, ao aumento da incidência de infecções invasivas por Gram negativos e ainda ao aumento das taxas de resistência entre os isolados de EGB. Soma-se a isso o fato de que a API não foi efetiva para a redução da incidência da doença tardia entre os recém-nascidos (PHARES et al., 2008). Visto que o desenvolvimento de vacinas contra EGB ainda está em progresso, novas alternativas terapêuticas seguras e eficazes devem ser desenvolvidas para prevenir a transmissão dessa bactéria durante o parto ou mesmo para o tratamento das infecções causadas por EGB.

3.2 ANTIMICROBIANOS NATURAIS DERIVADOS DE PLANTAS

Os produtos naturais, extensivamente empregados na medicina popular, por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias, se apresentam como fontes promissoras de novas substâncias. Eles têm contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica, sendo fonte para o isolamento de substâncias bioativas, cuja síntese orgânica das estruturas químicas seria economicamente inviável (HOLETZ et al., 2002; ROJAS et al., 2006). De acordo com Newman e colaboradores (2012) aproximadamente metade dos medicamentos antimicrobianos aprovados entre 1981 e 2010 é derivado de compostos naturais, mostrando a influência marcante destes produtos na descoberta de novos fármacos antimicrobianos.

A atividade antimicrobiana de vários compostos derivados de plantas já foi largamente estudada e muitos componentes ativos foram identificados. A maioria destes componentes são metabólitos secundários produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa contra predadores, insetos, herbívoros e microrganismos. Esses fitoquímicos são

classificados de acordo com a sua estrutura química, sendo as principais classes com ação antimicrobiana: os compostos fenólicos, que incluem os flavonoides, as quinonas, os taninos e as cumarinas; os alcaloides, os terpenoides, lecitinas e polipeptídeos (UPADHYAY et al., 2014).

A principal vantagem do uso de agentes antimicrobianos derivados de plantas para fins terapêuticos é que não apresentam efeitos colaterais em comparação com aqueles associados aos medicamentos sintéticos. Além disso, até o presente momento, não foi documentado nenhum relato de resistência antimicrobiana para esses fitoquímicos, provavelmente devido aos múltiplos mecanismos de ação que impedem a seleção de cepas bacterianas resistentes. O efeito antimicrobiano acentuado, a natureza não-tóxica e a acessibilidade destes compostos têm sido características importantes que possibilitam sua ampla utilização como promotores de crescimento em indústria de gado e aves, como agentes antimicrobianos e desinfetantes eficazes na indústria de alimentos, como componentes de terapias com ervas em medicina veterinária e fonte para o desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica (UPADHYAY et al., 2014).

3.2.1 Produtos Naturais com Ação em *Streptococcus agalactiae*

Embora ainda sejam escassos na literatura, alguns estudos com compostos naturais têm mostrado o potencial antibacteriano contra EGB de substâncias extraídas de diferentes fontes como plantas, fungos, animais e metabólitos bacterianos.

Entre os produtos derivados de plantas, foi observada a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, o qual apresentou uma zona de inibição de 12 mm pelo teste de disco difusão e concentração inibitória mínima (CIM) de 1 mg/mL contra EGB (AMIN et al., 2012). Da mesma maneira, o efeito bactericida do óleo essencial e do extrato de *Bupleurum marginatum* foi observado em uma cepa de referência *S. agalactiae* ATCC 27956. Entre as cepas bacterianas testadas, *S. agalactiae* ATCC 27956 apresentou maior sensibilidade tanto ao extrato quanto ao óleo essencial, apresentando as maiores zonas de inibição (14 mm e 16 mm) e os menores valores de CIM (0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL) (ASHOUR et al., 2009). Os autores sugerem que as atividades antibacterianas de *P. niruri* e de *B. marginatum* ocorrem devido a presença de diversos compostos fenólicos nestes produtos. O potencial antimicrobiano de óleos essenciais extraídos de espécies de *Eucalyptus* spp. também foi mostrado frente a EGB, sendo o óleo essencial de *E. odorata* o mais ativo (ELAISSI et al., 2012).

Alves e colaboradores (2012) investigaram o efeito de extratos metanólicos de 13 espécies de cogumelos sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram positivas, entre elas, EGB isolado de swab vaginal, utilizando o teste de microdiluição em caldo. Neste estudo, as CIMs dos extratos frente à EGB variaram de 5 mg/mL a 20 mg/mL, sendo mais ativos os extratos de *Fistulina hepática*, *Leucopaxillus*, *Russula delica* e *Tricholoma portentosum*.

Em relação aos produtos naturais extraídos de animais, dados recentes mostraram que os peptídeos temporin-Ra e temporin-Rb extraídos das secreções de pele de anfíbios da espécie *Rana ridibunda* exibiram atividade antimicrobiana contra amostras clínicas resistentes de EGB (ASOODEH; ZARDINI; CHAMANI, 2012).

Metabólitos secundários produzidos por *Lactobacillus rhamnosus* L60 e *Lactobacillus fermentum* L23, bactérias que podem ser encontradas na microbiota vaginal humana, também apresentaram importante efeito inibitório contra o crescimento de EGB, sugerindo que a presença desses micro-organismos no trato geniturinário de mulheres confere proteção e pode prevenir a colonização e a infecção por EGB (RUIZ et al., 2012).

3.2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são produzidos como metabólitos secundários pelas plantas aromáticas e são compostos por um concentrado de produtos naturais com forte odor. Apresentam-se como líquidos voláteis, límpidos, raramente coloridos e solúveis em lipídeos e solventes orgânicos. Podem estar presentes em todos os órgãos das plantas, incluindo botões, flores, folhas, sementes, galhos, caules, frutos, raízes e casca, sendo geralmente armazenados em células secretoras, cavidades, canais, tricomas glandulares ou células epidérmicas. Estes óleos são compostos, principalmente, por misturas variáveis de terpenoides, especialmente monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20), além de outras moléculas tais como ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos alifáticos, estéres acíclicos ou lactonas e mais raramente, compostos contendo enxofre e nitrogênio, cumarinas e homólogos de fenilpropanoides (BAKKALI et al., 2008).

As complexas e variáveis composições dos OEs fazem deles produtos muito explorados em relação às suas propriedades biológicas, entre elas a atividade antimicrobiana. Em muitos casos, a atividade resulta de uma complexa interação entre as diferentes classes de compostos encontrados nos OEs. Já em alguns casos, as atividades biológicas desses OEs estão intimamente relacionadas com a atividade dos seus principais componentes (BASSOLE

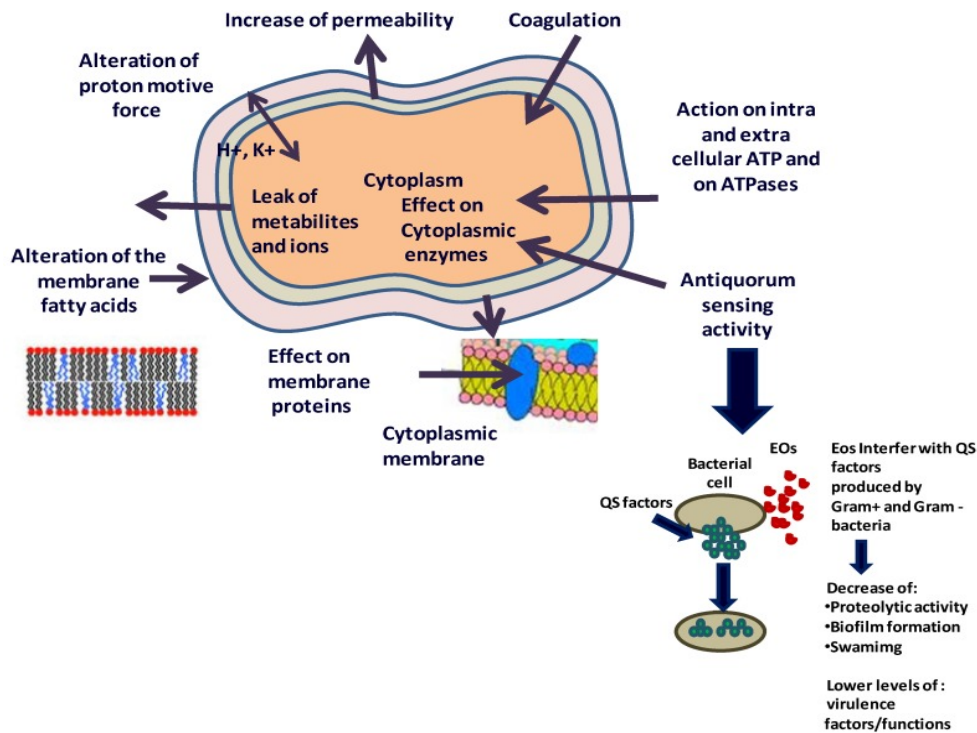
et al., 2012). Diversos estudos demonstraram que vários destes compostos exibiram significativas propriedades antimicrobianas quando testados separadamente (DORMAN; DEANS, 2000; GILL; HOLLEY, 2006; DI PASQUA et al., 2007; CHEN et al., 2011; YADAV et al., 2013).

Tem sido relatado que os OEs que contêm aldeídos ou fenóis, tais como cinamaldeído, citral, carvacrol, eugenol ou timol como principais componentes apresentaram maior atividade antibacteriana (DORMAN; DEANS, 2000). A atividade antimicrobiana elevada de espécies de *Thymus* e *Origanum* tem sido atribuída aos seus componentes fenólicos tais como timol e carvacrol, de *Eugenia caryophyllus*, *Syzygium aromaticum* e *Ocimum basilicum* ao eugenol e do OE de *Cinnamomum zeylanicum* foi também relacionada ao seu conteúdo de cinamaldeído (BASSOLE et al., 2012).

Os fenilpropanoides representam uma parte relativamente pequena dos OEs. São compostos produzidos a partir do aminoácido fenilalanina, que é convertido em ácido cinâmico, o principal precursor dessa classe de fitoquímicos. Eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e cinamaldeído são os fenilpropenos mais estudados (NAZARRO et al., 2013). A maior atividade antimicrobiana destas moléculas é conferida pelos seus grupos hidroxilas livres (LAEKEMAN et al., 1990), sendo que, para o eugenol, a atividade antimicrobiana também pode ser atribuída à presença de uma dupla ligação nas posições α,β da cadeia lateral e a um grupo metil localizado na posição γ (JUNG; FAHEY, 1983). A importância do grupo hidroxil (-OH) de fenóis foi demonstrada pela maior atividade antimicrobiana do carvacrol em relação ao carvacrol metil éster (DORMAN; DEANS, 2000; ULTEE et al., 2002).

Diversos mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a atividade dos óleos essenciais sobre as células bacterianas, envolvendo diferentes processos bioquímicos e estruturais em múltiplos alvos, tanto no interior da célula quanto nas membranas superficiais. Estes mecanismos incluem modificações químicas da membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas, que podem alterar completamente a conformação da célula microbiana. Além disso, a perda de íons e metabólitos pode comprometer o metabolismo microbiano e conduzir à morte celular (NAZARRO et al., 2013). A Figura 1 descreve alguns mecanismos de ação dos OEs e/ou seus componentes e mostra os potenciais alvos celulares da sua atividade antimicrobiana.

Figura 1 - Mecanismos de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas.

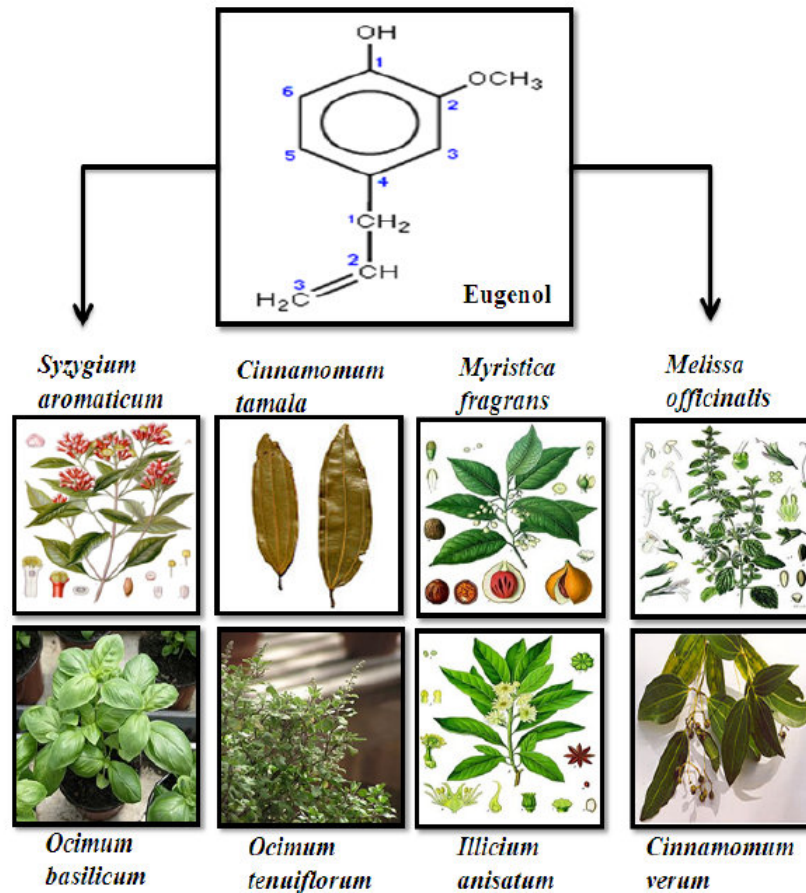


Fonte: NAZARRO et al., 2013.

3.2.3 Eugenol

Eugenol (C₁₀H₁₂O₂ - 4-alil-2metoxifenol) é um fenilpropanoide que pode ser extraído do óleo essencial de diversas plantas aromáticas: *S. aromaticum* ou *E. caryophyllata*, *Cinnamomum tamala*, *Myristica fragrans*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum tenuiflorum*, *Illicium anisatum* e *Cinnamomum verum* (Figura 2). O óleo essencial extraído do cravo da índia (*E. caryophyllata*) apresenta aproximadamente 72–90% de eugenol (JAGANATHAN; SUPRIYANTO, 2012). Chaieb e colaboradores (2007) identificaram 36 componentes extraídos do óleo essencial de *E. caryophyllata*, sendo que o eugenol foi a substância encontrada em maior porcentagem (88,58%). Se apresenta como um líquido oleoso, amarelo claro, fracamente ácido, levemente solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, com características e odor agradável de cravo e sabor picante.

Figura 2 – Estrutura e fontes de eugenol.



Fonte: JAGANATHAN; SUPRIYANTO, 2012.

3.2.3.1 Atividades Biológicas do Eugenol

O eugenol já é amplamente utilizado e conhecido por suas propriedades medicinais, dentre as quais podem-se destacar as atividades antibacteriana (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002; DEVI et al., 2010; DEVI et al., 2013), antifúngica (DE PAULA et al., 2014), antiviral (DAI et al., 2013), anti – *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006; ISLAMUDDIN et al., 2014), antioxidante (GÜLÇIN, 2011), anticarcinogênica (JAGANATHAN; SUPRIYANTO, 2012), analgésica e anti-inflamatória (DANIEL et al., 2009), inseticida (HUANG et al., 2002) e larvicida (BARBOSA et al., 2012).

3.2.3.1.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do eugenol já foi relatada frente a alguns microorganismos, tanto em bactérias Gram positivas quanto em Gram negativas e também fungos. Muitos autores comprovaram que este composto é ativo contra um grande número de bactérias, como: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002), *Salmonella typhi* (DEVI et al., 2010), *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp. (NAKAMURA et al., 1999) e *Proteus mirabilis* (DEVI et al., 2013).

Já foi também relatada a atividade antibacteriana deste fenilpropanoide sobre bactérias do gênero *Streptococcus*, incluindo a inibição do crescimento de células planctônicas de *S. agalactiae* (isolados de mastite bovina), *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. pyogenes* (ANANDA BASKARAN et al., 2009; OYEDEMI et al., 2009; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; YADAV et al., 2013; XU et al., 2013). Além disso, estudos recentes mostraram que esse composto também foi capaz de inibir a formação e reduzir a biomassa de biofilmes maduros de *S. pneumoniae* (YADAV et al., 2013), interferir na produção de fatores cariogênicos (XU et al., 2013) e diminuir a expressão de genes relacionados à formação de biofilmes (ADIL et al., 2014) por *S. mutans*.

Os mecanismos pelos quais o eugenol induz a morte celular bacteriana já foram relatados por alguns pesquisadores. Gill e Holey (2006) mostraram que o eugenol é capaz de inibir a atividade de ATPase ligada à membrana de *E. coli* e *L. monocytogenes*. Oyedemi et al. (2009) estudaram o mecanismo de ação deste composto por meio da avaliação do efeito nas membranas celulares de *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris* e *E. coli* e revelaram que o eugenol induz a lise celular e promove o extravasamento do conteúdo citoplasmático de proteínas e lipídeos e que tanto a parede celular quanto a membrana de células Gram positivas e Gram negativas tratadas com eugenol sofreram alterações significativas. Já foi sugerido também que o eugenol altera a integridade da parede celular em *S. typhi* (DEVI et al., 2010) e *P. mirabilis* (DEVI et al., 2013). Esta ação está relacionada com a característica lipofílica da molécula do eugenol, que pode atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática, desestruturar as camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos e assim aumentar a permeabilidade da membrana celular (OYEDEMI et al., 2009).

Outros estudos mostraram o potencial antifúngico contra *Candida* (BRAGA et al., 2007; HE et al., 2007; KHAN; MALIK; AHMAD, 2012; DE PAULA et al., 2014), *Trichophyton mentagrophytes* (PARK et al., 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (CHAMI et

al., 2005) e em várias espécies de fungos de origem alimentar (VELLUTI et al., 2004; LOPEZ et al., 2005). Também foi observado que o óleo essencial de cravo inibiu o crescimento de *Aspergillus niger* (PAWAR; THAKER, 2006).

3.2.4 Combinação entre Substâncias Antimicrobianas

Outra estratégia para combater a resistência bacteriana é a combinação entre substâncias antimicrobianas, sejam elas antibióticos comerciais, produtos naturais ou nanopartículas metálicas (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; WOLSKA; GRZEŚ; KUREK, 2012). Diversos estudos já reportaram a existência de interações sinérgicas entre antimicrobianos comerciais e produtos naturais, principalmente derivados de plantas, frente a diversas bactérias e fungos (ENDO et al., 2010; HEMAISWARYA, DOBLE, 2010; PALANIAPPAN, HOLLEY, 2010; LANGEVELD, VELDHUIZEN, BURT, 2013; WOJTYCZKA et al., 2014). Em contrapartida, pesquisas dedicadas ao estudo da combinação de óleos essenciais ou seus componentes com nanopartículas metálicas são escassos na literatura (ALLAHVERDIYEV et al., 2011).

A combinação de nanopartículas metálicas com óleos essenciais possibilita o desenvolvimento de agentes promissores para o tratamento tópico de infecções, devido não somente às propriedades antimicrobianas de ambas as substâncias como também às diferentes características farmacológicas dos óleos essenciais (ALLAHVERDIYEV et al., 2011).

Estudos envolvendo sinergismo entre antibióticos já utilizados clinicamente com fitoquímicos têm sido muito importantes a fim de melhorar a eficácia antimicrobiana. Diversas pesquisas *in vitro* mostram que os óleos essenciais (OEs) e seus componentes representam um grupo de fitoquímicos promissores para essa função (LANGEVELD; VELDHUIZEN; BURT, 2013). Já foi descrito, entre outros, que os OEs contendo carvacrol, timol, cinamaldeído, ácido cinâmico e eugenol podem ter um efeito aditivo ou sinérgico em combinação com os antibióticos convencionais, indicando que estes compostos oferecem possibilidades para reduzir o uso de antibióticos (CHOI et al., 2009; HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; HEMAISWARYA; DOBLE, 2010; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; CHEN et al., 2011; MOON; KIM; CHA, 2011). Além disso, vários mecanismos de ação foram relatados, como agirem em múltiplos alvos, por meio de interações físico-químicas e também inibindo os mecanismos de resistência bacteriana (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; TROMBETTA et al., 2005; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI;

DOBLE, 2008; HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; D'ARRIGO et al., 2010; BOLLA et al., 2011).

A combinação de antimicrobianos comerciais com eugenol tem mostrado efeito sinérgico em *Streptococcus* spp. Esse composto apresentou sinergismo *in vitro* com penicilina contra *S. pneumoniae* (YADAV et al., 2013), com ampicilina contra *S. criceti* e *S. gordonii* e com gentamicina contra *S. sanguinis* (MOON; KIM; CHA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO

Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae*, and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles.

Renata Perugini Biasi-Garbin¹, Eliane Saori Otaguiri¹, Alexandre Tadachi Morey¹, Mayara Fernandes da Silva¹, Ana Elisa Belotto Morguette¹, César Armando Contreras Lancheros¹, Danielle Kian¹, Márcia Regina Eches Perugini², Gerson Nakazato¹, Nelson Durán³, Celso Vataru Nakamura⁴, Lucy Megumi Yamauchi¹, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1,*}.

¹ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380 CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil.

² Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Av. Robert Koch, 60. Vila Operária, CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil.

³ Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n Barão Geraldo, Caixa-postal 6154, Campinas, SP, CEP 13085-970, Brazil.

⁴ Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Research Article

Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles

Renata Perugini Biasi-Garbin,¹ Eliane Saori Otaguiri,¹
Alexandre Tadachi Morey,² Mayara Fernandes da Silva,¹ Ana Elisa Belotto Morguette,¹
César Armando Contreras Lancheros,¹ Danielle Kian,¹ Márcia Regina Eches Perugini,³
Gerson Nakazato,¹ Nelson Durán,⁴ Celso Vataru Nakamura,⁵
Lucy Megumi Yamauchi,¹ and Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

²Programa Nacional de Pós Doutorado (PNPD/CAPES), Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

³Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Microbiologia Clínica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Avenida Robert Koch 60, Vila Operária, 86038-350 Londrina, PR, Brazil

⁴Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n Barão Geraldo, Caixa Postal 6154, 13085-970 Campinas, SP, Brazil

⁵Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Jardim Universitário, 87020-900 Maringá, PR, Brazil

Correspondence should be addressed to Sueli Fumie Yamada-Ogatta; ogatta@uel.br

Received 3 February 2015; Accepted 26 March 2015

Academic Editor: Felice Senatore

Copyright © 2015 Renata Perugini Biasi-Garbin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Streptococcus agalactiae (group B streptococci (GBS)) is an important infections agent in newborns associated with maternal vaginal colonization. Intrapartum antibiotic prophylaxis in GBS-colonized pregnant women has led to a significant reduction in the incidence of early neonatal infection in various geographic regions. However, this strategy may lead to resistance selecting among GBS, indicating the need for new alternatives to prevent bacterial transmission and even to treat GBS infections. This study reported for the first time the effect of eugenol on GBS isolated from colonized women, alone and in combination with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* (AgNPbio). Eugenol showed a bactericidal effect against planktonic cells of all GBS strains, and this effect appeared to be time-dependent as judged by the time-kill curves and viability analysis. Combination of eugenol with AgNPbio resulted in a strong synergistic activity, significantly reducing the minimum inhibitory concentration values of both compounds. Scanning and transmission electron microscopy revealed fragmented cells and changes in bacterial morphology after incubation with eugenol. In addition, eugenol inhibited the viability of sessile cells during biofilm formation and in mature biofilms. These results indicate the potential of eugenol as an alternative for controlling GBS infections.

1. Introduction

Streptococcus agalactiae (Group B *Streptococcus* (GBS)) is an important cause of invasive diseases, mainly in newborns, pregnant women, and elderly individuals [1, 2]. Neonatal

early onset diseases, which are characterized by sepsis, pneumonia, or meningitis, are strongly associated with maternal vaginal colonization and may occur vertically by aspiration of infected amniotic fluid or during passage through the birth

TABLE 1: Phenotypic and genotypic characteristics and antibacterial susceptibility profile of eugenol for planktonic and sessile cells of *Streptococcus agalactiae*.

GBS strains	MLVA genotypes ^a	Capsular types ^a	E ($\mu\text{g/mL}$)	DA ($\mu\text{g/mL}$)	Antimicrobial resistance genes ^a	Eugenol (%)		
						MIC ^b	MIC ^b /MBC ^c	SMIC ₁₀₀ ^d
50	8	Ia	0.25	0.25	—	0.5	0.25	0.09
72	5	III	0.125	0.25	—	0.125	0.25	0.06
80	6	V	0.25	0.125	—	0.25	0.125	0.05
89	13	Ia	0.25	0.125	—	0.25	0.25	0.09
115	7	V	>1024	1024	<i>ermB</i>	0.125	0.5	0.02
121	8	Ia	16	0.125	<i>mefA/E</i>	0.125	0.5	0.25
ATCC 13813	—	—	0.125	0.125	—	0.25	0.06	0.04

^aThe genetic diversity, the capsular type, and the resistance genes were previously determined by Otaguiri et al. [11]. ^bMinimum inhibitory concentration (MIC) of the compound which resulted in total inhibition of visible planktonic cell growth defined according to CLSI (2012) [31] guidelines by broth microdilution assays. ^cMinimum bactericidal concentration (MBC) of the eugenol. ^dSessile MIC (SMIC) of the eugenol which resulted in total reduction in metabolic activity of sessile cells during biofilm formation, using the XTT-reduction assay, after 24 h. ^eSMIC of the eugenol which resulted in 50% of reduction in metabolic activity of sessile cells from mature biofilm (24 h), using the XTT-reduction assay. MLVA: multiple *locus* variable number of tandem repeat analysis; E: erythromycin; DA: clindamycin.

canal [3]. It is estimated that 10–37% of pregnant women are colonized with GBS, and in the absence of any intervention, 30–70% of newborns become colonized, of which about 1–3% develop invasive diseases with high mortality rates [3, 4].

The active prevention strategy for GBS neonatal infections based on bacterial screening and intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) has led to a significant reduction in the incidence of early neonatal infection in various regions of the world. Current IAP consists of intravenous administration of beta-lactams (penicillin or ampicillin) to GBS-colonized pregnant woman for 4 h before delivery. Erythromycin, clindamycin, and vancomycin are the agents recommended in cases of colonization during pregnancy with beta-lactam-resistant GBS or beta-lactam allergy [4].

In general, GBS isolates have been shown to be sensitive to beta-lactams [5–7]. However, GBS isolates with reduced susceptibility and even resistance to beta-lactam agents have been reported in recent years [8, 9]. Moreover, resistance to erythromycin and clindamycin among GBS isolates has emerged in different regions of the world, with rates ranging from 14.5% to 70% and 8.2% to 70% for erythromycin and clindamycin, respectively [10–12].

Besides the emergence of GBS resistant to current antibiotics, the development of vaccines against GBS is still in progress, indicating that new safe and effective alternatives should be developed to prevent the transmission of this bacterium. Several authors have described the antibacterial activity of natural products against GBS [13–15], indicating their potential as alternatives for IAP, reducing the risk of development of resistance to commercially available antibiotics.

Eugenol, a major constituent of essential oils extracted from various plants, has been widely studied due to its medicinal properties, such as the following: antibacterial [16–18], antifungal [19], antiviral [20], antileishmanial [21], antioxidant [22], anticarcinogenic [23], and analgesic and anti-inflammatory [24]. Similarly, silver nanoparticles have been extensively investigated because of their antimicrobial properties alone [25, 26] or in combination with other compounds [27–29].

In this study, we evaluated the antibacterial effect of the phenylpropanoid eugenol on planktonic cells and biofilm of GBS isolated from colonized women, including those exhibiting resistance to erythromycin and clindamycin and its synergistic interaction with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* (AgNPbio).

2. Material and Methods

2.1. Bacteria and Growth Conditions. Six nonduplicates strains of *Streptococcus agalactiae* (GBS) recovered from vaginal-rectal swabs of colonized women were taken from the bacterial collection of the Laboratory of Clinical Microbiology of University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. Bacterial strains were included according to phenotypic and genotypic characteristics [11] (Table 1). Bacteria were kept at -20°C in tryptic soy broth (TSB, Oxoid) containing 20% glycerol and 5% sheep blood. The reference strain *S. agalactiae* ATCC 13813 (kindly donated by FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) was also included in this study. Bacteria were grown in TSB, pH 6.5, at 37°C for 24 h before the assays. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (document 186/09-CEP/UEL). Written informed consent was obtained from the patients for the publication of this report and any accompanying images.

2.2. Eugenol and Biologically Synthesized Silver Nanoparticles. A stock solution of 10% eugenol (SSWhite, Brazil) was prepared in TSB, pH 6.5, containing 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Chemical Co., USA). The DMSO final concentration in the assays did not exceed 1.0%. Biological silver nanoparticles (AgNPbio) were obtained after AgNO_3 reduction by *F. oxysporum* as previously described [30]. Briefly, *F. oxysporum* was cultured in broth medium containing 0.5% yeast extract at 28°C for 6 days. The fungal biomass was filtered, added (approximately 10 g) to 100 mL of distilled water, and incubated at 28°C for 72 h. A fungal-free solution was obtained by filtration and mixed with 1.0 mM AgNO_3 .

and the mixture was kept at 28°C for 28 h. AgNPbio were purified and characterized by scanning electron microscopy and energy-dispersive spectroscopy.

2.3. Antibacterial Activity of Eugenol against Planktonic Cells. The minimal inhibitory concentration (MIC) of eugenol was determined by broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [31], with modifications. Twofold serial dilutions of eugenol (1–0.015%) in TSB were prepared in sterile polystyrene 96-well plates (Techno Plastic Products, Switzerland). Wells contained medium alone or medium plus 1% DMSO and untreated planktonic cells, and medium alone served as growth and sterility controls. After 24 h incubation, optical density was measured at 600 nm with a microtiter plate reader (Synergy HT, Biotek) and MIC was determined at total inhibition of growth after 24 h incubation compared to untreated planktonic cells [32]. MICs for erythromycin and clindamycin were also determined as described above, and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was used as the quality control. To determine the minimal bactericidal concentration (MBC), the content from the wells (10 μ L) showing no growth was transferred to plates with tryptic soy agar (TSA, Oxoid) containing 5% sheep blood and incubated at 37°C for 24 h. MBC was defined as 100% decrease in colony forming units (CFU) compared to untreated bacteria. All assays were carried out in triplicate on two different occasions.

2.4. Time-Kill Curves. For time-kill curve analysis, planktonic cells of GBS 89, GBS 121, and *S. agalactiae* ATCC 13813 ($1-5 \times 10^5$ CFU/mL) were incubated in TSB containing MIC levels of eugenol. At determined time points (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 24 h), aliquots were aseptically transferred to TSA plus 5% sheep blood plates and the CFU counts were determined after incubation at 37°C for 24 h. The bacterial viability of eugenol-treated GBS was also evaluated, using LIVE/DEAD *BacLight* staining kit (Molecular Probes, Invitrogen) according to the manufactures' recommendations. This assay is based on the detection of two nucleic acid fluorescent stains. Green-fluorescent SYTO 9 labels live and dead bacteria, whereas the red fluorescent propidium iodide selectively labels bacteria with permeable (damaged) membranes. Bacterial cells were placed on a glass coverslip and analyzed by fluorescence microscopy (LEICA DM2000). All assays were carried out in triplicate on three different occasions.

2.5. Antibacterial Activity of Eugenol against Biofilms. Biofilms of GBS strains and *S. agalactiae* ATCC 13813 were formed on polystyrene surface of flat-bottomed 96-well microtiter plates (Techno Plastic Products, Switzerland) in a static model at 37°C according to Borges et al. [33]. Briefly, bacterial cells were grown in TSB at 37°C for 18 h, harvested by centrifugation, and washed with sterile 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and the cell density was adjusted to 1.0×10^8 CFU/mL in the same medium. Twofold serial dilutions of eugenol (2–0.03%) were prepared in TSB. For analysis of eugenol effect during biofilm formation,

a 20 μ L aliquot of each cell suspension was transferred to each well containing 180 μ L of TSB with different concentrations of eugenol, and the plates were incubated for 24 h. For analysis of eugenol effect on mature biofilm, 20 μ L of each cell suspension was added to each well containing 180 μ L of TSB. After 24 h of biofilm formation, the medium was aspirated off and each well was washed with sterile PBS. A 200 μ L aliquot of TSB containing different concentrations of eugenol was added and the plates were incubated for another 24 h. Controls included eugenol-free wells and biofilm-free wells. Sessile (biofilm) minimum inhibitory concentrations were determined at 50 and 100% inhibition (SMIC) compared to eugenol-free control wells using the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT)-reduction assay [34]. A 200 μ L aliquot of XTT-menadione [0.5 mg/mL XTT, 1 mM menadione (Sigma Chemical Co., USA)] was added to each well, and the plates were incubated in the dark at 37°C for 90 min, after which the optical density was measured at 490 nm with a microtiter plate reader (Synergy HT, Biotek). Experiments were carried out in quintuplicate on two different occasions.

2.6. Electron Microscopy Analysis. Planktonic cells treated with MIC levels of eugenol for 5 h were fixed for 2 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. For scanning electron microscopy (SEM), postfixing cells were dehydrated with a series of ethanol washes (15, 30, 50, 70, 80, 90, 95, and 100%), critical-point dried in CO₂, coated with gold, and examined with a SHIMADZU SS-550 scanning electron microscope. For transmission electron microscopy (TEM), postfixation was carried out in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM CaCl₂ at room temperature for 1 h. The cells were dehydrated in acetone and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Zeiss EM900 electron microscope.

2.7. Analysis of the Combinations of Eugenol and AgNPbio. The effect of eugenol combined with AgNPbio on planktonic cells of GBS was assessed by checkerboard method in 96-well microtiter plates, as previously described [35]. Twofold serial dilutions of the compounds were prepared in TSB, and the final concentrations of eugenol and AgNPbio ranged from 1 to 0.015% and 500 to 0.49 μ M, respectively. Bacteria (1.0×10^5 cells) were grown with eugenol or AgNPbio individually and in combinations at 37°C for 24 h. The interactions of the two compounds were analyzed by the fractional inhibitory concentration index (FICI), which was defined as the sum of FIC_{eugenol} and FIC_{AgNPbio}. FIC of the material is the concentration that kills when being used in combination with another divided by the concentration that has same effect when used individually [35].

2.8. Statistical Analysis. The results were evaluated by one-way ANOVA using the GRAPHPAD PRISM version 5.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered significant.

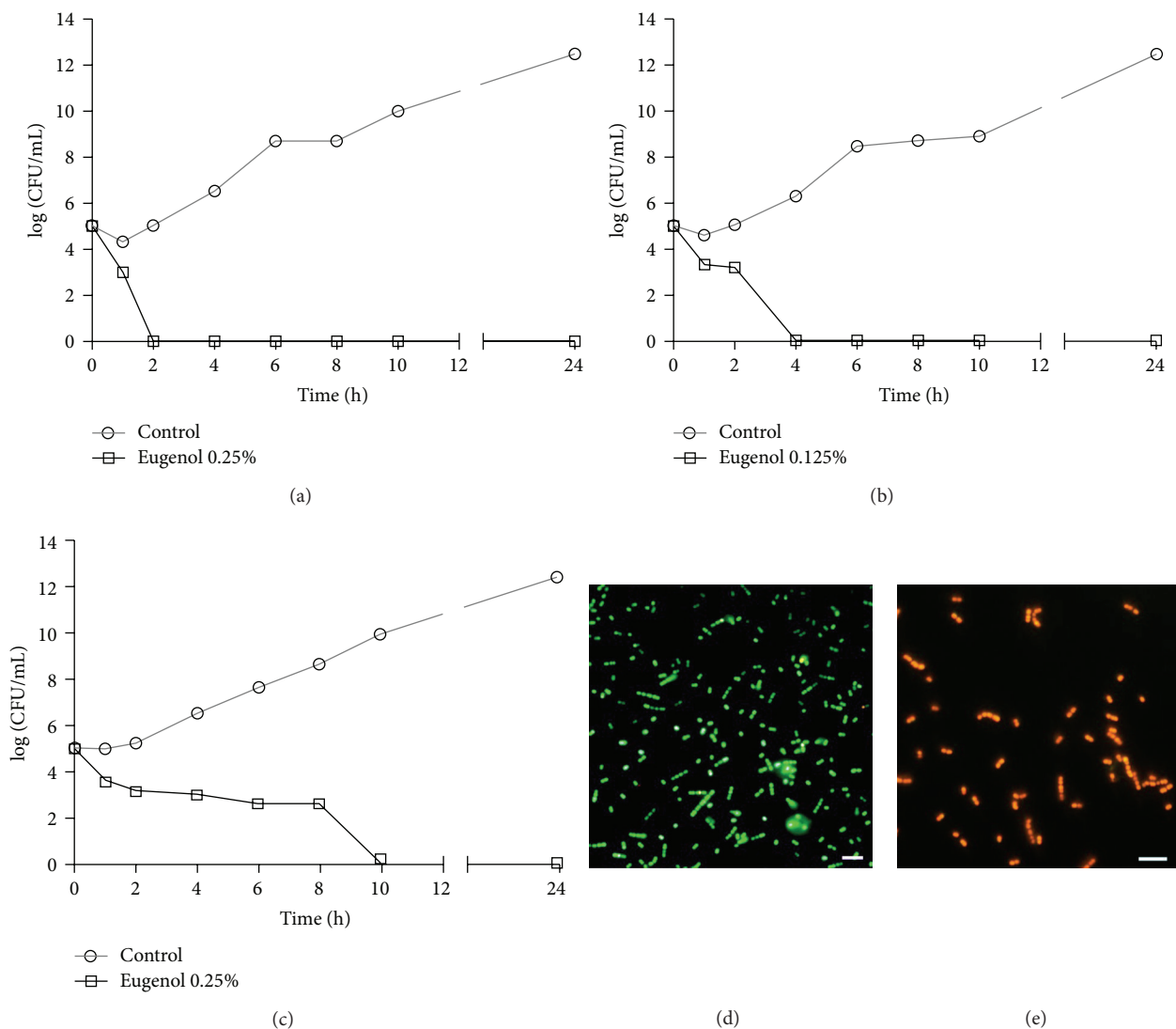


FIGURE 1: Effect of eugenol on growth (a–c) and viability (d–e) of *Streptococcus agalactiae*. Time-kill curves of GBS 89 (a), GBS 121 (b), and *S. agalactiae* ATCC 13813 (c) strains: bacteria were incubated with eugenol at MIC for 24 h at 37°C and the CFU counts were determined at specified time points. Viability of the cells was determined with live-dead staining and GBSs with intact membranes were green-fluorescent (d), whereas eugenol-treated GBSs (at MIC) with damaged membranes were red-fluorescent (e). Representative images are shown. Bar = 5 μ m.

3. Results

3.1. Antibacterial Activity of Eugenol against Planktonic Cells. Eugenol inhibited the planktonic growth of all GBS strains, including those resistant to erythromycin and/or clindamycin. MIC and MBC values were exactly at the same concentrations for all GBS strains analyzed in this study. The mean MIC/MBC value was $0.23 \pm 0.13\%$ ranging from 0.125 to 0.5% (Table 1). To evaluate the killing kinetics of eugenol against GBS, survival of planktonic cells from GBS 89, GBS 121, and reference strain was assessed during 24 h in the presence of the phenylpropanoid at MIC. As shown in Figure 1, a time-dependent bactericidal effect was observed for all strains. The presence of eugenol at MIC

reduced the planktonic cell population approximately by 1 to 2 \log_{10} CFU/mL ($P < 0.05$) after one hour of incubation. No colony forming units (Figures 1(a), 1(b), and 1(c)) or cellular viability (Figures 1(d) and 1(e)) was detected after 2, 4, and 10 h of incubation in the presence of eugenol for GBS 89, GBS 121, or reference strain. At the specified time, all eugenol-treated GBSs were red-fluorescent, reflecting dead bacteria with damaged membranes, in contrast to green-fluorescent untreated cells.

The combination of eugenol with AgNPbio significantly reduced ($P < 0.05$) the MIC value of both compounds, and the calculated FICI indicated a synergistic effect between them against all GBS strains (Table 2). AgNPbio alone at 125 μ M inhibited the growth of all GBS strains. When

TABLE 2: *In vitro* synergistic effect of eugenol and biological silver nanoparticles on *Streptococcus agalactiae* growth.

GBS strains	MIC ^a		Eugenol/AgNPbio	FICI ^d	Effect
	Eugenol ^b (%)	AgNPbio ^c (μ M)			
50	0.5	125	0.06/15.62	0.25	Synergism
72	0.125	125	0.03/31.25	0.5	Synergism
80	0.25	125	0.06/0.49	0.25	Synergism
89	0.25	125	0.03/7.8	0.19	Synergism
115	0.25	125	0.03/31.25	0.38	Synergism
121	0.125	125	0.03/3.9	0.281	Synergism
ATCC 13813	0.25	125	0.03/15.62	0.25	Synergism

^aMIC: minimum inhibitory concentration. ^bMIC of eugenol used alone. ^cMIC of silver nanoparticle used alone. ^dFICI: fractional inhibitory concentrations index were calculated according to Yadav et al. [35] and classified as follows: synergistic if FIC \leq 0.5, additive if FIC $>$ 0.5 and \leq 1.0, indifferent if FIC $>$ 1.0 and \leq 2.0, and antagonistic if FIC $>$ 2.0.

the two compounds were combined, the MIC values of eugenol and AgNPbio decreased 4- to 8-fold and 4- to 256-fold, respectively.

3.2. Morphological and Ultrastructural Alterations in Eugenol-Treated Planktonic Cells. SEM images showed untreated control cells with typical morphology arranged in an organized manner (Figure 2(a)). In contrast, the incubation of GBS planktonic cells with an inhibitory concentration of eugenol for 5 h led to cell lysis resulting in leakage of cytoplasmic contents (Figure 2(b)). Likewise, TEM imaging of control cells showed an intact cell wall with regular electron density (Figure 2(c)) and treated cells displaying various alterations such as changes in bacterium morphology; disruption of cell wall (arrow), corroborating the SEM results; and decrease in electron density (Figure 2(d)).

3.3. Antibacterial Activity of Eugenol in Biofilms. Eugenol inhibited biofilm formation of GBS, and no metabolic activity was detected at concentrations ranging from 0.06 to 0.5%, where these values were considered, SMIC₁₀₀ (Table 1). In addition, eugenol decreased significantly the viability of mature (24 h) biofilm at concentrations ranging from 0.03 to 2%, with SMIC₅₀ ranging from 0.02 to 0.25% (Table 1). However, except for the reference strain, no total inhibition was observed at the highest concentration tested in this study. At 2% eugenol, reduction in metabolic activity ranged from 60 to 90% for the other GBS strains, where GBS 121 biofilm was the least susceptible.

4. Discussion

Eugenol is a remarkably versatile molecule, which can be incorporated as a functional compound in various products applied not only in the pharmaceutical industry but also in the agricultural, food, and cosmetic industries as well [36].

In this study, the bactericidal activity of eugenol against human isolates of *S. agalactiae*, including those exhibiting different mechanisms of resistance to erythromycin and/or clindamycin, is reported for the first time. The antibacterial activity of eugenol against planktonic cells of different species of the genus *Streptococcus* has been previously reported [35, 37–39]. Baskaran et al. [37] reported the bactericidal activity of eugenol against planktonic cells of five agents of bovine

mastitis, including *S. agalactiae*, whose MIC and MBC were 0.4 and 0.8%, respectively.

The bactericidal effect of eugenol on *S. agalactiae* seems to be dependent on changes in the cell envelope, as judged by alterations in the morphology and ultrastructure observed in treated cells. In fact, other authors reported that eugenol induces cell lysis through protein and lipid leakage, leading to extrusion of cytoplasmic content in various Gram-negative and Gram-positive bacteria, including *Streptococcus pyogenes* [17, 35, 38]. In addition, eugenol is capable of inhibiting the membrane-bound ATPase activity of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [40].

In this study, silver nanoparticles synthesized by an ecofriendly method using the filamentous fungus *F. oxysporum* showed inhibitory activity against planktonic cells of all GBS strains. Moreover, the synergistic antibacterial interaction of AgNPbio with eugenol against GBS is reported for the first time. Metallic nanoparticles have been widely studied because of their broad spectrum antimicrobial effect, even at low concentrations [25–28]. In addition, the combination of these nanoparticles with several compounds has shown potent antimicrobial activity in different microbial species, including those displaying resistance to conventional antibiotics [26–29]. Accordingly, additive or synergistic effect of essential oil component cinnamaldehyde with chemically synthesized silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria has been reported elsewhere [29].

Current antibacterial agents have limited efficacy on biofilms. Sessile (adhered) bacteria in these communities have different physiological characteristics compared to free-floating planktonic cells. Clinically, these features can result in protection against the host immune system and less susceptibility to antimicrobial agents, contributing to persistent infections and difficult treatment [41]. Biofilms are also established during host colonization, enabling the bacteria to withstand removal by mechanical processes [42]. Except for *S. agalactiae*, the antibiofilm activity of eugenol for various bacterial species has been reported elsewhere [35, 43]. In this study, eugenol also exhibited an antibacterial activity against biofilms of *S. agalactiae*, showing the ability to inhibit its formation as well as the viability of mature biofilm, under *in vitro* conditions. Similarly, Yadav et al. [35] reported the inhibitory effect of eugenol against biofilms of *S. pneumoniae*.

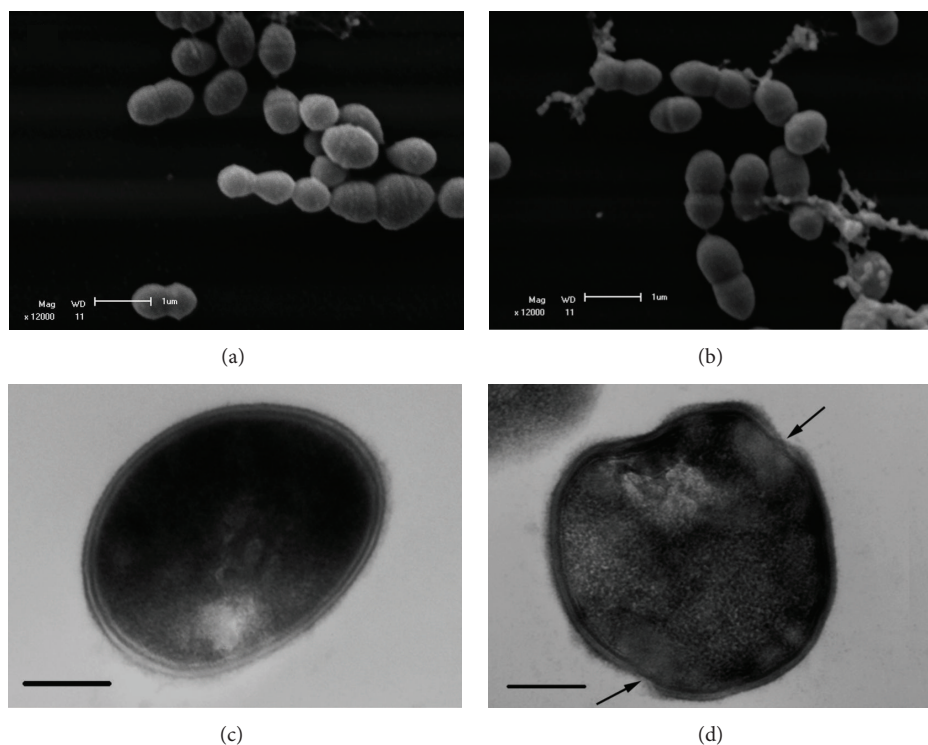


FIGURE 2: Scanning electron microscopy (a and b) and transmission electron microscopy images (c and d) of the effect of eugenol on *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813. Untreated cells (a and c) and treated cells with eugenol 0.25% for 5 h (b and d). Bar: (a and b) = 1 μm , (c and d) = 200 nm.

Furthermore, Adil et al. [44] described that *Streptococcus mutans* incubated in the presence of subinhibitory concentrations of eugenol showed decreased expression of genes related to biofilm formation.

A limitation of this study, which may reduce the generalization of the results, is the number of GBS strains. Despite this limitation, the results presented here showed the antibacterial activity of eugenol against *S. agalactiae*, alone or in combination with AgNPbio, opening a promising strategy for application in IAP for women colonized with this bacterium. In this sense, a variety of evidence supports the application of eugenol in human healthcare. The addition of eugenol and other essential oils in animal feed reduced the *Clostridium perfringens* load in the gut of broiler chickens. Although this bacterium can be a harmless intestinal inhabitant of chickens, it is the leading agent of necrotic enteritis in these hosts [45]. Topical application of eugenol on teeth reduced the incidence and severity of carious lesions caused by *S. mutans* in rats [39]. Preliminary *in vivo* studies have shown the safety and efficacy of topical use of eugenol in combination with thymol in the treatment of bacterial vaginosis and vaginal candidiasis [46]. The incorporation of eugenol in polymeric material has been shown to reduce the biofilm formation on surfaces [43].

5. Conclusion

The results obtained in this study demonstrated the bactericidal activity of eugenol and its synergistic effect with AgNPbio against planktonic cells of *S. agalactiae*. Furthermore, this

compound inhibited biofilm formation and viability of mature biofilm formed on polystyrene.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS, Edição 2011)/Fundação Araucária/SESA-PR/MS/CNPq; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant no. 402728/2013-0); and Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. R. P. Biasi-Garbin was funded by a student scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This work is part of the M.S. dissertation of R. P. Biasi-Garbin. The authors thank Dr. A. Leyva for English editing of the paper and Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) of Universidade Estadual de Maringá for supporting the electron microscopy analysis.

References

- [1] A. Schuchat, "Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, no. 3, pp. 497–513, 1998.

- [2] T. H. Skoff, M. M. Farley, S. Petit et al., "Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 1, pp. 85–92, 2009.
- [3] P. Melin, "Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. 9, pp. 1294–1303, 2011.
- [4] J. R. Verani, L. McGee, and S. J. Schrag, "Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010," *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 59, no. RR-10, pp. 1–36, 2010.
- [5] J. K. Palmeiro, L. M. Dalla-Costa, S. E. Fracalanza et al., "Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 12, pp. 4397–4403, 2010.
- [6] S. M. Garland, E. Cottrill, L. Markowski et al., "Antimicrobial resistance in group B streptococcus: the Australian experience," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 60, part 2, pp. 230–235, 2011.
- [7] C. Turner, P. Turner, L. Po et al., "Group B streptococcal carriage, serotype distribution and antibiotic susceptibilities in pregnant women at the time of delivery in a refugee population on the Thai-Myanmar border," *BMC Infectious Diseases*, vol. 12, article 34, 2012.
- [8] J. Longtin, C. Vermeiren, D. Shahinas et al., "Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 6, pp. 2983–2985, 2011.
- [9] N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama et al., "Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 4, Article ID dkr546, pp. 849–856, 2012.
- [10] A. Lambiase, A. Agangi, M. Del Pezzo et al., "In vitro resistance to macrolides and clindamycin by group B streptococcus isolated from pregnant and nonpregnant women," *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, vol. 2012, Article ID 913603, 5 pages, 2012.
- [11] E. S. Otaguiri, A. E. B. Morguette, E. R. Tavares et al., "Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants," *BMC Microbiology*, vol. 13, no. 1, article 297, 2013.
- [12] S. Fröhlicher, G. Reichen, M. Müller et al., "Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre," *Swiss Medical Weekly*, vol. 144, Article ID w13935, 2014.
- [13] M. J. Alves, I. C. F. R. Ferreira, A. Martins, and M. Pintado, "Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 113, no. 2, pp. 466–475, 2012.
- [14] A. Elaissi, Z. Rouis, N. A. B. Salem et al., "Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, article 81, 2012.
- [15] F. O. Ruíz, G. Gerbaldo, M. J. García, W. Giordano, L. Pascual, and I. L. Barberis, "Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactobacilli strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*," *Current Microbiology*, vol. 64, no. 4, pp. 349–356, 2012.
- [16] C. V. Nakamura, T. Ueda-Nakamura, E. Bando, A. F. Negrão Melo, D. A. Garcia Cortez, and B. P. Dias Filho Filho, "Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 94, no. 5, pp. 675–678, 1999.
- [17] K. P. Devi, S. A. Nisha, R. Sakthivel, and S. K. Pandian, "Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 130, no. 1, pp. 107–115, 2010.
- [18] K. P. Devi, R. Sakthivel, S. A. Nisha, N. Suganthi, and S. K. Pandian, "Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*," *Archives of Pharmacological Research*, vol. 36, no. 3, pp. 282–292, 2013.
- [19] S. B. de Paula, T. F. Bartelli, V. Di Raimo et al., "Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, Article ID 505204, 8 pages, 2014.
- [20] J.-P. Dai, X.-F. Zhao, J. Zeng et al., "Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, Article ID e61026, 2013.
- [21] T. Ueda-Nakamura, R. R. Mendonça-Filho, J. A. Morgado-Díaz et al., "Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*," *Parasitology International*, vol. 55, no. 2, pp. 99–105, 2006.
- [22] I. Gülçin, "Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study," *Journal of Medicinal Food*, vol. 14, no. 9, pp. 975–985, 2011.
- [23] S. K. Jaganathan and E. Supriyanto, "Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells," *Molecules*, vol. 17, no. 6, pp. 6290–6304, 2012.
- [24] A. N. Daniel, S. M. Sartoretto, G. Schmidt, S. M. Caparroz-Assef, C. A. Bersani-Amado, and R. K. N. Cuman, "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, no. 1, pp. 212–217, 2009.
- [25] N. Durán, P. D. Marcato, R. de Conti, O. L. Alves, F. T. M. Costa, and M. Brocchi, "Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 21, no. 6, pp. 949–959, 2010.
- [26] A. Herman and A. P. Herman, "Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 946–957, 2014.
- [27] A. M. Allahverdiyev, K. V. Kon, E. S. Abamor, M. Bagirova, and M. Rafailovich, "Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 9, no. 11, pp. 1035–1052, 2011.
- [28] V. F. Cardozo, A. G. Oliveira, E. K. Nishio et al., "Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 12, article 12, 2013.
- [29] I. N. Ghosh, S. D. Patil, T. K. Sharma, S. K. Srivastava, R. Pathania, and N. K. Navani, "Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial

- applications,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 4721–4731, 2013.
- [30] N. Durán, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. I. H. de Souza, and E. Esposito, “Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 3, article 8, 2005.
- [31] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), “Clinical and Laboratory Standards Institute: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement,” Document M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 2012.
- [32] J. Kwieciński, S. Eick, and K. Wójcik, “Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 33, no. 4, pp. 343–347, 2009.
- [33] S. Borges, J. Silva, and P. Teixeira, “Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs,” *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 101, no. 3, pp. 677–682, 2012.
- [34] R. M. B. Shafreen, S. Srinivasan, P. Manisankar, and S. K. Pandian, “Biofilm formation by *Streptococcus pyogenes*: modulation of exopolysaccharide by fluoroquinolone derivatives,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 112, no. 4, pp. 345–350, 2011.
- [35] M. K. Yadav, S. W. Park, S. W. Chae, J. J. Song, and H. C. Kim, “Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*,” *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, vol. 121, no. 12, pp. 1198–1206, 2013.
- [36] G. P. Kamatou, I. Vermaak, and A. M. Viljoen, “Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule,” *Molecules*, vol. 17, no. 6, pp. 6953–6981, 2012.
- [37] S. Ananda Baskaran, G. W. Kazmer, L. Hinckley, S. M. Andrew, and K. Venkitanarayanan, “Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro,” *Journal of Dairy Science*, vol. 92, no. 4, pp. 1423–1429, 2009.
- [38] S. O. Oyedemi, A. I. Okoh, L. V. Mabinya, G. Pirochenva, and A. J. Afolayan, “The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 7, pp. 1280–1286, 2009.
- [39] J.-S. Xu, Y. Li, X. Cao, and Y. Cui, “The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats,” *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 5, no. 6, pp. 1667–1670, 2013.
- [40] A. O. Gill and R. A. Holley, “Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 111, no. 2, pp. 170–174, 2006.
- [41] J. A. Otter, K. Vickery, J. T. Walker et al., “Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection,” *Journal of Hospital Infection*, vol. 89, no. 1, pp. 16–27, 2015.
- [42] M. Otto, “Physical stress and bacterial colonization,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 38, no. 6, pp. 1250–1270, 2014.
- [43] A. Nostro, R. Scaffaro, M. D’Arrigo et al., “Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 21, pp. 9515–9523, 2013.
- [44] M. Adil, K. Singh, P. K. Verma, and A. U. Khan, “Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: an approach to inhibit biofilms,” *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 2, no. 4, pp. 286–292, 2014.
- [45] P. Mitsch, K. Zitterl-Eglseer, B. Köhler, C. Gabler, R. Losa, and I. Zimpernik, “The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens,” *Poultry Science*, vol. 83, no. 4, pp. 669–675, 2004.
- [46] F. Sosto and C. Benvenuti, “Controlled study on thymol + eugenol vaginal douche versus econazole in vaginal candidiasis and metronidazole in bacterial vaginosis,” *Arzneimittel-Forschung*, vol. 61, no. 2, pp. 126–131, 2011.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o eugenol inibiu o crescimento das células planctônicas de todos os isolados de EGB testados, inclusive daqueles resistentes a eritromicina e/ou clindamicina, com CIM/CBM variando de 0,125% a 0,5%.

As análises das curvas de morte e das imagens de microscopia de fluorescência mostraram o efeito bactericida tempo-dependente do eugenol, que foi observado para todas as amostras avaliadas. A exposição a concentrações de eugenol iguais à CIM de cada amostra reduziu a população de células planctônicas na primeira hora de incubação. Da mesma maneira, no tempo especificado, as células de EGB tratadas com eugenol apresentaram coloração vermelho fluorescente, indicando bactérias mortas com membranas danificadas, em contraste com as células não tratadas verde – fluorescentes.

A combinação do eugenol com AgNPbio reduziu significativamente os valores de CIM dos dois compostos e a FIC calculada indicou um efeito sinérgico contra todos os isolados estudados.

As alterações morfológicas e ultraestruturais provocadas pelo eugenol foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão que mostraram células de EGB tratadas fragmentadas, apresentando extravasamento do conteúdo celular, além de alterações na morfologia bacteriana, rompimento da parede celular e diminuição da eletrodensidade celular.

Além disso, este composto apresentou efeito inibitório na viabilidade de células sésseis tanto durante a formação de biofilme como sobre biofilmes maduros formados em poliestireno. No entanto, exceto para a cepa de referência, não foi observada inibição total na maior concentração analisada neste estudo, sendo que a redução da atividade metabólica variou de 60 a 90% para as outras amostras de EGB.

Esses resultados comprovam a efetividade do eugenol contra células planctônicas e sésseis de EGB, reforçando o potencial deste composto como um antibacteriano adicional no tratamento da colonização vaginal materna.

REFERÊNCIAS

ADIL, M. et al. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. **J Global Antimicrob Resist**, Jul 2014.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, n. 11, p. 1035-52, Nov 2011.

AL-MAANI, A. et al. Nosocomial transmission of group B *Streptococci* proven by positive environmental culture. **Oman Med J.**, v. 29, n. 5, p. 376–79, Sep 2014.

ALVES, M. J. et al. Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 2, p. 466-75, Aug 2012.

AMIN, Z. A. et al. Assessment of in vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. **J Sci Food Agric**, v. 92, n. 9, p. 1874-7, Jul 2012.

ANANDA BASKARAN, S. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 4, p. 1423-9, Apr 2009.

ASHOUR, M. L. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). **J Pharm Pharmacol**, v. 61, n. 8, p. 1079-87, Aug 2009.

ASOODEH, A.; ZARDINI, H. Z.; CHAMANI, J. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). **J Pept Sci**, v. 18, n. 1, p. 10-6, Jan 2012.

BAKER, C. J. B. F., GORDON, R. C., YOW, M. D. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. **J Pediatr**, v. 82, n. 4, p. 724–9, 1973.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils--a review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 2, p. 446-75, Feb 2008.

BAKR, A. F.; KARKOUR, T. Effect of predelivery vaginal antiseptics on maternal and neonatal morbidity and mortality in Egypt. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 14, n. 6, p. 496-501, Jul-Aug 2005.

BARBOSA, J. D. et al. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Manag Sci**, v. 68, n. 11, p. 1478-83, Nov 2012.

- BASSOLÉ, I. H.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.
- BETRIU, C. et al. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 9, p. 2183-6, Sep 1994.
- BOLLA, J. M. et al. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. **FEBS Lett**, v. 585, n. 11, p. 1682-90, Jun 2011.
- BORCHARDT, S. M. et al. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. **BMC Infect Dis**, v. 6, p. 57, 2006.
- BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 677-82, Mar 2012.
- BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. **N Engl J Med**, v. 314, n. 26, p. 1665-9, Jun 1986.
- BRAGA, P. C. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 6, p. 396-400, Set 2007.
- CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 12, p. 12, 2013.
- CASTOR, M. L. et al. Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 2008, p. 727505, 2008.
- CHAIIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytother Res**, v. 21, n. 6, p. 501-6, Jun 2007.
- CHAMI, F. et al. Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytother Res**, v. 19, n. 5, p. 405-8, May 2005.
- CHEN, Y. L. et al. Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur J Pharm Sci**, v. 43, n. 3, p. 188-94, Jun 2011.
- CHOI, J. G. et al. Antibacterial activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1773-80, 2009.

CLANCY, J. et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. **Mol Microbiol**, v. 22, n. 5, p. 867-79, Dec 1996.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, Twentieth informational supplement, Document M100-S22, Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

CUTLAND, C. L. et al. Chlorhexidine maternal-vaginal and neonate body wipes in sepsis and vertical transmission of pathogenic bacteria in South Africa: a randomised, controlled trial. **Lancet**, v. 374, n. 9705, p. 1909-16, Dec 2009.

D'ARRIGO, M. et al. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 317-22, Apr 2010.

DAI, J. P. et al. Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61026, 2013.

DANIEL, A. N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 1B, p. 212-17, Jan/Mar 2009.

DE PAULA, S. B. et al. Effect of Eugenol on Cell Surface Hydrophobicity, Adhesion, and Biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* Isolated from Oral Cavity of HIV-Infected Patients. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p. 505204, 2014.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **J Ethnopharmacol**, v. 130, n. 1, p. 107-15, Jul 2010.

DEVI, K. P. et al. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. **Arch Pharm Res**, v. 36, n. 3, p. 282-92, Mar 2013.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 12, p. 4863-70, Jun 2007.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. **Mol Microbiol**, v. 54, n. 1, p. 23-31, Oct 2004.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol**, v. 88, n. 2, p. 308-16, Feb 2000.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **J Nanobiotechnology**, v. 3, p. 8, 2005.

DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **J Braz Chem Soc**, v. 21, n. 6, p. 949-59, 2010.

ELAISSI, A. et al. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 81, 2012.

ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Res Microbiol**, v. 161, n. 7, p. 534-40, Sep 2010.

FILLERON, A. et al. Group B streptococci in milk and late neonatal infections: an analysis of cases in the literature. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 99, n. 1, p. F41-7, Jan 2014.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **J Food Prot**, v. 65, n. 10, p. 1545-60, Oct 2002.

FRÖHLICHER, S. et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre. **Swiss Med Wkly**, v. 144, p. w13935, 2014.

FRY, R. M. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. **Lancet**, v.1, p. 199–201, 1938.

GARLAND, S. M. et al. Antimicrobial resistance in group B streptococcus: the Australian experience. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 2, p. 230-5, Feb 2011.

GHOSH, I. N. et al. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 4721-31, Dec 2013.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **Int J Food Microbiol**, v. 111, n. 2, p. 170-4, Sep 2006.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. **J Med Food**, v. 14, n. 9, p. 975-85, Sep 2011.

HE, M. et al. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 137-43, Mar 2007.

HEATH, P. T. et al. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. **Lancet**, v. 363, n. 9405, p. 292-4, Jan 2004.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 997-1005, Nov 2009.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M.. Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 12, p. 1469-76, Dec 2010.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-52, Aug 2008.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 14, n. 1, p. 946-57, Jan 2014.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-31, Oct 2002.

HUANG, H. et al. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Stored. Prod. Res.**, v. 38, n. 5, p. 403–412, 2002.

ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. **J Med Microbiol**, v. 63, n. Pt 1, p. 74-85, Jan 2014.

JAGANATHAN, S. K.; SUPRIYANTO, E. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6290-304, 2012.

JUNG, H.G.; FAHEY, G.C. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: A review. **J. Anim. Sci.** v. 57, n. 1, p. 206–219, 1983.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953-81, Jun 2012.

KHAN, M.S.A.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, v. 50, n. 1, p. 33–42, Jan 2012.

KIMURA, K. et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2890-7, Aug 2008.

KLAASSEN, C. H.; MOUTON, J.W. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 4, p.1271-8, Apr 2005.

KWIECIŃSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 4, p. 343-7, Apr 2009.

LAEKEMAN, G.M. et al. Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. **Phytother. Res.**, v. 4, n. 3, p. 90–96, Jun 1990.

LAMAGNI, T. L. et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 5, p. 682-8, Sep 2013.

LAMBIASE, A. et al. In vitro resistance to macrolides and clindamycin by Group B *Streptococcus* isolated from pregnant and nonpregnant women. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 2012, p. 913603, 2012.

LANCEFIELD, R. C. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF SPECIFIC TYPES OF BOVINE HEMOLYTIC STREPTOCOCCI (GROUP B). **J Exp Med**, v. 59, n. 4, p. 441-58, Mar 1934.

LANCEFIELD, R. C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and nonpathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. **J Exp Med**, v. 61, n. 3, p. 335–49, 1935.

LANGVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Crit Rev Microbiol**, Feb 2013.

LE DOARE, K.; HEATH, P. T. An overview of global GBS epidemiology. **Vaccine**, v. 31 Suppl 4, p. D7-12, Aug 2013.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 4, p. 482-92, Feb 2002.

LIN, F. Y. et al. Prematurity is the major risk factor for late-onset group B streptococcus disease. **J Infect Dis**, v. 188, n. 2, p. 267-71, Jul 2003.

LINHARES, J. J. et al. Prevalence of the colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women from a maternity in Ceará, Brazil, correlating with perinatal outcomes. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 12, p. 395-400, Dec 2011.

LONGTIN, J. et al. Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 2983-5, Jun 2011.

LÓPEZ, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 17, p. 6939-46, Aug 2005.

MELIN, P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 9, p. 1294-303, Sep 2011.

MITSCH et al. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poult Sci.**, v. 83, n. 4, p. 669-75, Apr 2004.

MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 9, p. 907-16, Sep 2011.

NAGANO, N. et al. Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 6, p. 1326-8, Dec 2009.

NAGANO, N. et al. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B *Streptococci* with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 12, p. 4258-67, Dec 2008.

NAGANO, N. et al. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 4, p. 849-56, Apr 2012.

NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-8, 1999 Sep-Oct 1999.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1451-74, Nov 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-35, Mar 2012.

NOCARD, N.; MOLLEREAU, R. Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. **Ann Inst Pasteur**, v.1, p. 109–26, 1887.

NOSTRO, A. et al. Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, n. 21, p. 9515-23, Nov 2013.

OTAGUIRI, E. S. et al. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 297, 2013.

OTTER, J. A. et al. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. **J Hosp Infect**, v. 89, n. 1, p. 16-27, Jan 2015.

OTTO, M. Physical stress and bacterial colonization. **FEMS Microbiol Rev**, v. 38, n. 6, p. 1250-70, Nov 2014.

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **Afr J Biotechnol**, v. 8, n. 7, p. 1280-86, Apr 2009.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **Int J Food Microbiol**, v. 140, n. 2-3, p. 164-8, Jun 2010.

PALMEIRO, J. K et al. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. **J Clin Microbiol** v. 48, n. 12, p. 4397–4403, Dec 2010.

PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, v. 80, n.5, p. 290–296, Jul 2009.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 316-23, Jul 2006.

PHARES, C. R. et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. **JAMA**, v. 299, n. 17, p. 2056-65, May 2008.

Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep**, v. 45, n. RR-7, p. 1-24, May 1996.

RINAUDO, C. D. et al. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9216, 2010.

ROJAS, J. J. et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complement Altern Med**, v. 6, p. 2, 2006.

- RUÍZ, F. O. et al. Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by Lactobacilli Strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. **Curr Microbiol**, v. 64, n. 4, p. 349-56, Apr 2012.
- SALEEM, S. et al. Chlorhexidine vaginal and infant wipes to reduce perinatal mortality and morbidity: a randomized controlled trial. **Obstet Gynecol**, v. 115, n. 6, p. 1225-32, Jun 2010.
- SCHRAG, S. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. **MMWR Recomm Rep**, v. 51, n. RR-11, p. 1-22, Aug 2002.
- SCHRAG, S. J. et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **N Engl J Med**, v. 342, n. 1, p. 15-20, Jan 2000.
- SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 497-513, Jul 1998.
- SCHUCHAT, A. Group B streptococcus. **Lancet**, v. 353, n. 9146, p. 51-6, Jan 1999.
- SHAFREEN, R. M. et al. Biofilm formation by *Streptococcus pyogenes*: modulation of exopolysaccharide by fluoroquinolone derivatives. **J Biosci Bioeng**, v. 112, n. 4, p. 345-50, Oct 2011.
- SKOFF, T. H. et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 1, p. 85-92, Jul 2009.
- SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 2929-36, Sep 2007.
- SOSTO, F.; BENVENUTI, C.; GROUP, C. S. Controlled study on thymol + eugenol vaginal douche versus econazole in vaginal candidiasis and metronidazole in bacterial vaginosis. **Arzneimittelforschung**, v. 61, n. 2, p. 126-31, 2011a.
- TELFORD, J. L. et al. Pili in gram-positive pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 509-19, Jul 2006.
- TIELSCH, J. M. et al. Impact of newborn skin-cleansing with chlorhexidine on neonatal mortality in southern Nepal: a community-based, cluster-randomized trial. **Pediatrics**, v. 119, n. 2, p. e330-40, Feb 2007.
- TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2474-8, Jun 2005.
- TURNER, C. et al. Group B streptococcal carriage, serotype distribution and antibiotic susceptibilities in pregnant women at the time of delivery in a refugee population on the Thai-Myanmar border. **BMC Infect Dis**, vol. 12, p. 34, Feb 2012.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol Int**, v. 55, n. 2, p. 99-105, Jun 2006.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 1561-8, Apr 2002.

UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 761741, 2014.

VELLUTI, A. et al. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. **J Appl Microbiol**, v. 96, n. 4, p. 716-24, 2004.

VERANI, J. R. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. **MMWR Recomm Rep**, v. 59, n. RR-10, p. 1-36, Nov 2010.

VERANI, J. R.; SCHRAG, S. J. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 2, p. 375-92, Jun 2010.

WEISNER, A. M. et al. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 9, p. 1203-8, May 2004.

WOJTYCZKA, R. D. et al. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative *Staphylococcus* strains in vitro. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6583-96, 2014.

WOLSKA, K. I.; GRZEŚ, K.; KUREK, A. Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. **Pol J Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 95-104, 2012.

XU, J. S. et al. The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats. **Exp Ther Med.**, v. 5, n. 6, p. 1667-1670, Jun 2013.

YADAV, M. K. et al. Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. **APMIS**, Apr 2013.