



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Thalita Rodrigues Soares

Formação de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* e bioatividade do cinamaldeído

Rio de Janeiro

2023

Thalita Rodrigues Soares

Formação de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* e bioatividade do cinamaldeído

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Priscila Soares Sabbadini

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S676 Soares, Thalita Rodrigues.
Formação de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* e bioatividade do cinamaldeído / Thalita Rodrigues Soares – 2023.
83 f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio
Coorientadora: Prof^a. Dra. Priscila Soares Sabbadini

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Actinomycetales – Patogenicidade – Teses. 2. Compostos Fitoquímicos – Toxicidade – Teses. 3. Compostos Fitoquímicos – Uso terapêutico – Teses. 4. Anti-Infeciosos – Uso terapêutico – Teses. I. Ignácio, Ana Cláudia de Paula Rosa. II. Sabbadini, Priscila Soares. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.873:615

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thalita Rodrigues Soares

Formação de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* e bioatividade do cinamaldeído

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 22 de maio de 2023.

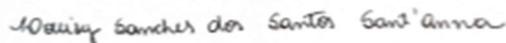
Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Priscila Soares Sabbadini

Universidade CEUMA

Banca Examinadora:



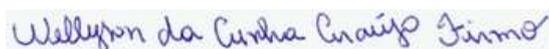
Prof^ª. Dra. Louisy Sanches do Santos Sant'Anna

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ



Prof. Dr. Lincoln de Oliveira Sant'Anna

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ



Prof. Dr. Wellyson da Cunha Araújo Firmo

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

A Deus, minha família e companheiros de laboratório

AGRADECIMENTOS

Como Samer Agi diz “A leveza no caminhar não muda a estrada, muda a caminhada. No fim das contas, as contas fecham, as portas se abrem, a fé aumenta e o medo diminui. Lamentar é uma opção. Agradecer, também”.

Primeiramente, sou grata a Deus, pela força e sabedoria me dada para enfrentar os obstáculos que estiveram no meu caminho. Pela graça de suspirar todas às manhãs e poder realizar minha pesquisa. Por colocar em meu coração uma paixão pela pesquisa desde a graduação. E, claro, por nunca ter me deixado sentir abandonada.

Aos meus pais, Ana Audíneia e Mauro Sérgio, que sempre acreditaram no meu potencial, que me apoiaram e vibraram junto comigo. A minha irmã, Thayanne, que apesar de suas limitações, me inspira buscar crescimento profissional.

Aos meus amigos, em especial, Yasmin Câmara, que esteve presente me auxiliando em uma noite de sexta-feira. Ao meu amigo, Victor Saruk, que sempre acreditou em mim e me falou palavras de afirmação. Ao meu amigo, Luís Afredo, que mesmo em outro estado, mostrou um amor incondicional. A minha amiga, Cândida Campelo, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus companheiros de laboratório e pesquisa, João Nantes, Caio Louran, Michael Ribeiro, Sarah Machado, Gabriel Gomes, Paulo Dyago e Haryne Furtado, pela colaboração, pelo carinho, pelo conhecimento compartilhado, pela companhia em dias úteis e aos sábados e domingos.

Ao meu namorado, Flávio José, que chegou no meio da caminhada, mas sendo fundamental para que se tornasse mais leve. Pelo amor, pelo carinho e por sempre me escutar pacientemente.

Às doutoras, Jéssica Mendes e Márcia Barros, que sempre me auxiliaram durante esse processo.

À minha orientadora, doutora Ana Cláudia, por ter me aceitado como sua orientanda.

Ao doutor Lincoln Sant’Anna, por ser sempre tão solícito, pela atenção e paciência no decorrer desses 2 anos.

À todos os professores do PPG-Micro que somaram com meu conhecimento e amor pela pesquisa durante esses anos, que apesar de conhecê-los, em sua maioria, somente por câmeras, conquistaram minha admiração.

À secretária do PPG-Micro, Carla, por sempre me atender e tirar todas as minhas dúvidas. Pelo cuidado e preocupação demonstrados.

À minha coorientadora, doutora Priscila Sabbadini, que sempre esteve de braços abertos pra me receber, por sua impecável orientação desde a graduação, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Obrigada pelo tempo dedicado e por ter acreditado em mim. Sem você nada disso seria possível. São muitos motivos pra agradecer e admirar.

Ao professor Wellyson Firmo, pela disponibilidade e contribuições nas análises estatísticas.

Ao técnico laboratorial, Marinaldo, que sempre esteve disposto a me ajudar no que eu estava precisando e a todo material cedido.

À FAPEMA pelo apoio financeiro.

À Universidade CEUMA pela colaboração.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Tenha coragem de defender seus sonhos. Porque, se você não abrir a boca, as portas também não se abrirão.

Samer Agi

RESUMO

SOARES, Thalita Rodrigues. **Formação de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* e bioatividade do cinamaldeído.** 2023. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Corinebactérias são bacilos Gram-positivos pleomórficos pertencentes ao microbioma da pele e mucosas, devido a isso o seu potencial patogênico foi negligenciado por muito tempo. Entretanto, casos de infecções em humanos causados por *Corynebacterium* spp. têm sido crescentes, envolvendo quadros infecciosos com infecções respiratórias, conjuntivite, endocardite e infecções do trato urinário. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de virulência de *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum*, a toxicidade do cinamaldeído e suas propriedades antibacterianas. Para avaliar o potencial de virulência, foram utilizadas metodologias de formação de biofilme em superfícies abióticas (poliestireno, cateter de poliuretano e inox); para verificar a toxicidade do cinamaldeído, foram executados o teste *in silico* frente linhagens de células tumorais utilizando a plataforma CLC-Pred, e *in vivo* utilizou-se o microcrustáceo *Artemia salina* e a larva *Tenebrio molitor*. Foram executados também os testes de erradicação de biofilme em superfície de poliestireno e tratamento de infecção induzida por *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* em *T. molitor* utilizando o cinamaldeído. Em relação a capacidade de formação de biofilme, foram observadas em ambas as espécies a positividade dos ensaios para as superfícies de poliestireno e poliuretano, mas não em superfície de inox. O cinamaldeído quando testado *in silico*, mostrou-se um composto seguro para uso, visto que não houve toxicidade frente as linhagens celulares selecionadas. Nos testes *in vivo* realizados, o cinamaldeído não apresentou toxicidade frente as larvas de *T. molitor*, entretanto, foi tóxico para *A. salina*, podendo ter relação com a atividade antimicrobiana dele. O composto foi capaz de erradicar em todas as concentrações testadas, aproximadamente, 90% dos biofilmes pré-formados por *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*. Por fim, verificou-se que o cinamaldeído apresentou atividade protetora frente alguns isolados deste trabalho. Diante do exposto, conclui-se que as espécies de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* apresentam fatores que podem contribuir para o estabelecimento e disseminação de infecções e o cinamaldeído apresentou características eficazes para o tratamento de infecções causadas pelas espécies estudadas, mas estudos complementares são necessários.

Palavras-chave: Corinebactérias. Composto Fitoquímico. Antimicrobiana. Toxicidade.

ABSTRACT

SOARES, Thalita Rodrigues. *Biofilm formation on abiotic surfaces by Corynebacterium guaraldiae and Corynebacterium aurimucosum and cinnamaldehyde bioactivity*. 2023. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Corynebacteria are Gram-positive pleomorphic bacilli belonging to the microbiome of the skin and mucous membranes, due to which their pathogenic potential has been neglected for a long time. However, cases of hospitalization in humans caused by *Corynebacterium* spp. have been increasing, involving infectious conditions with respiratory breathing, conjunctivitis, endocarditis, and evacuation of the respiratory tract. The aim of the present study was to evaluate the virulence potential of *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum*, the toxicity of cinnamaldehyde, and its antibacterial properties. To assess the virulence potential, biofilm formation methods were used on abiotic surfaces (polystyrene, polyurethane catheter, and stainless steel); to verify the toxicity of cinnamaldehyde, the *in-silico* test was performed against tumor cell lines using the CLC-PRed platform, and *in vivo* using the microcustaceous *Artemia salina* and the larvae *Tenebrio molitor*. Biofilm eradication tests on polystyrene surface and treatment of infection induced by *C. guaraldiae* and *C. aurimucosum* in *T. molitor* using cinnamaldehyde were also performed. Regarding the ability to form a biofilm, positive tests were observed in both species for polystyrene and polyurethane surfaces, but not for stainless steel surfaces. Cinnamaldehyde, when tested *in-silico*, proved to be a safe compound for use, since there was no toxicity against the selected cell lines. In live tests carried out, cinnamaldehyde did not show toxicity to *T. molitor* larvae, on the other hand, it was toxic to *A. salina*, which may be related to its antimicrobial activity. The compound was able to eradicate, at all sample concentrations, approximately 90% of preformed biofilms by *C. guaraldiae* and *C. aurimucosum*. Finally, it was possible to verify that cinnamaldehyde showed protective activity against some samples of the corynebacteria used. Given the above, it is concluded that the species of *C. guaraldiae* and *C. aurimucosum* presented factors that may contribute to the establishment and dissemination of transmission, and cinnamaldehyde presented effective characteristics for the treatment of transmission caused by the cited species. Further studies are needed.

Keywords: Corynebacteria. Phytochemical Compost. Antimicrobial. Toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas do desenvolvimento do biofilme	25
Figura 2 -	Formação de biofilme por <i>Corynebacterium guaraldiae</i> e <i>Corynebacterium aurimucosum</i> após 48h de incubação em superfície hidrofóbica de cateter poliuretano, utilizando-se método quantitativo (A) e semiquantitativo (B)	44
Figura 3 -	Formação de biofilme por <i>Corynebacterium guaraldiae</i> e <i>Corynebacterium aurimucosum</i> após 48h de incubação em superfície hidrofílica de inox, utilizando-se métodos quantitativo (A) e semiquantitativo (B)	45
Figura 4 -	Avaliação da atividade hemolítica do cinamaldeído em Ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5%	47
Figura 5 -	Atividade hemolítica do cinamaldeído em comparação ao Triton-X 100 a 1% em hemácias humanas (sangue O+)	47
Figura 6 -	Percentual de microcrustáceos de <i>Artemia salina</i> mortas em relação as concentrações do cinamaldeído	48
Figura 7 -	Porcentagem de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após a injeção do cinamaldeído em sua porção ventral	49
Figura 8 -	Fotomicrografias de células de <i>Corynebacterium guaraldiae</i> 2299 coradas pelo método de coloração de Gram após exposição a sub CIM do cinamaldeído	51
Figura 9 -	Erradicação de biofilme pré-formado por 24h de <i>Corynebacterium guaraldiae</i> e <i>Corynebacterium aurimucosum</i> em placas de 96 poços de poliestireno pelo cinamaldeído	52
Figura 10-	Percentual de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> tratadas com cinamaldeído após 2 horas de infecção com <i>Corynebacterium guaraldiae</i> e <i>Corynebacterium aurimucosum</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aspectos clínicos das amostras utilizadas	35
Tabela 2 -	Avaliação da formação de biofilme por <i>Corynebacterium guaraldiae</i> e <i>Corynebacterium aurimucosum</i> em superfície hidrofóbica de poliestireno	43
Tabela 3 -	Predição da citotoxicidade do cinamaldeído frente linhagens celulares tumorais e não tumorais	46
Tabela 4 -	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do composto cinamaldeído frente isolados de <i>Corynebacterium guaraldiae</i> e <i>Corynebacterium aurimucosum</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARGs	Genes de resistência antimicrobiana
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CL50	Concentração letal para matar 50%
CN	Cinamaldeído
DO	Densidade óptica
DOc	Densidade óptica do controle
DL50	Dose letal para matar 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	DNA extracelular
EC50	Concentração efetiva para hemolisar 50% das hemácias
EPS	Exopolissacarídeo
FN	Fator nuclear
h	Hora
HEp-2	Células epiteliais da faringe humana
ITU	Infecção do trato urinário
LAM	Lipoarabinomananas
LM	Lipomananos
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MDR	Multi-droga resistente
MEC	Matriz extracelular
MSCRAMMs	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Micro litro
NI	Não informado
OE	Óleo essencial

Pa	Potencial de ativação
PBS	Phosphate buffered-saline
PGE2	Prostaglandinas E2
pH	Potencial hidrogênionico
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde
rRNA	Ribossomal RNA
subCIM	Concentração subinibitória
TD	Tóxina diftérica
TSB	<i>Trypase Soy Broth</i>
TSA	<i>Trypase Soy Agar</i>
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por microlitro
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda
-	Não aderentes
\leq	Menor que ou igual
<	Menor que
++	Moderadamente aderentes
+++	Fortemente aderentes
\geq	Maior que ou igual
>	Maior que
=	Igual
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Gênero <i>Corynebacterium</i>	19
1.1.1	<u>Perfil de resistência de <i>Corynebacterium spp</i></u>	20
1.2	Mecanismos de virulência das corinebactérias	21
1.2.1	<u>Toxina diftérica</u>	21
1.2.2	<u>Propriedades adesivas</u>	22
1.3	Biofilme	23
1.4	Plantas medicinais e sua terapêutica	26
1.4.1	<u>Cinamaldeído</u>	27
1.5	Métodos alternativos para teste de toxicidade	28
1.5.1	<u>Testes <i>in sílico</i></u>	29
1.5.2	<u>Hemólise</u>	30
1.5.3	<u><i>Artemia salina</i></u>	31
1.5.4	<u><i>Tenebrio molitor</i></u>	31
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Origem e cultivo das amostras	35
3.2	Avaliação da formação de biofilme em superfícies abióticas	36
3.2.1	<u>Formação de biofilme em superfícies hidrofóbicas (poliestireno e cateter de poliuretano)</u>	36
3.2.2	<u>Formação de biofilme em superfície hidrofílica do inox</u>	37
3.3	Análise da toxicidade do cinamaldeído	37
3.3.1	<u>Predição de citotoxicidade</u>	37
3.3.2	<u>Avaliação da atividade hemolítica do cinamaldeído</u>	38
3.3.3	<u>Potencial citotóxico do CN contra <i>Artemia salina</i></u>	39
3.3.4	<u>Toxicidade do CN em larvas <i>Tenebrio molitor</i></u>	39
3.4	Avaliação da atividade antibacteriana do cinamaldeído	40
3.4.1	<u>Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do cinamaldeído</u>	40

3.4.2	<u>Indução de alterações morfológicas pelo cinamaldeído</u>	40
3.4.3	<u>Erradicação de biofilme pré-formado pelo cinamaldeído</u>	41
3.5	Efeito do cinamaldeído sobre processo infeccioso induzido em <i>Tenebrio molitor</i>	41
3.6	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas	43
4.1.1	<u>Caracterização da formação de biofilme na superfície de poliestireno</u>	43
4.1.2	<u>Produção quantitativa e semiquantitativa de biofilme em cateter de poliuretano e em inox</u>	43
4.2	Toxicidade do cinamaldeído	45
4.2.1	<u>Predição <i>in silico</i></u>	45
4.2.2	<u>Análise <i>in vitro</i> da atividade hemolítica</u>	46
4.2.3	<u>Avaliação <i>in vivo</i> contra <i>Artemia salina</i> e <i>Tenebrio molitor</i></u>	48
4.3	Avaliação da atividade antibacteriana do cinamaldeído	49
4.3.1	<u>Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do cinamaldeído</u>	49
4.3.2	<u>Avaliação das alterações morfológicas bacterianas e mudança nos padrões de agregação</u>	50
4.3.3	<u>Análise do potencial antibiofilme</u>	51
4.4	Efeito do cinamaldeído sobre processo infeccioso induzido em <i>Tenebrio molitor</i>	53
5	DISCUSSÃO	56
	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

INTRODUÇÃO

Lehmann e Neumann descreveram o gênero *Corynebacterium* em 1896, sendo a espécie tipo *Corynebacterium diphtheriae*, pertencente a ordem *Corynebacteriales* e a família *Corynebacteriaceae*, espécies deste gênero são caracterizadas como bacilos Gram-positivos irregulares, além disso, são aeróbios ou anaeróbios facultativos, imóveis, não formadores de esporos, possuindo um alto conteúdo de guanina e citosina em seu DNA (GHERARDI *et al.*, 2015; CRESCI *et al.*, 2016). Há também a presença em sua estrutura de uma micomembrana composta por ácido micólico que envolve a parede celular bacteriana da maioria das espécies de *Corynebacterium*, funcionalmente semelhante a membrana externa das bactérias Gram-negativas (BURKOVSKI, 2014).

A patologia causada por esse gênero depende da espécie envolvida, tendo como principais notificações em respiratório inferior e trato urinário, sítios intravenosos (cateter e sangue), líquido, líquido peritoneal, feridas cirúrgicas, além de lesões cutâneas, abscessos e secreção ocular. Todavia, a patogenicidade desses microrganismos permanece subestimado pelos profissionais de saúde e considerado em laboratórios clínicos como meros contaminantes (MARTINS *et al.*, 2009; BERNARD, FUNKE, 2015; KALT *et al.*, 2018; SHARIFF, ADITI, BERI, 2018; KATES, STARR, BOURASSA, 2020; SANCHEZ ELUCHANS *et al.*, 2021).

Como fator de virulência das corinebactérias, já foram descritas a presença da toxina diftérica (TD), e uma variedade de adesinas e lipoglicanos que acarretam no favorecimento da adesão na interação com o hospedeiro. Além disso, o biofilme pode ser um mecanismo de virulência que algumas corinebactérias podem apresentar, e que desempenha importante papel na colonização de superfície de materiais invasivos (por exemplo, cateter urinário), na pouca eficiência da resposta imune do hospedeiro, assim como na redução da eficácia do tratamento com antimicrobianos (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Yassin e colaboradores (2002) descreveram pela primeira vez a espécie de *Corynebacterium aurimucosum*, oriunda de uma amostra de hemocultura de um quadro de bronquite. Ademais, *C. aurimucosum* foi relatado na literatura em quadros de bacteremia, aborto espontâneo, infecção do trato urinário frequente, infecção pós-cirúrgica do trato urinário, infecções em pé diabético, afecções da pele, entre outros (BERNARD, 2012; ESKANDAR *et al.*, 2020; LO *et al.*, 2015; TROST *et al.*, 2010).

Em contrapartida, *Corynebacterium guaraldiae* é uma nova espécie que foi isolada de cisto sebáceo, descrita em 2023. São Gram-positivas, aeróbias, não álcool ácido resistente, não formadora de esporos e imóveis, apresentam colônias cremosas, viscosas, redondas, lisas e de tamanho médio. São positivas para catalase e pirazinamidase e negativas para nitrato, urease, esculina e oxidase. A capacidade de fermentação de carboidratos foi observada a partir de glicose e maltose, mas não para lactose, manitol, ribose, xilose e glicogênio. A maioria dos isolados apresentaram capacidade de fermentar a sacarose (SANT'ANNA *et al.*, 2023).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos é um dos fatores ligados ao aumento do perfil de resistência a antibióticos, levando a necessidade de pesquisas voltadas para novos fármacos eficazes e seguros (KHARE, NARAYANA, 2017; SABINO *et al.*, 2019). Devido algumas espécies de *Corynebacterium* serem consideradas como contaminantes na prática clínica e não patogênicas, o seu perfil de susceptibilidade é pouco estudado quando comparado a outras espécies de bacilos Gram-positivos (BERNARD, FUNKE, 2015).

O aparecimento de cepas multidroga-resistentes (MDR) de espécies do gênero *Corynebacterium* dificulta o sucesso do tratamento com antimicrobianos em alguns processos infecciosos (OLENDER, 2013). A susceptibilidade das espécies do gênero é variável, pois em um estudo de Fernandez-Roblas e colaboradores (2009) apresentou espécies sensíveis a linezolida, daptomicina, mas com resistência à eritromicina, claritromicina, azitromicina, clindamicina e rifampicina. Em outro estudo, mostrou-se resistente à penicilina (LEAL, JONES, GILLIGAN, 2016). Em contrapartida, Lo e colaboradores (2015) descreveram sensibilidade à eritromicina, lincomicina, vancomicina, cefalotina, imipenem, tetraciclina, ciprofloxacina e cloranfenicol, e resistência à penicilina e ao sulfametoaxol com trimetoprima.

Consequentemente, o descontentamento com a eficácia dos tratamentos e o custo da medicina moderna, somado à boa aceitação de compostos naturais, tem levado cada vez mais a se buscar terapias associadas aos produtos naturais, como drogas vegetais e fitoterápicas (QUINTANS *et al.*, 2013).

O principal composto ativo do óleo essencial (OE) da casca do caule de *Cinnamomum cassia* (popularmente conhecida como canela-aromática ou canela chinesa), o cinamaldeído (CN), tem sido amplamente utilizado para fins medicinais, incluindo o uso como anti-inflamatório, antiemético e analgésico (MIHARA & SHIBAMOTO, 2015). O CN é o principal constituinte do óleo essencial de canela, e é reconhecido como seguro e aprovado na indústria de alimentos (ROGIERS *et al.*, 2017). Além disso, possui propriedades importantes como a atividade antibacteriana a vários microorganismos, tais como *Staphylococcus aureus* (FERRO

et al., 2016), *Enterococcus faecalis* (CHANG *et al.*, 2001) e *Pseudomonas aeruginosa* (UTCHARIYAKIA *et al.*, 2016; FRIEDMAN, 2017; ALBANO *et al.*, 2019). Entretanto, ainda não foram descritos o efeito do CN frente *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Gênero *Corynebacterium*

Corinebactérias são bactérias que tendem a ser claviformes quando cultivadas em meio artificial/sintético e observadas em microscópio. Além disso, não formam esporos, não possuem flagelos ou cápsulas. Dependendo das condições de cultivo e do tempo de exposição, também podem ser observadas na forma de cocobacilos. Seu crescimento ocorre em aerobiose em 48 horas à 37 °C e podem se apresentar como colônias ligeiramente secas, brancas, opacas e lisas (BERNARD, FUNKE, 2012).

Atualmente, 143 espécies compõe o gênero de *Corynebacterium* (PARTE et al., 2020), podendo ser encontradas em diferentes nichos biológicos como, por exemplo, amostras clínicas humanas, materiais sintéticos, solo, água, alimentos (JAÉN-LUCHORO et al., 2020). Além disso, já foram isolados em diversos locais de infecção, sendo os mais importantes o trato urinário e respiratório, sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido peritoneal, feridas cirúrgicas, além de lesões cutâneas, ossos, abscessos e secreção ocular (CAMELLO et al., 2003; MARTINS et al., 2009; FUNKE; BERNARD, 2011; PEIXOTO et al., 2016).

A espécie mais conhecida do gênero, é *Corynebacterium diphtheriae*, o principal agente etiológico da difteria. A difteria consiste numa doença de evolução aguda, que apresenta uma significativa causa de mortalidade e letalidade no mundo inteiro (JANDA, 1998; CERDEÑO TÁRRAGA et al., 2003; TROST et al., 2012; ZASADA, 2018). Os sintomas da difteria são fraqueza, prostração, dificuldade de deglutição, aumento das tonsilas, presença de placas esbranquiçadas ou amarelo-acinzentadas, o que pode levar a dificuldade de respiração (TSINZERLING et al., 1980; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Apesar do programa de vacinação contra a difteria ser desde a década de 40, essa doença, que era uma das mais comuns e temidas antes da era da vacinação, continua sendo um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda ocorrem epidemias em vários países em desenvolvimento e industrializados, e a difteria é endêmica em várias partes do mundo, principalmente em países em desenvolvimento, como Índia, Vietnã e Caribe (BRASIL, 2019).

A diferenciação entre espécies do gênero *Corynebacterium* pode ser feita através do polimorfismo das bandas de restrição do gene do 16S rRNA, ou pelo gene *rpoB* (VANEECHOUTT *et al.*, 1995; KHAMIS *et al.*, 2003). Também pode ser utilizado o sistema de identificação semiautomatizado API® Coryne, que emprega a identificação com 90,5% de fidelidade (KONRAD *et al.*, 2010). A técnica de identificação molecular *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF, em português, Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo) é a mais utilizada, visto que este possui baixo custo e rapidez. A identificação por MALDI-TOF é baseada na composição proteica das células microbianas (KONRAD *et al.*, 2010; ALIBI *et al.*, 2015).

1.1.1 Perfil de resistência de *Corynebacterium* spp.

Soriano, Zapartiel e Nieto (1995) descreveram que a resistência de cepas de *Corynebacterium* são imprevisíveis, sendo de suma importância a realização da determinação de sua susceptibilidade para o sucesso terapêutico. Inicialmente, a terapia empírica utilizada para infecções com bactérias Gram-positivas é realizada com vancomicina associada a rifampicina.

Estudos mostram que a resistência das espécies de *Corynebacterium* a diferentes compostos químicos está relacionado aos elementos genéticos extracromossômicos envolvidos na transmissão da resistência para cepas patogênicas e potencialmente patogênicas (ADDERSON *et al.*, 2008; FERNANDEZ-ROBLAS *et al.*, 2009).

Goldner e colaboradores (2018) relataram que a resistência às fluoroquinolonas e daptomicina ocorre pelo mecanismo interno envolvido em mutações pontuais nos genes *gyrA* e *pgsA2*, respectivamente. De modo diferente, a presença de plasmídeos em *Corynebacterium* spp. é rara, mas possuem relação com os antimicrobial resistance genes (ARGs, em português, genes de resistência antimicrobiana) (TAUCH *et al.*, 2003; SCHRÖDER *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017)

Estudos já relataram vários ARGs associados a elementos genéticos móveis em corinebactérias, incluindo plasmídeos, integrons, sequências de inserção e transposons (NEŠVERA; HOCHMANNOVÁ; PÁTEK, 1998; TAUCH *et al.*, 2003; OLENDER *et al.*, 2012; HENNART *et al.*, 2020). Por exemplo, em *Corynebacterium striatum* um grupo de genes

estão associados à resistência aos antimicrobianos, chamado de resistoma e apresentam elementos cromossômicos e adquiridos, determinados principalmente por transposons, sequências de inserção e plasmídeos. Essa espécie apresenta resistência às fluoroquinolonas e daptomicina em decorrência de mutações em genes cromossômicos. Os elementos genômicos moveis como plasmídeos e transposon de *C. striatum* conferem resistência a eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e penicilina (LEYTON *et al.*, 2021).

O fenótipo frequentemente encontrado em estafilococos coagulase negativa de resistência simultânea a macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas está ligada ao gene *erm* (*X*) (TAUCH *et al.*, 2000; SZEMRAJ, KWASZEWSKA, SZEWCZYK, 2018; SZEMRAJ *et al.*, 2019). No entanto, foi observado em corinebactérias de importância clínica, como *C. diphtheriae*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium urealyticum* e *Corynebacterium striatum* (ROSATO; LEE; NASH, 2001; GUIRAO *et al.*, 2005; OLENDER, NIEMCEWICZ, 2010; LEYTON *et al.*, 2021).

1.2 Mecanismos de virulência das corinebactérias

1.2.1 Toxina diftérica

Os fatores de virulência são componentes essenciais para uma colonização bem-sucedida de uma bactéria patogênica (TAUCH, BURKOVSKI, 2015). A toxina diftérica (TD) é o fator de virulência mais bem estudado do gênero *Corynebacterium* e é codificado pelo gene da toxina, conhecido como gene *tox*, um polipeptídeo de aproximadamente 58 kDa com 535 resíduos de aminoácidos encontrado em bacteriófagos, os corinefagos. É formado por dois fragmentos, A e B, sendo capaz de promover rearranjos do citoesqueleto e inibir a síntese proteica, causando lise celular e fragmentação do DNA nuclear, ocasionando apoptose e necrose celular devido possuir tropismo pelo miocárdio, rins, sistema nervoso e glândulas suprarrenais (WONG, GROMAN, 1984; HADFIELD, 2000; SANTOS *et al.*, 2010).

A integração de corinefagos no genoma bacteriano é capaz de promover a transformação de cepas não toxigênicas em cepas toxigênicas, tal alteração já foi descrita em humanos (ZAKIKHANY, NEAL, EFSTRATIOU, 2014).

O complexo *C. diphtheriae* são espécies descritas como potenciais produtoras da TD e é formado atualmente por 6 espécies, sendo estas: *C. diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii* e *Corynebacterium silvaticum* (HOLMES, 2000; BERNARD; FUNKE, 2015; DAZAS *et al.*, 2018; BADELL *et al.*, 2020; DANGEL *et al.*, 2020).

Somado a atenção sob as espécies potencialmente produtoras de TD, a comunidade científica e profissionais de saúde notaram que havia outros processos infecciosos principalmente devido a amostras não produtoras de TD. Essas amostras podem ser encontradas no microbioma de seres humanos atuando como agentes oportunistas e já foram descritas como agentes causadores de infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite, meningite, entre outras. Dentre estes, destacam-se *Corynebacterium afermentans*, *C. amycolatum*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium macginleyi*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *Corynebacterium xerosis* (MORRIS, GUILD 1991; MUNIAN *et al.*, 1997; WANG, MATTSON, WALD, 2001; DOBLER, BRAVENY, 2002; CAMELLO *et al.*, 2003; ORDÓÑEZ-PALAU, BOQUET, 2007; PRETE *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ-NATAL *et al.*, 2008; MARULL, CASARES, 2008; BAIO *et al.*, 2013; GHERARDI *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2019).

1.2.2 Propriedades adesivas

Existem várias adesinas e proteínas na superfície dos microrganismos que mediam a ligação do receptor e promovem a colonização da superfície. Para bactérias patogênicas, essas adesinas são essenciais nos estágios iniciais da infecção, ou seja, permite o contato com as células hospedeiras e a colonização de vários tecidos (KLINE *et al.*, 2009).

Devido o aparecimento de infecções por *C. diphtheriae* em pessoas que já foram imunizadas e infecções crescentes causadas por amostras não produtoras de TD, indicam que existem outros fatores de virulência relacionados ao processo infeccioso. Dessa forma, diversos

estudos apontam a capacidade de *Corynebacterium* spp. de aderir em diferentes substratos médicos e células humanas com intensidade variada. Além disso, presença de adesinas fimbriais (MANDLIK *et al.*, 2008; BRODWAY *et al.*, 2013) e não fimbriais (SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015; SANGAL *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2017), a capacidade de interagir com proteína de matriz extracelular (MEC) (ANTUNES *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2017) e o fibrinogênio plasmático (SABBADINI *et al.*, 2010) parecem contribuir para o processo de colonização, manutenção da infecção e disseminação nos tecidos do hospedeiro (MATTOS-GUARALDI, DUARTE FORMIGA, PEREIRA, 2000; BERTUCCINI, BALDASSARRI, VON HUNOLSTEIN, 2004; HIRATA *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2009; ANTUNES *et al.*, 2015).

As corinebactérias possuem uma ampla variedade lipoglicanos como lipoarabinomananas (LAM) e lipomananos (LM), que estão relacionadas com a aderência do microrganismo (BRENNAN, NIKAID, 1995). Por exemplo, isolados de *C. diphtheriae* causadores de endocardite demonstraram exibir padrões de adesão em células epiteliais da faringe humana (HEp-2), devido uma nova variante de LAM mediada por lipoglicano chamada CdiLAM (HIRATA JR *et al.*, 2008; MOREIRA, MATTOS-GUARALDI, ANDRADE, 2008). *C. diphtheriae* também possui uma proteína associada à superfície, a DIP1281 que parece participar da organização da camada proteica externa (OTT *et al.*, 2010).

A capacidade de *C. diphtheriae* interagir e migrar através de barreiras epiteliais e endoteliais também tem sido observada (HIRATA JR *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2014). A adesina não fimbrial DIP0733 (67-72p) corroborou com a invasão de células epiteliais e induziu a apoptose (HIRATA JR *et al.*, 2008; SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015). Amostras de *C. diphtheriae* independentes da produção da TD apresentaram estratégias de sobrevivência em macrófagos humanos (linhagem U-937) e indução de morte celular por apoptose e necrose (SANTOS *et al.*, 2010).

1.3 Biofilme

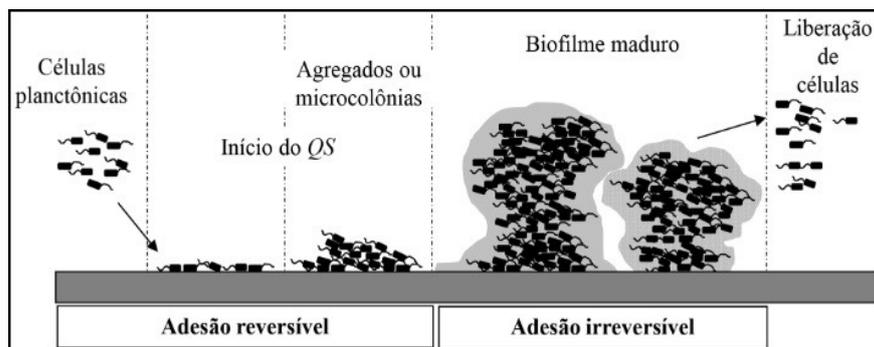
Biofilme é um aglomerado de multicamadas de células embebidas em uma matriz polissacarídica extracelular, consistindo em substâncias poliméricas como polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e proteínas, que podem variar dependendo das condições ambientais

e diferentes espécies bacterianas. Estima-se que 80% das infecções microbianas estão relacionadas à capacidade dos microrganismos de produzir um biofilme, o que reflete diretamente nos custos globais de saúde, necessitando de um foco em novas estratégias potenciais de tratamento (CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019; GRAF *et al.*, 2019). Os biofilmes desempenham um papel importante nas infecções associadas a dispositivos médicos, como aparelhos circulatórios, cateteres urinários, lentes de contato, implantes ortopédicos e cardíacos, onde é formada uma matriz de bactérias e biopolímeros extracelulares. Podem ocorrer tanto em superfícies bióticas quanto abióticas e são extremamente difíceis de erradicar, pois as bactérias dentro do biofilme são protegidas tanto do sistema imunológico do paciente quanto do tratamento antimicrobiano (AL-HAQAN *et al.*, 2020; MICHALIK *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021).

A formação de um biofilme significa uma transição de um modo de vida planctônico para sésil, preso à superfície. A colonização começa com a adesão reversível, que pode ou não se tornar irreversível. Esse primeiro contato com a superfície é instável e ocorre devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas. (KOSTAKIOTI *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do biofilme ocorre em três estágios: (a) fixação, (b) crescimento e formação de um biofilme maduro e (c) desprendimento e dispersão, que envolvem fatores proteicos e não proteicos e desempenham um papel importante na integridade e estruturação do biofilme (Figura 1). Durante a fixação, as proteínas associadas à superfície chamadas *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs, em português, componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva) formam interações não covalentes com a superfície dos dispositivos e tecidos do hospedeiro e se ligam ao fibrinogênio, fibronectina e colágeno, que desempenham um papel importante na adesão. Após essa fixação, o biofilme se multiplica e amadurece, resultando na formação de uma matriz extracelular constituída pelo exopolissacarídeo (EPS) que forma o biofilme. Além disso, ocorre a produção de ácidos teicóicos, proteínas e DNA, e durante esta segunda parte são formados canais e estruturas "semelhantes a cogumelos", que facilitam o transporte de nutrientes para as camadas mais profundas do biofilme. Na etapa final, a massa de biofilme se espalha para locais distais devido a surfactantes como peptídeos de modulina solúvel em fenol (LE, PARK, OTTO, 2018; KOT, SYTYKIEWICZ, SPRAWKA, 2018; GRAF *et al.*, 2019; JASINSKA *et al.*, 2021).

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento do biofilme



Fonte: Trentin, Giordani, Macedo (2013).

É considerado um grave problema quando há a formação de biofilme em implantes de materiais artificiais, podendo levar a infecções. Isso pode ocorrer em dispositivos médicos que estão em contato direto com o sangue. Sua ocorrência, quando relacionada a pacientes submetidos a bioimplantes, que são dispositivos de origem natural ou sintética que interagem com sistemas biológicos, tem aumentado de maneira significativa, tornando-se preocupante, pois o processo de adesão bacteriana influencia diretamente na morbimortalidade de pacientes e custos envolvidos (MORAES *et al.*, 2013; SUED-KARAM *et al.*, 2022).

A organização do biofilme protege os microrganismos da fagocitose e da ativação do sistema complemento. Além disso, a secreção de anticorpos opsonizantes e a produção de peróxido de hidrogênio são ineficazes, uma vez que não conseguem penetrar no biofilme devido à presença do EPS, que evita a passagem e a ação destas moléculas (COSTERTON *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 2000; ZIMMERLI *et al.*, 2004; FUX *et al.*, 2005; SMITH, 2005).

Uma maior resistência antimicrobiana dos microrganismos em biofilmes pode ser explicada pelo fato de que bactérias estão cercadas pelo EPS, que possui uma arquitetura geralmente estável e fisicamente pode restringir a penetração e a difusão de agentes antimicrobianos, impedindo que se atinja a concentração adequada nos tecidos do hospedeiro e no ambiente intracelular. Outra possibilidade seria que, por ser de natureza aniônica, o EPS reagiria com os antimicrobianos, podendo inclusive adsorvê-los (PATEL, 2005; SMITH, 2005).

Espécies de *Corynebacterium* já demonstraram a capacidade de produzir biofilmes em superfícies abióticas, conferindo vantagens a esses microrganismos (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, 1991; KWASZEWSKA *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2013; FROLOVA, KHARSEYEVA, MIRONOV, 2014; SOUZA *et al.*, 2015; LEAL *et al.*, 2016; QIN *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2018;). As propriedades infecciosas de *C. diphtheriae* já foram estudadas e

aspectos como produção de biofilme, propriedades hidrofóbicas e hemaglutinantes foram descritos (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 1999; SABBADINI *et al.*, 2012), foi relatado a capacidade de *C. diphtheriae* em produzir biofilme em diversas superfícies sólidas inertes, incluindo cateteres (MANDLIK *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2009). Essa produção de biofilme promoveu a sobrevivência do microorganismo na presença dos antimicrobianos como penicilina e a eritromicina (GOMES *et al.*, 2013).

A remoção de biofilmes estabelecidos é mais difícil, além da proteção conferida pelo EPS, observou-se grande heterogeneidade fenotípica onde populações celulares expressam diferentes resistências, sendo necessário o uso de agentes combinatórios que desestruturam a estrutura dos EPS e facilitam a entrada de desinfetantes para matar microorganismos ou indutores de lise de células do biofilme (STEWART, FRANKLIN, 2008).

1.4 Plantas medicinais e sua terapêutica

O uso indevido e excessivo de antimicrobianos contra doenças causadas por bactérias é um fator importante no rápido surgimento e disseminação de isolados resistentes. Portanto, novos agentes antimicrobianos eficazes e seguros são necessários, e as plantas medicinais e seus compostos aparecem como uma fonte promissora com propriedades antibacterianas que podem ajudar no tratamento dessas infecções (MAMATOVA *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2019). Além da resistência aos compostos farmacêuticos, é preocupante a toxicidade que alguns deles causam ao homem, aos animais e ao próprio meio ambiente (MACHADO, JUNIOR, 2011).

Christo e colaboradores (2010) afirmaram que a utilização de plantas como terapêutica vem desde os primórdios, mesmo sem o conhecimento dos benefícios e malefícios que isso poderia causar. No Antigo Testamento, aproximadamente 1500 anos antes de Cristo, a planta mandrágora já era utilizada como analgésico para aliviar fortes dores.

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), criada pelo Ministério de Saúde lista 71 espécies de flora com potencial terapêutico para doenças existentes no Brasil. Junto a esse órgão, o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira traz informações adicionais sobre as plantas listadas, auxiliando no uso correto e possíveis efeitos adversos (ANVISA, 2010).

Já foram relatadas as atividades antibacterianas e antifúngicas de extratos de plantas, OEs e compostos isolados como alcaloides, polifenóis, taninos e terpenos. Os metabolitos secundários têm propriedades antibacterianas e antifúngicas através dos seguintes mecanismos: taninos através da inibição enzimática, depuração do substrato, ruptura da membrana e complexação de íons metálicos; terpenos e óleos essenciais causam o rompimento da membrana e alcaloides se alternam na parede celular bacteriana (SUBRAMANI *et al.*, 2017; MENEZES FILHO *et al.*, 2020a; MENEZES FILHO *et al.*, 2020b).

Vários métodos estão disponíveis na literatura para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e OEs e seus compostos, incluindo testes de triagem (qualitativos) e testes quantitativos que determinam, por exemplo, a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (AMPARO *et al.*, 2018).

1.4.1 Cinamaldeído

O óleo essencial (OE) obtido das folhas e casca de *C. cassia* é um dos mais eficazes na prevenção do crescimento microbiano (DOYLE, STEPHENS, 2019). Encontrada como um líquido oleoso amarelo com cheiro de canela e sabor doce (SIMÕES *et al.*, 2016), seus principais componentes são o CN, um fenilpropanoide derivado do ácido ciclâmico (SILVA *et al.*, 2018), eugenol, fenol e linalol. Sua casca possui baixo teor de eugenol (5-10 %) e CN (ou ácido cinâmico) superior (65-80 %) (YANAKIEV, 2020). Conforme observado na literatura, o aldeído cinâmico e seus derivados sintéticos possuem efeitos termogênico, antitumoral, cardioprotetor, anti-inflamatório, antimicrobiano e antibiofilme (LEE *et al.*, 2017; DOYLE, STEPHENS, 2019). Suas propriedades químicas permitem que ele atue como um composto oralmente ativo e possa ser usado como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos (SHREAZ *et al.*, 2016).

Guo e colaboradores (2006) evidenciaram que o CN é inibidor do fator nuclear, que é um fator de transcrição que tem como finalidade regular a expressão de genes inflamatórios e imunológicos. Liao e colaboradores (2012) descreveram que este composto aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase e glutationala peroxidase.

Firmino e colaboradores (2018) verificou que o CN inibiu a formação de biofilme de bactérias Gram-negativas em fragmentos de cateter urinário, em todas as concentrações. Além

disso, foram descritos seus efeitos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus* (FERRO *et al.*, 2015) *Enterococcus faecalis* (CHANG *et al.*, 2001) *Pseudomonas aeruginosa* (UTCHARIYAKIA *et al.*, 2016), *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (HELANDER *et al.*, 1998). Essa ampla atividade antimicrobiana está ligada com a presença de terpenóides ou fenólicos em sua composição (RIEGER, SCHIFFMAN, 2014).

1.5 Métodos alternativos para teste de toxicidade

Em 2014 foi implementada a Portaria Normativa de número 18 do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, determinando que as instituições de pesquisas que utilizavam animais teriam o prazo máximo de 5 anos para substituir essas metodologias por metodologias alternativas, quando possível, sendo essas válidas e reconhecidas internacionalmente (AZEVEDO *et al.*, 2015). A metodologia *in vitro* apresenta vantagens como: baixo custo, menor tempo de duração e obtenção de resultados fidedignos (MIRANDA, 2007). Ensaios de citotoxicidade compõe os testes alternativos, na qual tem como objetivo avaliar os efeitos sobre funções celulares basais, além de serem utilizados para considerar um produto seguro (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Além do potencial terapêutico das plantas, outro fator muito importante é o perfil de toxicidade de algumas espécies, ainda pouco conhecido. A fácil disponibilidade e aplicabilidade de produtos fitoterápicos comercializados coloca os usuários em risco de complicações desconhecidas, como possíveis interações medicamentosas e intoxicações, que podem levar a sérios problemas de saúde (LIMA *et al.*, 2006; FRENZEL, TESCHKE, 2016). Os fatores que afetam a toxicidade estão relacionados à estrutura química da molécula, à dose utilizada e à via de administração (CAMPOS *et al.*, 2016). Portanto, estudos com diferentes modelos de pesquisa para avaliar a toxicidade de novos produtos para fins terapêuticos são essenciais para sustentar a hipótese de pesquisa, com o objetivo de avaliar segurança e eficácia com base em ensaios clínicos randomizados controlados em humanos (SISON-YOUNG *et al.*, 2017).

Os testes com métodos alternativos substituem ou reduzem completamente o número de sujeitos de teste usados nos experimentos, ou mesmo refinam os experimentos, isso significa que medidas cuidadosas são tomadas para reduzir o sofrimento ou o estresse dos animais

utilizados (RANGANATHA, KUPPAST, 2012). Um método alternativo pode ser outro experimento *in vivo* em que uma quantidade menor de animais são consumidos ou são menos prejudicados. Por exemplo, primatas podem ser substituídos por vertebrados "inferiores", estágios larvais podem substituir adultos ou microrganismos podem ser usados (GRUBER, HARTUNG, 2004; CUTULI *et al.*, 2019).

Quando falam-se de método alternativo validado, significa que se trata de um teste que passou por um processo de validação com base em critérios estabelecidos. A validação inclui etapas de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão, além de garantir a reprodutibilidade e relevância do teste e geralmente requer pesquisa interlaboratorial colaborativa (GRUBER, HARTUNG, 2004).

As vantagens adicionais dos métodos alternativos são que eles são mais rápidos, menos laboriosos e mais econômicos (DOKE, DHAWAL, 2013). Também é possível que nenhum material biológico seja usado. No entanto, existem simulações e modelos computacionais (*in silico*) que permitem prever as propriedades e efeitos dos compostos por meio do acesso a banco de dados (BALLS, COMBES, WORTH, 2018).

1.5.1 Testes *in silico*

As plataformas dos ensaios *in silico* baseiam-se em bancos de dados ou bibliotecas com fragmentos de compostos já conhecidos e, por similaridade, se utilizam de algoritmos para determinar as características do composto em avaliação. Nesse raciocínio, alguns programas utilizam-se da determinação de relação estrutura-atividade para relacionar a estrutura físico-química de uma molécula com suas possíveis funções biológicas. Desta forma, a partir das predições *in silico*, é possível selecionar compostos de interesse para testes *in vitro* e *in vivo*, uma vez que essas são abordagens complementares e interdependentes (CHAND, 2011).

A busca virtual consiste na pré-seleção de compostos a partir de bancos de dados virtuais com muitas moléculas, usando um computador. Assim, os testes de atividade *in vitro* são realizados apenas com compostos pré-selecionados. Essa pré-seleção é feita praticamente predizendo a atividade biológica de interesse usando diferentes abordagens. As vantagens desta estratégia são que os compostos de teste não precisam necessariamente estar fisicamente presentes e que o material *in silico* não é consumido nesta análise virtual (KLEBE, 2006).

Como método alternativo, o CLC-Pred foi inserido na internet em 2018 para a previsão da atividade citotóxica *in silico* de compostos em 278 linhagens de células cancerígenas e 27 linhagens de células normais com base na fórmula estrutural do composto, ou seja, o SMILE (LAGUNIN *et al.*, 2018). Foi fundamentado na abordagem PASS Online (LAGUNIN *et al.*, 2000; FILIMONOV *et al.*, 2014; POROIKOV *et al.*, 2019) e nos dados experimentais dos 23 bancos de dados do ChEMBL para 59.882 compostos. Posterior a isso, mais de 80 artigos foram publicados utilizando essa plataforma analisando novos compostos químicos (BOJARSKA *et al.*, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2022), compostos naturais (LUO, WANG, LIAO, 2022; HOQUE *et al.*, 2022; AHMED *et al.*, 2021) e novas substâncias com atividade antitumoral (RADUCKA *et al.*, 2022; WADOOD *et al.*, 2022). Este método permite o estudo da estimativa da toxicidade com a finalidade de selecionar os compostos mais eficazes e seguros (SHARMA, HABER, SETTLEMAN, 2010; FILIMONOV *et al.*, 2014).

1.5.2 Hemólise

A análise toxicológica em eritrócitos mostra os possíveis danos que as moléculas causam à membrana celular, estrutura responsável pela manutenção das funções celulares (por exemplo, transporte passivo e ativo) e pela produção de íons e gradientes elétricos (SUWALSKY *et al.*, 2008). O teste de atividade hemolítica *in vitro* é considerado um método alternativo e preliminar para examinar a citotoxicidade de moléculas bioativas. Este teste rápido altamente reprodutível indica danos potenciais à membrana dos glóbulos vermelhos produzidos por uma substância específica (SCHIAI *et al.*, 2007).

Diante disso, a triagem de efeitos biológicos e toxicológicos de extratos vegetais, óleos essenciais e seus compostos majoritários, faz-se necessário a observação da atividade hemolítica das espécies estudadas. Existem vários métodos para testar a atividade hemolítica de espécies vegetais, a Organização Mundial da Saúde recomenda em seu manual de 1998 avaliação qualitativa observando a cor vermelha devido à liberação da hemoglobina (OMS, 1998). Outra opção é o método de observação da formação de halos hemolíticos em placas de ágar sangue (EFING, 2008).

1.5.3 *Artemia salina*

A. salina é uma espécie de microcrustáceo que vive em águas salobras e usadas para alimentar peixes e camarões devido ao seu alto valor nutricional (ASEM, 2008; FARIAS, IMADA, KATAYAMA, 2010).

A primeira publicação utilizando o teste *A. salina* é de 1956 (MICHAEL *et al.* 1956). Desde então, vários trabalhos têm utilizado esta abordagem para avaliar os limites toxicológicos de várias substâncias, principalmente extratos de plantas. Estudos de determinação de concentração letal para matar 50% (CL50) em *A. salina* mostram forte correlação com os valores encontrados em camundongos *Swiss*, indicando que este bioensaio oferece grandes vantagens na avaliação da toxicidade de derivados de plantas, pois fornece informações úteis para estudos toxicológicos mais avançados. Assim, pode ser usado para determinar a janela de efeito tóxico em mamíferos em testes preliminares de produtos químicos tóxicos (ARCHANGEL *et al.* 2012; MIGLIORE *et al.* 1997; NUNES *et al.*, 2006).

Quanto ao uso desses microcrustáceo como organismo bioindicador, apresenta as seguintes vantagens: rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo, além de boa relação com testes *in vivo*, requer pequeno volume amostral, sugerindo ser um método útil (PARRA *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2016). É amplamente utilizado em aplicações e pesquisas toxicológica (PARRA *et al.*, 2001).

1.5.4 *Tenebrio molitor*

T. molitor é uma praga mundial de farinha, cereais e alimentos (IFIF, 2019). É um tipo de besouro escuro e possui quatro estágios de vida: ovo, larva, pupa e adulto. O estágio larval dura de 1 a 8 meses e é de cor marrom-amarelada clara (GHALY, ALKOAİK, 2009; LI, ZHAO, LIU, 2013). A fase juvenil dura de 5 a 28 dias a 18 °C (GHALY, ALKOAİK, 2009; LI, ZHAO, LIU, 2013; SIEMIANOWSKA *et al.*, 2013) e a fase adulta de 2 a 3 meses (GHALY, ALKOAİK, 2009). As larvas geralmente têm cerca de 2,0 a 3,5 cm ou mais (AGUILAR-MIRANDA *et al.*, 2002; GHALY, ALKOAİK, 2009) e os adultos cerca de 1 cm (GHALY, ALKOAİK, 2009).

Comparado a outros modelos alternativos de hospedeiros usados no estudo de patógenos humanos, o *T. molitor* apresenta algumas vantagens importantes. As larvas podem ser incubadas a 37 °C, um parâmetro ambiental crítico para a expressão de fatores de virulência para muitos patógenos. Outra vantagem é que o inóculo é administrado por injeção, o que permite a administração direta na hemolinfa do animal. Não há restrição ética, além da facilidade de manutenção e ciclo de vida curto. Além disso, as larvas mortas são fáceis de identificar pois ficam marrons em decorrência da melanização (CANTERI DE SOUZA *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O crescente número de casos de infecções em diferentes sítios relacionados com espécies de *Corynebacterium* estão presentes em países industrializados e em desenvolvimento. A principal espécie causadora de infecções do trato urinário (ITU) dentro do gênero mencionado é o *C. urealyticum*, mas estudos apontam que há um aumento no isolamento de outras espécies desse gênero em uroculturas, como *C. aurimucosum* e recentemente *C. guaraldiae*, isto tanto em pacientes imunocomprometidos quanto imunocompetentes.

Além disso, ainda não foram descritos a capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas hidrofóbicas e hidrofílicas de *C. guaraldiae* e não foram achados na literatura esses dados sobre *C. aurimucosum*, importante fator de virulência descrito por outros autores utilizando corinebactérias.

Embora existam registros de atividade antimicrobiana de plantas e seus derivados contra corinebactérias, não foram encontrados na literatura estudos que demonstrassem o perfil de virulência de *C. aurimucosum* e *C. guaraldiae* sob ação do CN, composto majoritário do OE de canela, uma vez que este já demonstrou atividade inibitória para agregados microbianos em outras espécies bacterianas causadoras de ITU como, por exemplo, *E. coli*. É importante a busca por novos compostos que apresentem características promissoras para o tratamento dessas infecções, como maior espectro de ação, menor toxicidade e menor custo econômico. Esses estudos têm se voltado para o uso de produtos naturais como, por exemplo, óleos essenciais e seus compostos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial de virulência de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* e a toxicidade e propriedades antibacterianas do CN. Para atender o objetivo geral deste trabalho, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- a) pesquisar qualitativa e quantitativamente a formação de biofilme por *c. guaraldiae* e *c. aurimucosum* e sobre substratos abióticos diversos;
- b) avaliar a citotoxicidade do cn através da predição *in silico*;
- c) pesquisar o efeito do cn sobre hemácias humanas;
- d) analisar a toxicidade do cn *in vivo* em *a. salina* e *t. molitor*;
- e) determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima do cn contra *c. guaraldiae* e *c. aurimucosum*;

- f) Analisar a influência do CN sobre a morfologia bacteriana;
- g) Avaliar o papel do CN na erradicação de biofilme pré-formado;
- h) Analisar o tratamento com CN em *T. molitor* infectada com *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem e cultivo das amostras

Neste estudo, foram utilizadas amostras de *Corynebacterium guaraldiae* (n=4) e *Corynebacterium aurimucosum* (n=2) (Tabela 1), sendo as cepas Tipo 13^T e DSM 44532^T, respectivamente, utilizadas como amostra de referência para a espécie. Os microrganismos foram cultivados nos meios de cultura *Trypticase Broth Soy* (TSB), *Trypticase Soy Agar* (TSA) e/ou Ágar sangue e incubados por 48 h a 37 °C antes da realização dos ensaios.

Tabela 1 – Aspectos clínicos das amostras utilizadas

Amostra	Sítio de isolamento	Idade	Gênero
<i>Corynebacterium guaraldiae</i>			
2226	Urina	64	Feminino
2271	Urina	NI	Feminino
2299	Urina	55	Feminino
13 ^T	Cisto sebáceo	61	Masculino
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>			
DSM 44532 ^T	Sangue	NI	NI
332	Fragmento ósseo	NI	NI

Legenda: NI, não informado; ^T cepa Tipo.

Fonte: A autora, 2023.

3.2 Avaliação da formação de biofilme em superfícies abióticas

3.2.1 Formação de biofilme em superfícies hidrofóbicas (poliestireno e cateter de poliuretano)

A metodologia foi seguida por Stepanovic e colaboradores (2000), onde suspensões de amostras bacterianas (200 μL) em TSB, densidade ótica (DO) a 0,2 ($\lambda = 580 \text{ nm}$) foram colocadas em microplacas de poliestireno de 96 poços (Nest Biotechnology USA). Após 48 horas de incubação a 37 °C em condições aeróbias, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado três vezes com *phosphate buffered saline* (PBS, em português, tampão fosfato salino) (0,01 M; pH 7,2; 0,9%). Os microrganismos remanescentes foram então fixados com metanol 99 % (Synth Labsynth, Brasil) por 15 minutos e corados com cristal violeta 2 % durante 5 minutos (Cinética Jand Química, Brasil). Após isso, a lavagem foi realizada com PBS (0,01 M; pH 7,2; 0,9%) O corante foi dissolvido em 160 μL de ácido acético glacial a 33 % (Synth Labsynth, Brasil) e a DO ($\lambda = 550 \text{ nm}$) da solução foi medida com um espectrofotômetro. O controle negativo foi feito com TSB. As amostras foram classificadas como não aderentes (-), quando $\text{DO} \leq \text{DOc}$ (controle), quando $\text{Doc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$; moderadamente aderentes (++) , quando $2 \times \text{Doc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$; fortemente aderentes (+++), quando $4 \times \text{DOc} \leq \text{DO}$. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes.

Para avaliar a formação de biofilme em cateter de poliuretano (LAMEDID, Embramed, Brasil), segmentos estéreis do dispositivo de aproximadamente 4 cm de comprimento foram imersos em TSB contendo 10^6 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) e incubados a 37 °C por 48 h. Após 48 h, os segmentos do cateter foram lavados três vezes com PBS (0,01 M; pH 7,2, 0,9%) estéril para remover as células bacterianas planctônicas, para a lavagem final foram colocados em tubos tipo Falcon contendo 1 ml de PBS (0,01 M; pH 7,2; 0,9%) estéril e areia e agitados no vórtex por 1 minuto. Os microrganismos foram então diluídos e semeados em meio TSA para posterior quantificação de UFC/mL (SOUZA *et al.*, 2015a, com modificações). Em seguida, realizada a contagem semiquantitativa com adaptações utilizando a técnica de rolamento do segmento do cateter em placa de Petri contendo meio TSA (MAKI *et al.*, 1977). O crescimento acima de 15 UFC/mL em dispositivos médicos é determinado como infecção (MARTINS *et al.*, 2009).

3.2.2 Formação de biofilme em superfície hidrofílica do inox

A metodologia de Vale e colaboradores (2013) foi seguida com algumas modificações. Suspensões bacterianas contendo 10^6 UFC/mL foram adicionadas a tubos de vidro com 6 mL de TSB contendo fragmentos de agulhas hospitalares estéreis (Solidor, Brasil) de aproximadamente 5 centímetros e incubadas por 48 h a 37 °C em condições aeróbias. Após o período de incubação, os segmentos da agulha foram lavados (3x) em PBS (0,01 M; pH 7,2) estéril para remover as células bacterianas planctônicas. Para a lavagem final foram colocados em tubos tipo Falcon contendo 1 mL de PBS estéril e areia e agitados no vórtex por 1 minuto. Por fim, para a contagem semiquantitativa foram realizados os mesmos procedimentos descritos acima na metodologia de formação de biofilme em cateter de poliuretano.

3.3 **Análise da toxicidade do cinamaldeído**

3.3.1 Predição de citotoxicidade

O software *Cell Line Cytotoxicity Predictor*, CLC-Pred (<http://www.way2drug.com/Cell-line/>) foi utilizado para avaliar *in silico* a citotoxicidade do cinamaldeído contra linhagens celulares tumorais e não tumorais (LAGUNIN *et al.*, 2018). A análise foi realizada através da configuração química do CN, denominado de SMILES, que foi retirado do banco de dados NCBI – *PubChem Substance*. Foi analisado o Potencial de ativação (Pa) do CN sob as linhagens celulares. Os parâmetros utilizados foram descritos por Amiranashvili e colaboradores (2020) onde relatam que o $Pa < 0,3$ – muito seguro; $0,3 \geq Pa \leq 0,5$ - seguro; $Pa > 0,5$ - não seguro.

3.3.2 Avaliação da atividade hemolítica do cinamaldeído

Dois testes de hemólise foram realizados para verificar a atividade do CN frente as hemácias. O primeiro teste foi realizado em placas de Ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5 %, metodologia adaptada de Paula e colaboradores (2014), em que o CN foi preparado em concentrações de 2000 a 62,5 µg/mL e inoculado (20 µL) em discos de papel filtro estéreis. Posteriormente, os discos foram depositados na placa de Ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5 % e a placa incubada a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, observou-se a formação ou ausência de halo ao redor dos discos, indicando dessa forma a atividade hemolítica. O Triton X-100 a 1 % foi utilizado como controle positivo.

Para a segunda determinação, glóbulos vermelhos do grupo sanguíneo O com fator RH positivo foram obtidos de um voluntário saudável e sem uso de antiinflamatórios e antibacterianos nas últimas duas semanas. Uma alíquota de 4 mL de sangue foi lavada com solução salina (0,01 M; pH 7,2; 0,09%) por centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, esse procedimento foi repetido por três vezes, sendo descartado o sobrenadante ao final de cada lavagem. As hemácias foram diluídas com solução salina (0,01 M; pH 7,2; 0,09%) até obter uma suspensão a 1 % (v/v). Em seguida, 500 µl da suspensão de hemácias e 500 µl do CN em diferentes concentrações (2 – 0,0625 mg/mL) foram adicionados em tubos de fundo cônico do tipo eppendorf e incubados a 37 °C sob agitação por 60 minutos. Após esse período, os tubos de fundo cônico foram novamente centrifugados e alíquotas de 200 µl da suspensão foram transferidos para placas de fundo plano de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (ELISA; Brasil) a 550 nm. Triton X-100 a 1% (agente hemolítico) foi utilizado como controle positivo (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Ralph e colaboradores (2009) através de testes de atividade hemolítica classificaram o grau de toxicidade *in vitro* de acordo com a taxa de mortalidade observada: 0 a 9 % = não tóxico; 10 a 49 % = levemente tóxico; 50 a 89 % = tóxico; 90 a 100 % = muito tóxico quando comparadas ao controle positivo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade CEUMA sob o número do parecer: 1.732.522.

3.3.3 Potencial citotóxico do cinamaldeído contra *Artemia salina*

O teste de toxicidade com *A. salina* foi realizado de acordo com Meyer e colaboradores (1982), com algumas modificações. Os ovos de *A. salina* foram dispostos em um aquário com 900 mL de água com a adição de 15 gramas de sal grosso. Os cistos foram mantidos sob aeração e luz fluorescente de 100 W constantes para o fornecimento adequado de condições ambientais para a eclosão de ovos. Após 24 h, os ovos eclodiram e os microcrustáceos atingiram o estágio de metanauplius e foram transferidas para recipientes plásticos (n = 10 microcrustáceos em cada recipiente) contendo solução salina (0,01 M; pH 7,2; 0,09%) e CN nas concentrações de 2 a 0,0625 mg/mL. Como controle negativo, utilizou-se dimetilsulfóxido (DSMO) a 0,01% e como controle positivo, foi utilizado 10 µg/mL de solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em solução salina (0,01 M; pH 7,2). Ao final do experimento foram contabilizados os microcrustáceos que morreram durante o período de 24h com a finalidade de avaliar a taxa de sobrevivência. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes.

O teste estabelece uma classificação na qual as amostras que apresentam uma concentração letal para matar 50 % (CL₅₀) > 1000 µg/mL são consideradas atóxicas e as que apresentam a CL₅₀ < 1000 µg/mL são consideradas tóxicas (Meyer et al., 1982).

3.3.4 Toxicidade do cinamaldeído em larvas *Tenebrio molitor*

Para avaliação da citotoxicidade, as larvas foram distribuídas aleatoriamente em grupos experimentais (n = 10 larvas por grupo) e pré-desinfetadas com álcool 70 %. Posterior a isso, foram inoculadas com auxílio da seringa de insulina, 10 µl de uma solução em diferentes concentrações do CN (2 mg/mL – 0,0625 mg/mL) na segunda esternite visível acima da cauda, na porção ventral. Os controles negativos foram solução salina (0,9%) e DMSO a 1 %, ambas as soluções estéreis. A taxa de sobrevivência foi determinada após o período de 5 dias de exposição ao CN em intervalos de 24 h. Para verificar a morte das larvas, foi observado se houve a melanização e a resposta a estímulos físicos tocando-as suavemente (LIMA, 2011; SOUZA et al., 2016). O experimento foi realizado em triplicata e repetido por três vezes.

3.4 Avaliação da atividade antibacteriana do cinamaldeído

3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do cinamaldeído

O CN foi adicionado e diluído seriadamente na proporção 1:2 em placas de 96 poços contendo 190 μL de TSB. Após isso, suspensões microbianas das amostras em estudo foram preparadas correspondentes a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e transferidos 10 μL para respectivos poços da microplaca de 96 poços. O controle positivo foi feito com 190 μL e 10 μL de suspensão bacteriana. O controle negativo foi feito com 190 μL de TSB, 30 μL de cloranfenicol e 10 μL de suspensão bacteriana. Transcorrida a incubação de 48 h a 37 °C, a revelação do ensaio foi realizada pela adição de 30 μl de resazurina em cada poço da microplaca, que foi novamente incubada. A CIM é a menor concentração do CN na qual não foi detectada mudança de coloração do azul para o róseo. Para a determinação da CBM, uma alíquota de 10 μl foi retirada dos poços que não apresentarem crescimento microbiano visível e inoculada em placas de TSA, posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. A CBM é a menor concentração do CN na qual não houve crescimento celular sobre a superfície do meio de cultura (KOO *et al.*, 2000; SANTURIO *et al.*, 2007). O CN será considerado como agente bacteriostático quando a razão $\text{CBM/CIM} > 4$ e agente bactericida quando a razão $\text{CBM/CIM} \leq 4$ (GATSING *et al.*, 2006).

3.4.2 Indução de alterações morfológicas pelo cinamaldeído

Suspensões de amostras bacterianas (200 μL) com D.O. a 0,4 ($\lambda = 580$ nm) foram adicionadas em 4 mL de TSB na presença de CN em concentrações subinibitórias (subCIM) ($\frac{1}{2}$ da CIM e $\frac{1}{4}$ da CIM). Como controles negativos foram DMSO a 1% e TSB somente com a suspensão bacteriana. Os inóculos foram incubados durante 24 e 48 h e realizada a confecção de lâminas, em seguida, as lâminas foram coradas pelo método de coloração de Gram. Após

isso, as lâminas foram observadas em microscópio óptico utilizando a lente 100x e óleo de imersão. Foi verificado se houve a formação de aglomerados, a redução ou filamentação bacteriana (GOMES *et al.*, 2013; VIANA *et al.*, 2020).

3.4.3 Erradicação de biofilme pré-formado pelo cinamaldeído

Com base em Stepanovic e colaboradores (2000) e Gomes e colaboradores (2013) a metodologia foi adaptada. 200 µL de suspensões bacterianas das amostras em estudo em TSB (D.O. 0,2; $\lambda = 570$ nm) foram adicionados aos poços de uma microplaca de 96 poços. Como controle negativo foi utilizado apenas o caldo TSB. Após 24 h a 37 °C, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com PBS (0,01 M; pH 7,2; 0,9%). Após isso, foram adicionados 200 µl de TSB nos poços de controle negativo e 100 µl de TSB mais 100 µl do CN (2 mg/mL – 0,0625 mg/mL) nos poços para observar a erradicação do biofilme. A placa foi novamente incubada por 24 h a 37 °C. Após esse período, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado três vezes com 200 µL de PBS, e as células bacterianas remanescentes aderidas foram fixadas em 200 µl de metanol 99 % durante 15 minutos e coradas com cristal violeta 2 % por 5 minutos. Após isso, foi realizada uma lavagem com PBS (0,01 M; pH 7,2; 0,09%) três vezes. O corante ligado foi então dissolvido em 160 µL de ácido acético glacial a 33 % e a D.O. ($\lambda = 550$ nm) foi medida no espectrofotômetro (ELISA; Brasil). Os testes foram realizados em triplicata e repetido por três vezes.

3.5 Efeito do cinamaldeído sobre processo infeccioso induzido em *Tenebrio molitor*

Este ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por Ferro e colaboradores (2016), com modificações. Larvas de *T. molitor* foram distribuídas aleatoriamente em grupos experimentais (n = 10 larvas por grupo) e pré-desinfetadas com álcool 70 %. Em seguida, foram inoculados 10 µl de suspensão bacteriana (D.O. 0,3; 520nm) ou somente solução salina (0,01 M; pH 7,2; 0,09%) (controle) sobre a cauda do segundo esternite visível, na parte ventral. Para avaliar as ações antimicrobianas do CN, grupos de larvas infectadas como descrito acima

receberam, após 2 horas, doses em diferentes concentrações do CN (2 mg/mL – 0,0625 mg/mL) ou PBS (0,01 M; pH 7,2; 0,09%) (10 µl). Como controle negativo, foi injetado 10 µl de PBS (0,01 M; pH 7,2; 0,9%). A taxa de mortalidade foi observada durante 5 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

3.6 Análise estatística

A avaliação dos dados foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5, utilizando o Teste de Tukey para formação de biofilme em superfície de inox, poliestireno, poliuretano e erradicação de biofilme pré-formado. Para o experimento com *A. salina*, as médias dos sobreviventes de cada diluição foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett para múltiplas comparações, com o auxílio do programa Graphpad Prism 6, considerou-se significativos os valores para $p < 0,01$, a DL50 foi calculada através do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) utilizando o Teste de probit. Nos ensaios com *T. molitor*, a curva de sobrevivência foi traçada pela análise de Kaplan-Meier e os resultados foram analisados usando o teste log-rank em que o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas

4.1.1. Caracterização da formação de biofilme na superfície de poliestireno

Todas as amostras testadas foram capazes de formar biofilme na superfície de poliestireno, sendo apenas os isolados *C. guaraldiae* 2226 e *C. aurimucosum* 332 classificadas como fracamente aderentes (+) (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação da formação de biofilme por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* em superfície hidrofóbica de poliestireno

Amostras	Sítio de isolamento	Biofilme
<i>Corynebacterium guaraldiae</i>		
2226	Urina	+
2271	Urina	++
2299	Urina	++
13 ^T	Cisto sebáceo	++
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>		
44532	Sangue	++
332 ^T	Fragmento ósseo	+

Legenda: (+), fracamente aderentes; (++) , moderadamente aderentes.

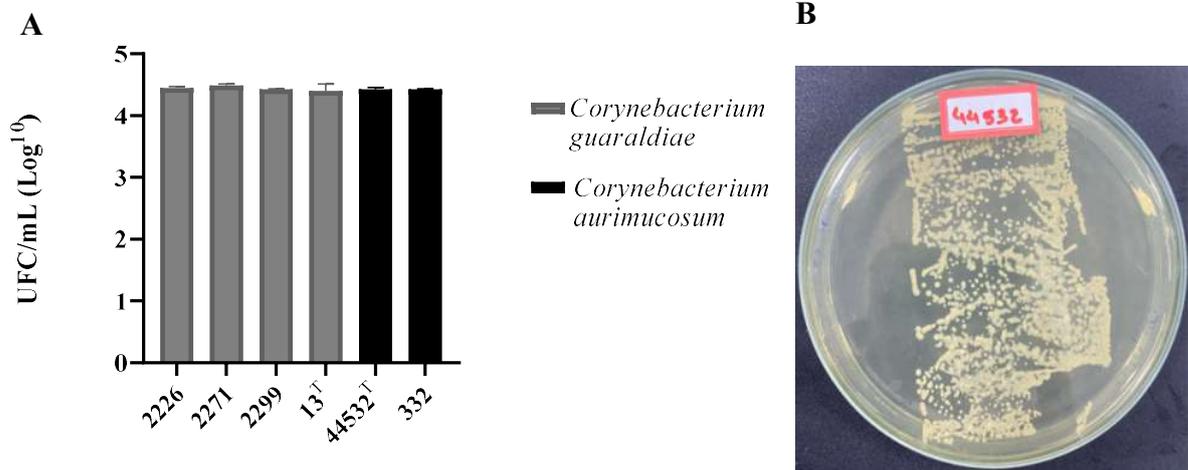
Fonte: A autora, 2023.

4.1.2. Produção quantitativa e semiquantitativa de biofilme em cateter de poliuretano e em inox

Ao avaliar a formação de biofilme na superfície de cateter de poliuretano e inox, todos os isolados foram capazes de aderir à superfície do cateter de poliuretano, com valores de aproximadamente 4,5 Log¹⁰ UFC/mL para todas as amostras. Em contrapartida, na superfície

de inox as amostras apresentaram valores entre 1,7 e 2,9 Log^{10} UFC/mL. Ambas não demonstraram diferenças significativas através do teste de Tukey ($p = 0,57$ e $p = 0,07$, respectivamente) (Figura 2A e 3A). Mesmo após a lavagem final com areia estéril, verificou-se através do método semiquantitativo um crescimento bacteriano confluyente (> 15 UFC) para todos os isolados (Figura 2B e 3B).

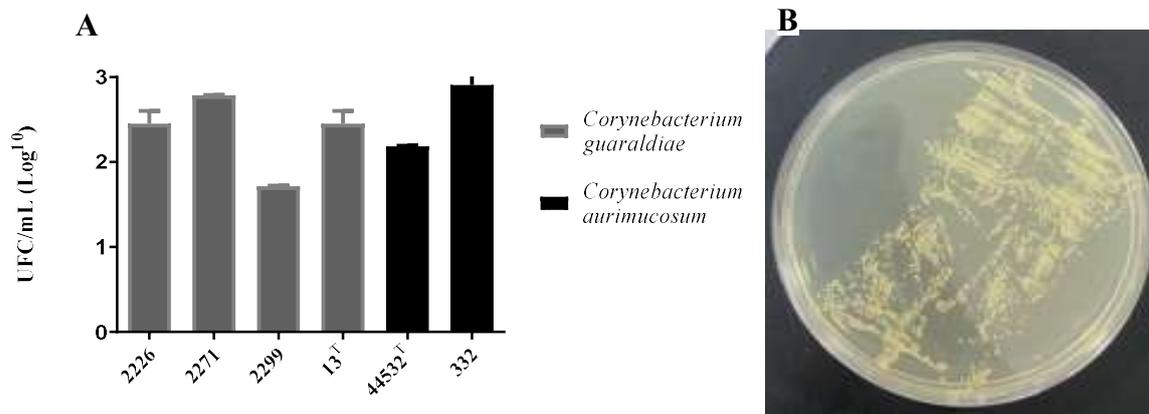
Figura 2 – Formação de biofilme por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum*, após 48h de incubação em superfície hidrofóbica de cateter de poliuretano, utilizando-se método quantitativo (A) e semiquantitativo (B)



Legenda: UFC, Unidades Formadoras de Colônias. Em A, os dados representam as médias das UFC \pm desvio padrão de dois experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. No teste de Maki (técnica de rolamento) (B) considerou-se crescimento > 15 UFC/mL como infecção. Em ambos os testes, as quantificações foram realizadas após agitação do cateter na presença de areia.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 3 - Formação de biofilme por *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum*, após 48h de incubação em superfície hidrofílica de inox, utilizando-se métodos quantitativo (A) e semiquantitativo (B).



Legenda: UFC, Unidades Formadoras de Colônias. Em A, os dados representam as médias das UFC \pm desvio padrão de dois experimentos realizados em duplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. No teste de Maki (técnica de rolamento) (B), considerou-se crescimento maior que 15 UFC/mL como infecção. Em ambos os testes, as quantificações foram realizadas após agitação da agulha na presença de areia.

Fonte: A autora, 2023.

4.2 Toxicidade do cinamaldeído

4.2.1 Predição *in silico*

Foram analisadas as seguintes linhagens para avaliar a toxicidade do CN: TCC-SUP (carcinoma de bexiga – trato urinário), UMUC3 (carcinoma de bexiga – trato urinário), SW1353 (condrossarcoma ósseo – osso), SK-ES1 (sarcoma de Ewing – osso), MeWo (melanoma - pele), MEXF276L (melanoma de xenoinxerto – pele) e fibroblasto (pele); Este foi classificado como uma substância segura visto que obteve resultado de Pa menor que 0,3.

Tabela 3 - Predição da citotoxicidade do cinamaldeído frente linhagens celulares tumorais e não tumorais

Linhagem	Tipo de célula	Valor de Pa
TCC-SUP	Carcinoma de bexiga	0,02
UMUC3	Carcinoma de bexiga	0,05
SW1353	Condrossarcoma ósseo	0,06
SK-ES1	Sarcoma de Ewing	0,08
MeWo	Melanoma	0,20
MEXF276L	Melanoma de xenoenxerto	0,01
HS27	Fibroblasto	0,07

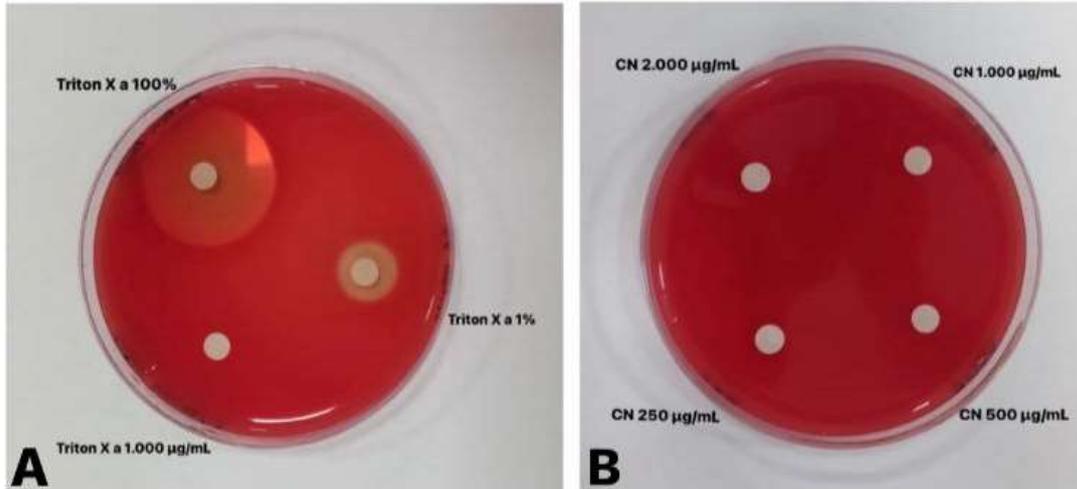
Legenda: Pa, potencial de ativação; $Pa < 0,3$, muito seguro; $0,3 \geq Pa \leq 0,5$, seguro; $Pa > 0,5$, não seguro.
 Fonte: A autora, 2023.

4.2.2 Análise *in vitro* da atividade hemolítica

Ao utilizar o método de difusão em placa de Ágar sangue de carneiro desfibrinado 5 %, observou-se que houve ausência de formação de halos em todas as concentrações de CN testadas (2.000 a 15,625 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao Triton X-100 a 1% (Figura 4).

Após avaliação estatística da interação entre o CN e eritrócitos tipo O+, a concentração efetiva para hemolisar 50 % das hemácias do CN foi de 706 $\mu\text{g/mL}$. Foi observado que o controle positivo utilizado (Triton X-100, 1 %) mostrou-se mais hemolítico que a concentração máxima testada de cinamaldeído (Figura 5).

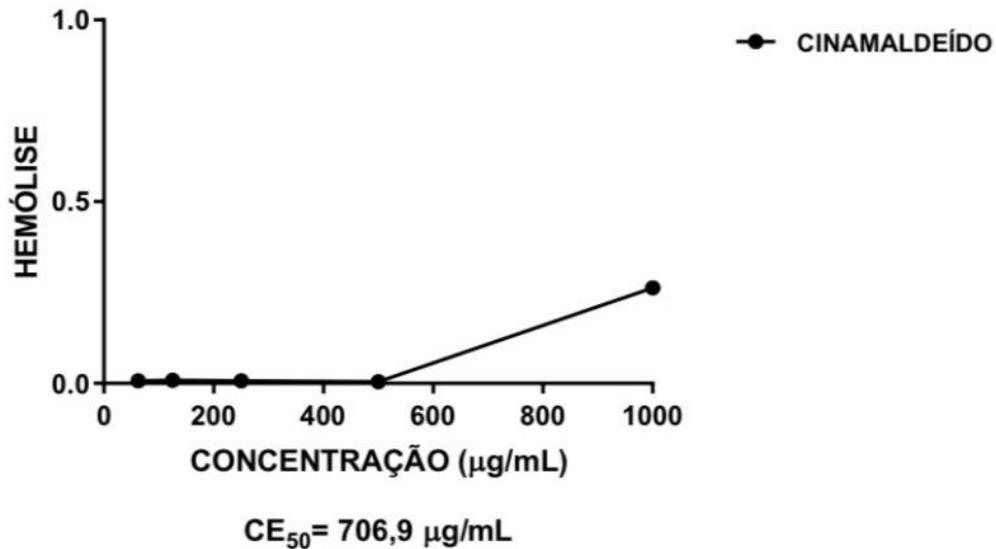
Figura 4 - Avaliação da atividade hemolítica do cinamaldeído em Ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5 %



Legenda: A - Discos contendo controle positivo: Triton X-100 a 100 % e a 1 %. B - Discos contendo cinamaldeído nas concentrações de 2.000 µg/mL a 250 µg/mL.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 5 - Atividade hemolítica do cinamaldeído em comparação ao Triton X-100 a 1 % em hemácias humanas (sangue O+)



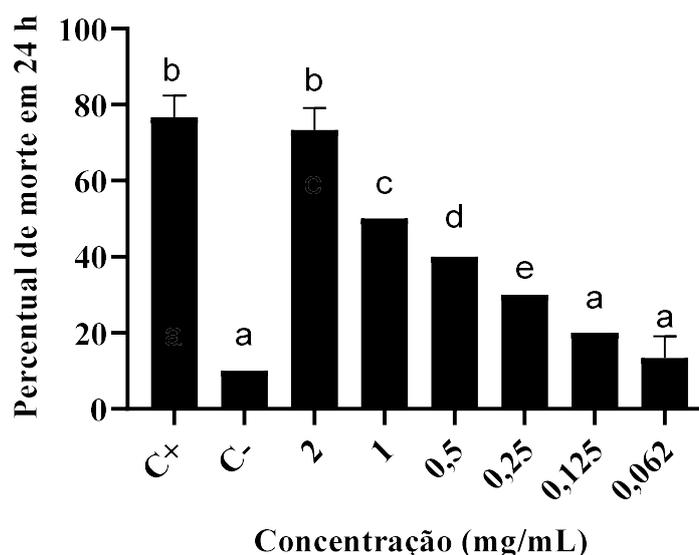
Legenda: hemólise - leitura da absorbância (550nm); CE50: Concentração eficiente para hemolisar 50% das hemácias.

Fonte: A autora, 2023.

4.2.3 Avaliação *in vivo* contra *Artemia salina* e *Tenebrio molitor*

No bioensaio com o microcrustáceo *A. salina*, a CL50 foi calculada através do software SPSS utilizando o Teste de probit. A CL50 do CN foi de $0,094819 \pm 0,029457$ mg/mL. Ao verificar o percentual de mortes em 24 h e comparar com os controles através do Teste de Tukey, foi possível observar que ao diminuir a concentração do CN, o percentual de mortes também diminui (Figura 6). De acordo com os parâmetros utilizados no presente estudo, o cinamaldeído foi considerado tóxico.

Figura 6 - Percentual de microcrustáceos de *Artemia salina* mortos em relação as concentrações do cinamaldeído

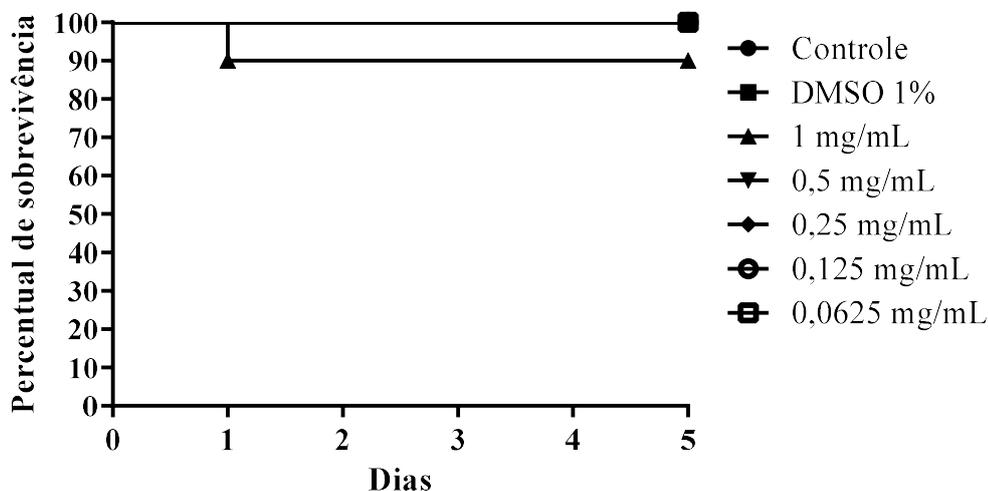


Legenda: CN, controle negativo (DMSO a 1 %); CP, controle positivo (dicromato de potássio). Letras diferentes entre as colunas das concentrações é considerado significativo pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2023.

A toxicidade do CN também foi avaliada utilizando larva de *T. molitor* verificando a taxa de sobrevivência desse inseto após exposição durante 5 dias (Figura 7). A taxa média de sobrevivência em relação às concentrações utilizadas aponta que não houve um número de mortes considerável e o valor de $p = 0,42$ não foi significativo entre as concentrações testadas.

Figura 7 - Porcentagem de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após a injeção do cinamaldeído em sua porção ventral



Legenda: Controle negativo – solução salina. O valor de p (<0,05) não foi considerado significativo segundo o Teste Kaplan-Meier e Teste de Log-Rank [Mantel-Cox].

Fonte: A autora, 2023.

4.3 Avaliação da atividade antibacteriana do cinamaldeído

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima do cinamaldeído

Os valores da CIM encontrados foram entre 125 µg/mL e 250 µg/mL para os isolados utilizados no presente estudo, sendo considerados como forte atividade inibitória de acordo com os parâmetros de referência utilizado (Sartoratto *et al.*, 2004). A CBM da amostra *C. guaraldiae* 2226 não foi possível ser definida nas concentrações avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do composto cinamaldeído frente isolados de *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum*.

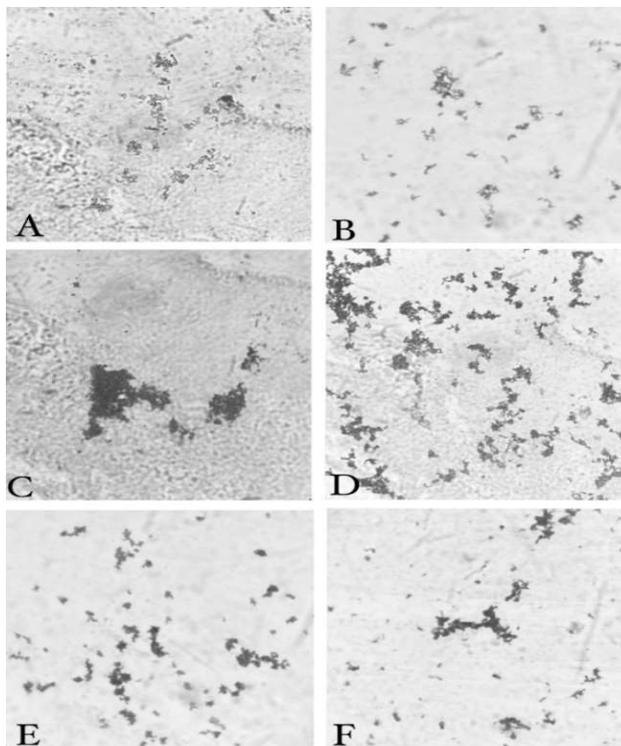
Amostra	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	Classificação
<i>Corynebacterium</i>			
<i>guaraldiae</i>			
2226	250	ND	ND
2271	250	250	Bactericida
2299	125	500	Bactericida
13 ^T	125	500	Bactericida
<i>Corynebacterium</i>			
<i>aurimucosum</i>			
DSM 44532 ^T	250	500	Bactericida
332	250	250	Bactericida

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima. ND, não determinada. O controle positivo foi o cloranfenicol (30 μg).
Fonte: A autora, 2023.

4.3.2. Avaliação das alterações morfológicas bacterianas e mudança nos padrões de agregação

Amostras de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* apresentaram aumento na auto-agregação bacteriana após crescimento na presença de subCIM (CIM/2 e CIM/4) do CN, mas *C. guaraldiae* 2299 mostrou um maior aumento na agregação (Figura 8). Não houve diferenças morfológicas na presença do DMSO a 1 %. Além disso, não foi possível observar filamentação ou redução do tamanho das células bacterianas.

Figura 8 - Fotomicrografias de células de *Corynebacterium guaraldiae* 2299 coradas pelo método de coloração de Gram após exposição a sub CIM do cinamaldeído



Legenda: (A) controle negativo - amostra cultivada na ausência do CN; (B) amostra cultivada juntamente com DMSO a 1 %; (C) e (D) amostra cultivada na presença da CIM/2 por 24 h e 48 h, respectivamente; (E) e (F) amostra cultivada na presença da CIM/4 por 24 h e 48 h, respectivamente. Ampliação de x1000.
Fonte: A autora, 2023.

4.3.4 Análise do potencial antibiofilme

Após o CN ser incubado com os biofilmes pré-formados de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*, notou-se que em todas as concentrações testadas houve erradicação de mais de 90 % dos biofilmes (Figura 9). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Figura 9 - Erradicação de biofilme pré-formado por 24 h de *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* em placas de 96 poços de poliestireno pelo cinamaldeído (continua).

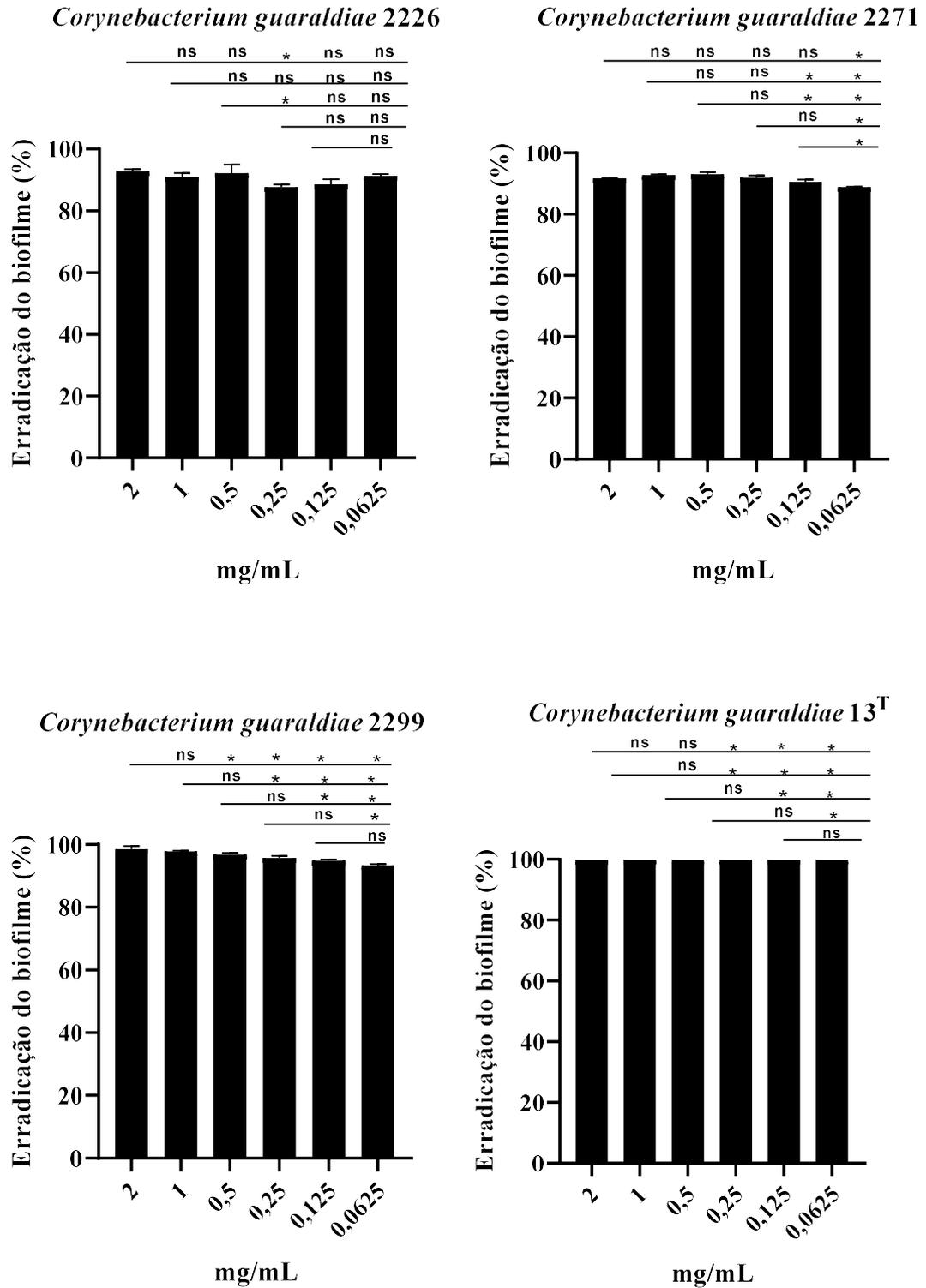
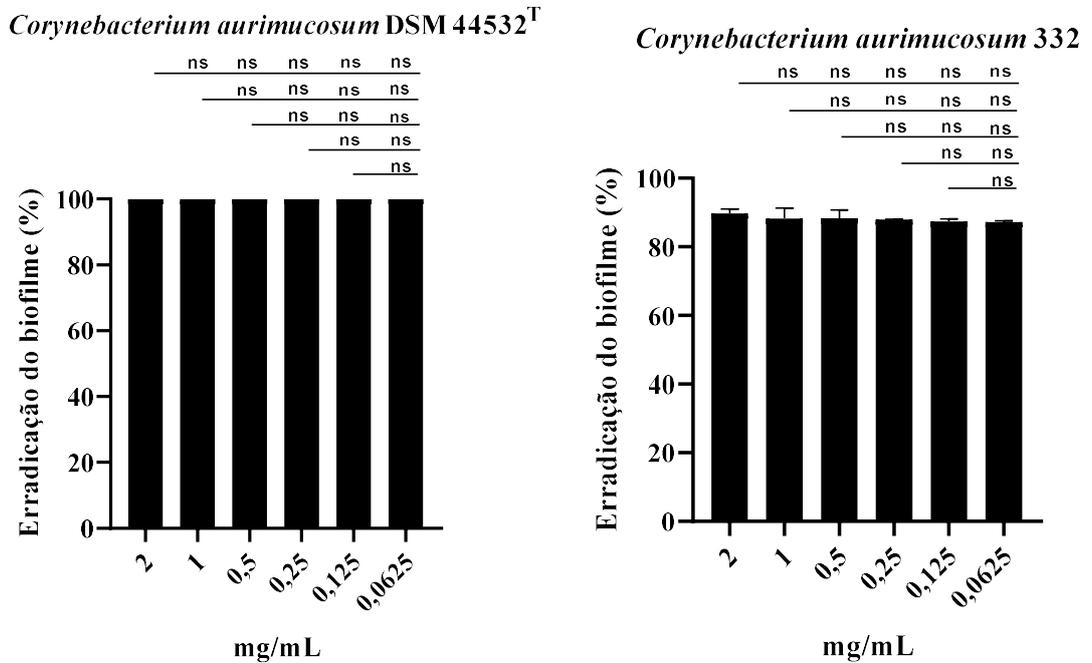


Figura 9 - Erradicação do biofilme pré-formado por 24 h de *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* em placas de 96 poços de poliestireno pelo cinamaldeído (continuação).



Legenda: Os valores são a média \pm DP de três experimentos independentes. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) – diferença significativa em relação as concentrações. Ns: não significante.
Fonte: A autora, 2023.

4.4 Efeito do cinamaldeído sobre processo infeccioso induzido em *Tenebrio molitor*:

Ao analisar a infecção em larva de *T. molitor* por *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* e o tratamento com CN, observou-se que apenas as amostras de *C. guaraldiae* 2299 e *C. aurimucosum* DSM 44532^T apresentaram o valor de p não significativo ($p < 0,05$). Em contrapartida, para os outros isolados o CN demonstrou atividade protetora frente a infecção causada pelos microrganismos (Figura 10).

Figura 10 - Percentual de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* tratadas com cinamaldeído após 2 horas de infecção com *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* (continua).

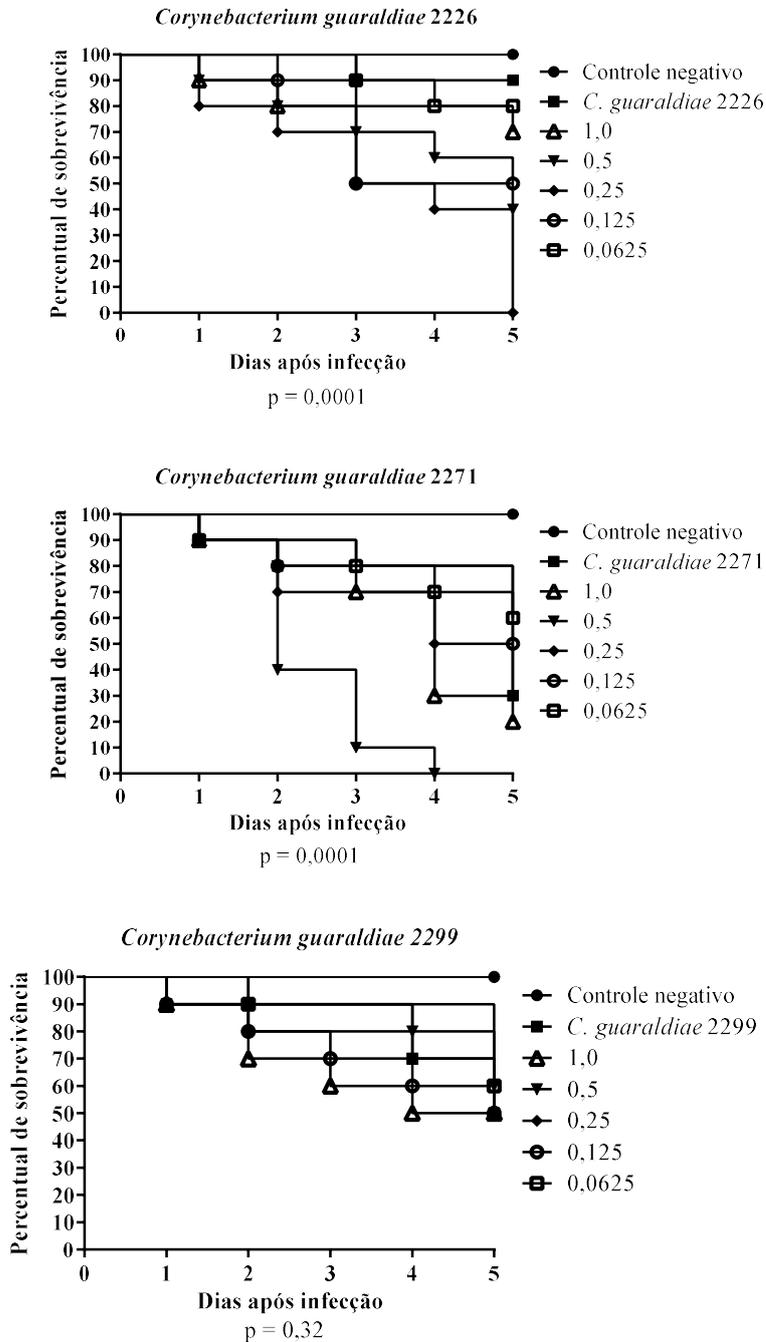
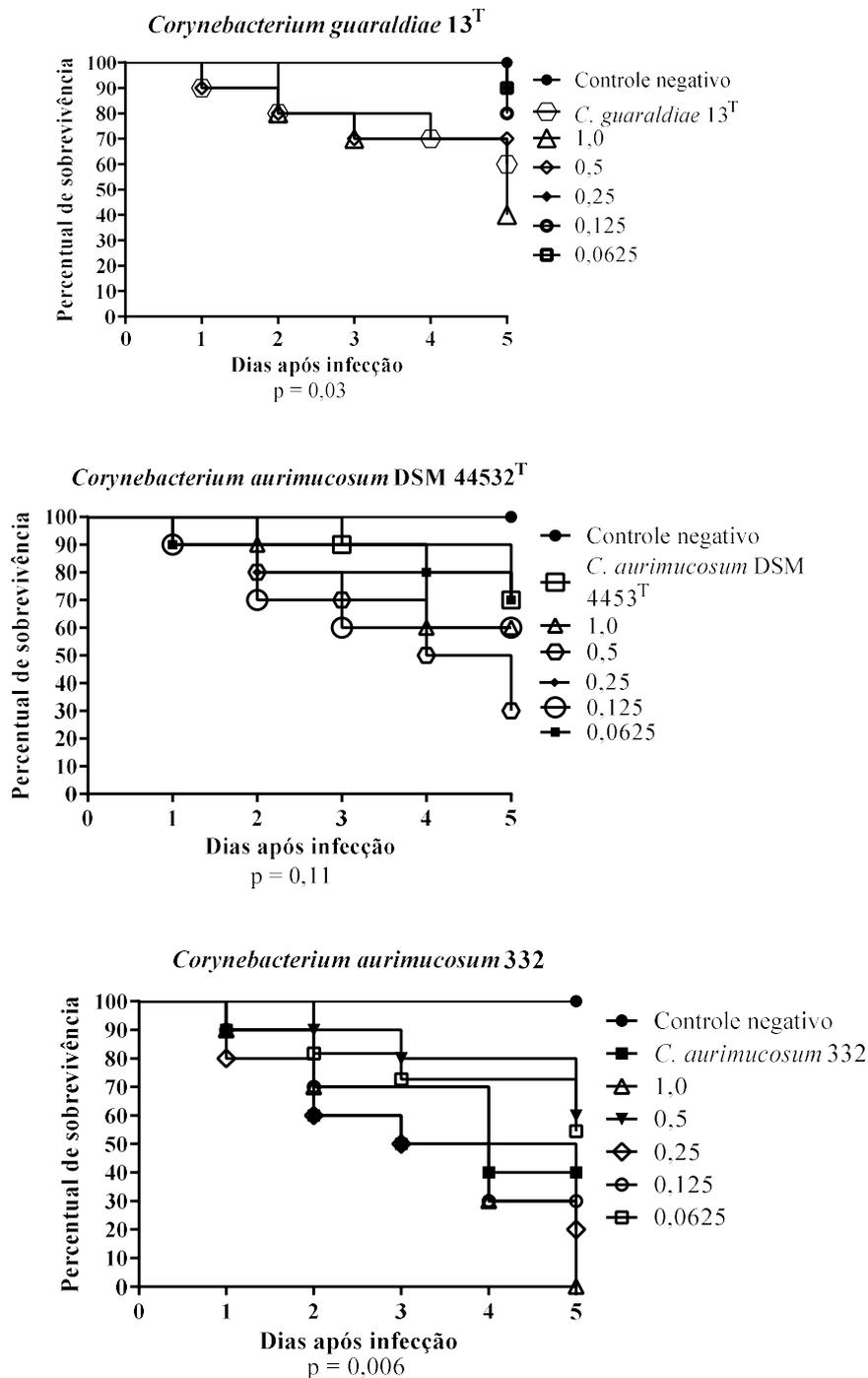


Figura 10 - Percentual de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* tratadas com cinamaldeído após 2 h de infecção com *Corynebacterium guaraldiae* e *Corynebacterium aurimucosum* (continuação).



Legenda: Controle negativo: PBS; Os dados representam a média de dois experimentos comparados estatisticamente pelo teste de log-rank (Mantel- Cox), utilizando o programa GraphPad Prism. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2023.

5 DISCUSSÃO

Algumas espécies do gênero *Corynebacterium* representam sérios riscos à saúde pública, devido a redução do perfil de sensibilidade dos antibióticos e surgimento de cepas MDRs, dificultando a administração de uma terapia antimicrobiana eficaz (OLENDER, 2013). Embora sejam consideradas erroneamente como contaminantes, estudos realizados confirmaram que são capazes de aderir em dispositivos médicos, e sua implicação em doenças nosocomiais parece ser em consequência da produção de biofilme, que colabora com a transferência horizontal de genes de resistência microbiana e a disseminação da resistência a múltiplas drogas (STEWART, COSTERTON, 2001; De SOUZA, FARIA, SANT'ANNA, 2015).

Além disso, parece que *Corynebacterium* spp. exibem diferentes tipos de ácidos micólicos de cadeia longa em sua estrutura da parede celular, como LAM e LM; proteína DIP0733; e genes relacionados a produção de pili, que podem desempenhar um papel importante na adesão bacteriana a superfícies inertes e formação de biofilme sob certas condições de desenvolvimento de infecção na presença de condições séricas e limitantes de ferro (OLSON *et al.*, 2002; TROST *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2015).

No presente estudo, somente duas amostras mostraram fraca aderência à superfície de poliestireno, sendo uma da espécie *C. guaraldiae* 2226 e outra de *C. aurimucosum* 332, resultado semelhante encontrado por Araújo (2017) com *C. pseudodiphtheriticum*, o que pode ter facilitado a erradicação do biofilme pré-formado pelo CN nas concentrações testadas. Estudos com *C. diphtheriae* corroboram com esses resultados e mostraram que a hidrofobicidade está associada à formação de biofilme em superfícies de poliestireno (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, 1991).

Ademais, o número de microrganismos na superfície é um parâmetro que determina se há uma formação de biofilme maduro ou somente adesão bacteriana. Wirtasen e colaboradores (1996) consideram valores a partir de $3 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$ como biofilme formado. Nesse estudo, as espécies *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* foram capazes de formar biofilme em superfície hidrofóbica de poliuretano com valores de aproximadamente $4,5 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, enquanto em superfície hidrofílica de inox apenas aderiram, apresentando valores entre $1,7$ e $2,9 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$. Schmidt e colaboradores (1998) explicam que bactérias com superfície hidrofóbica

tendem a colonizar menos superfícies hidrofílicas, como foi possível observar no presente estudo.

Infecções relacionadas a cateteres já foram descritas para corinebactérias (WANG *et al.*, 2001; SCHIFFL *et al.*, 2004; TEIXIDO *et al.*, 2007), como por exemplo, *C. diphtheriae*, já foi isolado em cateter de nefrostomia (GOMES *et al.*, 2009). Em consonância, produção de biofilme por *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum* e *C. urealyticum* também já foram relatadas (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, 1991; SORIANO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2015a; SOUZA *et al.*, 2015b). Esta formação de biofilmes em cateteres urinários e dispositivos médicos tornou-se um problema de saúde pública, pois em muitos casos é obrigatório o uso destes dispositivos médicos, e a presença do biofilme no mesmo dificulta o tratamento da infecção (DJERIBI *et al.*, 2012; TENKE *et al.*, 2012).

Após a lavagem final com PBS e areia estéril, observou-se crescimento microbiano (> 15 UFC) para todos os isolados. O crescimento acima de 15 UFC em cateteres de pacientes é determinado como infecção (MARTINS *et al.*, 2009). A adesão a essa superfície pode estar relacionada à adesão irreversível dos microrganismos ao biofilme, que forma uma forte interação entre as células e a superfície (SINDE, CARBALLO, 2000).

O biofilme é responsável por 60 % das infecções humanas e que pode aumentar de 10-100 vezes a resistência aos antimicrobianos, o que torna o tratamento dessas infecções mais refratário (ABDI-ALI *et al.*, 2006). Está diretamente ligado às doenças infecciosas como endocardite, periodontite e otite média, assim como a resistência a antimicrobianos (APARNA, YADAV, 2008; DONLAN, COSTERTON, 2002). Mecanismos envolvidos na patogênese de infecções causadas por espécies de *Corynebacterium* atoxinogênicas não são muito discutidos, mas a capacidade de infectar superfícies bióticas e/ou abióticas mostram seu potencial patogênico (CARVALHO *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2019). Portanto, a formação de biofilme e aderência pelas espécies *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* investigadas neste estudo podem ser aspectos fundamentais para a patogênese e virulência das mesmas.

O aumento da resistência microbiana e como consequência a ineficácia do tratamento tem sido ligada ao uso descontrolado de antimicrobianos. Com isso, muitos trabalhos têm explorado o uso de fitoquímicos, buscando obter novos compostos que apresentem propriedades terapêuticas (ANTUNES *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2018; DOYLE *et al.*, 2019).

Os OEs vem sendo alvo de pesquisas devido a sua vasta aplicação. Entretanto, os OE podem sofrer influência na variabilidade da composição química de acordo com a variação ambiental, genética e até da metodologia utilizada para extração. Hodiernamente, os estudos

visam identificar compostos majoritários responsáveis por atividades biológicas que apresentem alta potencialidade, biodisponibilidade e toxicidade baixa (SEVERINO, 2008). Por exemplo, o CN é o composto majoritário do OE de canela e é reconhecido como seguro e aprovado na indústria de alimentos (ROGIERS *et al.*, 2017). Além disso, o CN possui propriedades importantes como o potencial de amplo espectro frente aos microrganismos e baixo custo (FRIEDMAN, 2017).

O serviço CLC-Pred é um método alternativo *in silico* que visa verificar se compostos químicos possuem baixa citotoxicidade e dessa forma, realizar novos experimentos, principalmente *in vivo*. O CN apresentou Pa abaixo de 0,3 para a maior parte das células selecionadas (TCC-SUP, UMUC3, SW1353, SK-ES1, UMUC3, MeWo, MEXF276L e HS27), que de acordo com os parâmetros definidos por Amiranashvili e colaboradores (2020), indica baixa toxicidade.

De forma semelhante com o presente estudo, Lu, Obianom e Ai em seu trabalho (2018) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que o CN possui atividade antiproliferativa e baixa toxicidade em células não tumorais. Ademais, outros trabalhos relataram que o composto apresentou uma toxicidade mínima perante células normais (HAN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2013).

Além dos testes *in silico*, é possível utilizar outros métodos alternativos. Segundo Alves (2021), o teste de atividade hemolítica *in vitro* é considerado um exemplo de teste alternativo, sendo preliminar para o exame de citotoxicidade de moléculas bioativas. Este teste rápido altamente reprodutível indica danos potenciais à membrana dos glóbulos vermelhos e liberação de hemoglobina, que quando se encontra livre no plasma, é prejudicial à saúde, devido a possibilidade de causar danos graves a órgãos vitais, como fígado, rins e coração (CARVALHO *et al.*, 2007).

Ao executar o método de difusão em placa de Ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5% com diferentes concentrações do CN, não foi observada a formação de halos de hemólise, caracterizando ausência de atividade hemolítica nas concentrações testadas. De forma semelhante, Alves (2021) relatou que o CN não apresentou efeitos tóxicos em eritrócitos humanos, reforçando os resultados encontrados no presente estudo. O CN foi comparado ao fluconazol frente a hemácias e apresentou uma taxa de 10,1 %, enquanto o fluconazol apresentou 20 % de hemólise (SHREAZ *et al.*, 2013).

Para verificar a toxicidade *in vivo*, foram utilizados a *A. salina* e *T. molitor*. A *A. salina* é um microcrustáceo integrante da fauna salina e salobra do ecossistema marinho, considerado cosmopolita e, portanto, adequado para diferentes ambientes. (BARBIERI-JUNIOR, NETO,

2001). A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificar respostas biológicas onde apenas variáveis como morte ou sobrevivência estão envolvidas (MEYER *et al.*, 1982). Embora o teste seja um bom parâmetro para demonstrar a toxicidade *in vivo* de produtos, há trabalhos que relacionam os resultados dos casos de toxicidade a possíveis efeitos antimicrobianos e anticancerígenos (ROSA *et al.*, 2016).

Conforme descrito por Meyer e colaboradores (1982), extratos com valores de CL50 acima de 1000 µg/mL são considerados não tóxicos, enquanto extratos com valores abaixo de 1000 µg/mL são considerados potencialmente tóxicos. Em contrapartida, Amarante e colaboradores (2011), descrevem CL50 acima de 500 µg/mL é considerada toxicidade leve; enquanto um valor de CL50 entre 100 e 500 µg/mL é toxicidade moderada e um valor de CL50 abaixo de 100 µg/mL é considerado toxicidade alta. Neste estudo de toxicidade com *A. salina*, obteve-se CL50 de 0,0948 mg/mL. Considerando os parâmetros relatados na literatura acima para *A. salina*, o CN é tóxico, reforçando que este composto possui propriedades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas.

Amarante e colaboradores (2011) observaram que frações obtidas do caule de *Montrichardia linifera* demonstraram relação entre a atividade antimalárica e toxicidade frente *A. salina*, ambas se apresentaram altas.

A larva *T. molitor* tem sido utilizada de forma ampla na avaliação de diversas atividades como, por exemplo, atividade antimicrobiana, inseticida e citotoxicidade (REZENDE, 2018). No presente estudo, observou-se uma taxa de sobrevivência das larvas de *T. molitor* acima de 80 % em todas as concentrações testadas e não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle negativo, sugerindo que o CN não apresenta toxicidade em larvas de *T. molitor*. Corroborando com isso, Pereira e colaboradores (2021) avaliaram a toxicidade do CN em larvas *T. molitor* e o mesmo não apresentou toxicidade nas concentrações testadas.

O CN possui em sua estrutura um grupamento fenólico que está ligado a um anel aromático, este concede hidrofobicidade a molécula, com o poder de proporcionar desequilíbrio e ruptura da membrana celular da bactéria, agindo então na camada fosfolipídica. Essa interação está ligada a atividade antimicrobiana desse composto (VISVALINGAM *et al.*, 2013; CHIBANE *et al.*, 2018; VASCONCELOS, CRODA, SIMIONATTO, 2018).

É importante destacar que neste estudo, o CN foi eficaz em inibir o crescimento bacteriano de todas as amostras de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*. De acordo com os critérios propostos por Sartoratto e colaboradores (2004), OE e seus componentes majoritários com valores da CIM de 50-500 µg/ml são considerados como forte atividade antimicrobiana, e

aqueles com valores de CIM de 600-1500 µg/ml são considerados moderados, valor de CIM acima de 1500 µg/ml são consideradas atividade fraca. Os resultados obtidos neste contexto mostram que o CN pode ser considerado um produto natural com forte atividade antimicrobiana, corroborando com os resultados encontrados no teste de toxicidade com *A. salina*, visto que apresentou CIM entre 125-250 µg/ml, estas sendo bactericida de acordo com a relação CBM/CIM.

Diversos trabalhos têm mostrado um aumento na resistência aos antimicrobianos de diversas espécies do gênero *Corynebacterium*. Já foram descritos a resistência a clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina e gentamicina (CAMELLO *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015). Embora a penicilina G e a eritromicina sejam as drogas de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *C. diphtheriae* (MACAMBIRA, FORMIGA, 1994; KNEEN *et al.*, 1998), algumas amostras de *C. diphtheriae* isolados no Brasil apresentaram resistência aos antimicrobianos citados acima (PEREIRA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2015). Em consonância, amostras de *C. diphtheriae* isoladas na Europa mostraram resistência a penicilina, eritromicina e outros antimicrobianos (PATEY *et al.*, 1995).

As propriedades antimicrobianas do CN já foram demonstradas contra uma série de patógenos, incluindo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (COX, MARKHAM, 2007; SHEN *et al.*, 2015; UPADHYAY, VENKITANARAYANAN, 2016). Dentre os microrganismos relatados na literatura, estão *Clostridium botulinum*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S. enterica* sorovar Typhimurium (HELENDER *et al.*, 1998), e os fungos *Fusarium oxysporum* ATCC 48112, *Fusarium solani* ATCC 36031 e *Epidermophyton floccosum* CCF-IOC-3757 (MARTINS, 2016).

Outrossim, Morais (2018) relatou que a CIM do CN frente isolados nosocomiais de *Acinetobacter baumannii* variou de 125 a 500 µg / mL e a CBM para a maior parte dos isolados foi de 500 µg/mL, valores semelhantes com o que foram encontrados nas amostras de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*.

Ao executar o teste de alterações morfológicas foi possível identificar a presença de aglomerados bacterianos, sugerindo que subCIM do CN foram capazes de alterar, de alguma forma, as propriedades autoagregativas das amostras de *C. aurimucosum* e *C. guaraldiae* deste estudo. A ação de compostos naturais na morfologia de corinebactérias já foram relatadas. Gomes e colaboradores (2013) observaram filamentação e redução do tamanho de *Corynebacterium diphtheriae* ao serem cultivados em subCIM dos antimicrobianos testados.

Recentemente, foi relatada a ação do OE de *Alpinia zerumbet* sobre a morfologia de *C. ulcerans*, causando auto-agregação de bactérias na presença de concentrações subCIM (VIANA *et al.*, 2020), resultado semelhante a interação do CN com as amostras de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* deste estudo.

As subCIM de um antimicrobiano não são capazes de causar a morte da bactéria, mas podem modificar características físicas e químicas, podendo reduzir os fatores de virulência expressos pelos microrganismos e interferir na capacidade de adesão e motilidade, por exemplo. A capacidade fagocítica ou até a produção de espécies reativas do oxigênio por células de defesa pode ficar comprometida (CHOPRA, LINTON, 1986; SUBRT; MESAK; DAVIES, 2011; GOMES *et al.*, 2013).

Xing e colaboradores (2014) mostraram que o CN causa alterações morfológicas e ultraestruturais prejudiciais, como perda de conteúdo citoplasmático e destruição de mitocôndrias em *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*. Zhang e colaboradores (2016) relatam que de acordo com o perfil metabólico de *E. coli*, alterações de membrana e agregação de proteínas foram observadas em baixas concentrações de CN. Em altas concentrações, o composto entra na célula e danifica as enzimas citoplasmáticas e a transcrição, levando à morte bacteriana (MOUSAVI *et al.*, 2016).

Vários mecanismos moleculares contribuem para altos níveis de tolerância antimicrobiana, incluindo interações antimicrobianas com componentes da matriz do biofilme, taxa de crescimento reduzida e a influência de fatores genéticos específicos na resistência e tolerância a antimicrobianos (HALL, MAH, 2017).

Os mecanismos de resistência dos biofilmes incluem a capacidade da matriz polimérica extracelular de atuar como uma barreira para impedir a entrada de antimicrobianos na célula microbiana, bem como a capacidade dessa matriz de produzir enzimas hidrolíticas que degradam agentes antimicrobianos como β -lactamase, regulam o metabolismo microbiano reduzindo a atividade metabólica das células no biofilme, o que aumenta a tolerância a alguns antimicrobianos que afetam, entre outras coisas, o processo de crescimento de microrganismos (OLSEN, 2015).

A alta resistência aos antimicrobianos e a ineficácia do diagnóstico correto de infecções induzidas por biofilmes correlacionaram-se com a gravidade da condição clínica de pacientes. Como resultado, estratégias como o uso de combinações de antimicrobianos e a busca de novos compostos com atividade antimicrobiana de membrana aumentaram significativamente nos últimos anos (HERRMANN *et al.*, 2010; ROY *et al.*, 2017).

Neste estudo, o CN apresentou erradicação de biofilmes pré-formados em placas de poliestireno das duas espécies avaliadas em diferentes concentrações acima de 90 %. Resultado semelhante encontrado por Firmino e colaboradores (2018), onde o CN inibiu a formação de biofilme de bactérias Gram-negativas em fragmentos de cateter urinário em todas as concentrações testadas.

Foi relatado anteriormente que o composto inibe a formação de biofilme em microplacas de 96 poços com fundo reto de *Porphyromonas gingivalis* também em concentrações subinibitórias (WANG *et al.*, 2018), reforçando o resultado encontrado no presente estudo. Além disso, Albano e colaboradores (2018) descreverem que o CN causou redução no crescimento planctônico bacteriano de *Staphylococcus epidermidis*, inibição da formação de biofilme e erradicação de biofilmes pré-formados e Jia e colaboradores (2011) demonstraram através da reação em cadeia da polimerase quantitativa a expressão reduzida do gene *sarA* relacionado ao biofilme em *S. aureus* resistente à metilicina quando expostos a subCIM de CN. Isso se dá pois o CN pode se difundir através da matriz polissacarídica do biofilme e desestabilizá-lo. Alternativamente, os compostos fenólicos podem interagir com as proteínas de superfície, levando à modificação da superfície da célula bacteriana e danificando parcialmente o estágio inicial de ligação às placas de microtitulação de poliestireno (NOSTRO *et al.*, 2007).

Outros trabalhos demonstraram que os OE ou seus principais componentes são potenciais candidatos para combater biofilmes bacterianos. Jadhav e colaboradores (2013) revelaram que o OE de *Achillea millefolium* inibiu efetivamente a adesão de células de *Listeria monocytogenes* a superfícies de aço inoxidável, poliestireno e polietileno.

Ademais, Dos Santos Rodrigues e colaboradores (2018) mostraram que o OE *Origanum vulgare* (orégano) reduziu o biofilme de *S. aureus* formado em uma superfície de aço inoxidável. Da mesma forma, microemulsões formuladas com *C. cassia*, *Salvia officinalis* (sálvia) ou uma mistura de ambas foram avaliadas causaram redução do biofilme de *S. aureus* em ≥ 3 log UFC/mL 2 h após a formação e promove a remoção de biofilmes em até 68 vezes após 90 minutos de exposição (CAMPANA *et al.*, 2017).

Por outro lado, Firmo (2018) realizou um estudo sobre o efeito de várias espécies de plantas na erradicação de biofilme pré-formado de espécies de *Corynebacterium*, dentre elas, a *Anacardium occidentale* erradicou o biofilme de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. Outras plantas como *Stryphnodendron coriaceum*, *Plathymenia reticulata* e *Azadirachta indica* erradicaram o

biofilme de *C. ulcerans* CDC KC279. Em contrapartida, não foram encontrados estudos na literatura relacionados com a erradicação de biofilme em corinebactérias utilizando o CN.

Ao induzir a infecção em *T. molitor* com as amostras de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* e tratamento com diferentes concentrações do CN, foi possível observar que o CN apresentou efeito protetor mediante a infecção por 3 amostras. Corroborando a isso, Ferro e colaboradores (2016) além de evidenciar a atividade antimicrobiana do composto, trouxe à tona dados sobre sua atividade protetora em um modelo de larva de *Galleria mellonella* e aumento de sobrevivência larval e redução da quantidade de *S. aureus* isolada na hemolinfa larval, utilizando continuamente em testes de toxicidade. Dessa forma, possivelmente existem outros fatores de virulência envolvidos nas amostras de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*, visto que o CN não teve ação protetora mediante a infecção.

Algumas larvas apresentaram melanização durante os dias observados, esse processo de melanização ocorrido está relacionado a resposta imune humoral que de forma conjunta com outros mecanismos de defesa, como fagocitose e isolamento em nódulos ou cápsulas, podem matar e eliminar microrganismos invasores (LEMAITRE, HOFFMAN, 2007; CERENIUS, LEE, SODERHALL, 2008). Apesar da produção da melanina, não houve influência no alto índice de mortalidade em resposta ao patógeno e ao tratamento. Kan e colaboradores (2008) relatam que o excesso desse pigmento é prejudicial ao hospedeiro.

Figueiredo e colaboradores (2022) utilizou o CN no tratamento de sepse induzida por *E. coli* em camundongos do tipo Swiss, este demonstrou aumento de sobrevivência em aproximadamente 33 %. Este aumento na sobrevivência foi provavelmente devido à modulação da resposta celular e mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios.

CONCLUSÕES

- a) Espécies de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* são capazes de formar biofilme em superfícies abióticas hidrofóbicas, mas não em superfície hidrofílica de inox;
- b) O CN não apresentou toxicidade *in silico* frente células de linhagem tumoral e não tumoral;
- c) Não se observou atividade hemolítica do CN ao comparar com o Triton X-100 puro e diluído a 1 % com PBS nas concentrações utilizadas para execução dos outros testes;
- d) O composto não apresentou toxicidade nas concentrações utilizadas frente larvas de *T. molitor*;
- e) O CN mostrou toxicidade (bioativo) frente *A. salina*;
- f) O CN apresentou atividade inibitória e bactericida frente *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*, corroborando com a bioatividade frente *A. salina*;
- g) Notou-se que a auto-agregação de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum* aumentou ao serem expostos às subCIM do CN;
- h) Ao ser testado com biofilme pré-formado de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*, o CN erradicou aproximadamente 90 % desse biofilme;
- i) O CN apresentou efeito protetor para alguns dos isolados de *C. guaraldiae* e *C. aurimucosum*;

REFERÊNCIAS

- ABDI-ALI, A.; MOHAMMADI-MEHR, M.; ALAEI, Y. Agha. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*, v. 27, n. 3, p. 196-200, 2006.
- ADDERSON, E. E. et al. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 3, p. 921-927, 2008.
- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) and grape fruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, p. 1217-1227, 2012.
- AGUILAR-MIRANDA, E.D.; LÓPEZ, M.G.; ESCAMILLA-SANTANA, C.; BARBA DE LA ROSA, A.P. Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor* larvae. *J. Agric. Food Chem. Ed. 50*, 192–195, 2002.
- AHMED, S; MONI, D.A; SONAWANE, K.D.; PAEK, K.Y.; SHOHAEL, A.M. A comprehensive in silico exploration of pharmacological properties, bioactivities and COX-2 inhibitory potential of eleutheroside B from *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 39, 6553–6566, 2021.
- AL-HAQAN, A.; BOSWIHI, S.S.; PATHAN, S.; UDO, E.E. Antimicrobial resistance and virulence determinants in coagulase-negative staphylococci isolated mainly from preterm neonates. *PLoS ONE*, ed. 15, 2020.
- ALBANO, M. et al., Antibacterial and antibiofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermitis*. *MicrobPatog.* V. 126, pag. 231-238, Jan, 2019.
- ALIBI, S.; FERJANI, A.; MARZOUK, M.; BOUKADIDA, J. Identification of Clinical *Corynebacterium striatum* Strains by PCR-Restriction Analysis Using the RNA Polymerase β -subunit gene (rpoB). *J BacteriolParasitol*, v. 6, p. 219, 2015.
- ALBANO, M et al. Antibacterial and antibiofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*, 2018.
- AMARANTE, C. B., et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica*, v. 41, p. 431-434, 2011.
- AMPARO, T. R. et al. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018.

AMIRANASHVILI, L *et al.* Antimicrobial Activity of Nitrogen-Containing 5- α Androstane Derivatives: In Silico and Experimental Studies. *Antibiotics*, v. 9, n. 5, p. 224, 2020.

ANDRADE, T.C.B.; LIMA, S.G.D.; FREITAS, R.M.; ROCHA, M.S.; ISLAM, T.; SILVA, T.G.D.; MILITÃO, G.C.G. Isolation, Characterization and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Estragole, Obtained from the Essential Oil of *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae). *An. Da Acad. Bras. De Ciências*, 87, 173–182, 2015.

ANTUNES, C. A. *et al.* Characterization of DIP0733, a multifunctional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology*, v.161, p. 639-647, 2015.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, V. 58, issue 2, p.297–304, 2006.

APARNA, M.S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 526–530, dez. 2008.

ARCANJO, D. D.; ALBUQUERQUE, A. C.; MELO-NETO B.; SANTANA, L. C.; MEDEIROS, M. G.; CITÓ, A. M. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology* 72(1), 505-509, 2012.

ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one Thousand Years ago from Urmia Lake, Iran. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, v.9, p. 113–114, 2008.

AZEVEDO, A. P. G. B.; OLIVEIRA, L. G.; RODRIGUES, R. C.; LOUREIRO, I. M. A. L.; FLATSCHART, L. B. Uso da informação de patentes para estudo dos métodos de avaliação de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao uso de animais. *Cadernos de Prospecção*, 8 (2): 213-221, 2015.

BADELL, E. *et al.* *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Res. Microbiol.* v. 171, n. 3-4, p. 122-127, 2020.

BAIO, P. V. P. *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment. Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 1, p. 23-29, 2013.

BALLS, M; COMBES, R.D.; WORTH, A.P. Alternative Toxicity Test Methods: lessons learned and yet to be learned. In *The history of alternative test methods in toxicology*. 1a ed. *United States: Elsevier Academic Press*, pag. 317-323, 2018.

BARBIERE-JUNIOR, R. C.; NETO, A. O. Camarões Marinhos: Reprodução, Maturação e Larvicultura. *Editora Aprenda Fácil*, Viçosa – MG. V.1, 2001.

BERNARD, K.A.; FUNKE G. Genus *Corynebacterium*. In *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology the Actinobacteria*, ed.5, p. 245–289, 2012.

BERNARD, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 10, p. 3152–3158, 2012.

BERNARD, K. A.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. [S.l: s.n.], 2015.

BERTUCCINI, L.; BALDASSARRI, L.; VON HUNOLSTEIN, C. Internalization of non toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 37, n. 3, p. 111-118, 2004.

Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopéia brasileira, *Anvisa*, Brasília, Brazil, 5th edition, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. Nota informativa nº 9/2019-CGDT/DEVIT/SVS/MS. Brasília, 2019.

BRODWAY, M. *et al.* Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *J. Bacteriol.*, v. 195, n.16, p. 3774–3783, 2013.

BOJARSKA, J.; BREZA, M.; REMKO, M.; CZYZ, M.; GAJOS-MICHNIEWICZ, A.; ZIMECKI, M.; KACZMAREK, K.; MADURA, I.D.; WOJCIECHOWSKI, J.M.; WOLF, W.M. Structural and Biofunctional *In sights* into the Cyclo (Pro-Pro-Phe-Phe-) Scaffold from Experimental and *In Silico* Studies: Melanoma and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7173.

BURKOVSKI, A. Diphtheria and its Etiological Agents. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Dordrecht: *Springer Netherlands*, pag. 1–14, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7624-1_1>. Acesso em: 06 de janeiro de 2023.

CAMELLO, T. C. F. *et al.* Non diphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 34, p. 39-44, 2003.

CAMPANA, R., CASETTARI, L., FAGIOLI, L., CESPI, M., BONACUCINA, G. & BAFFONE, W. Activity of essential oil based microemulsions Against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in diferente culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 241. p. 132- 40, 2017.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 18, n. 1, p. 373-382, 2016.

CANTERI DE SOUZA, P. *et al.* An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal dugs: *Tenebrio molitor*. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 125, 2018.

CARVALHO, E. B.; BORGES, É. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

- CARVALHO, R.V. *et al.* Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz. J. Infect. Dis.* v. 22, n.4, p. 347–351, 2018.
- CERDEÑO-TARRAGA, A. M. *et al.* The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic acids Res.*, v. 31, n. 22, p. 6516-6523, 2003.
- CERENIUS, L.; LEE, B.L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29: 263–271, 2008.
- CHAND, B. Structure-Bioactivity-Relationships and Crystallographic Analysis of Secondary Interactions in Pregnane-Based Steroids. *Journal Chemical Crystallography*, 41(12):1901-1926, 2011.
- CHANG, SHANG-TZEN.; CHEN, PIN-FUN.; CHANG, SHAN-CHWEN. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of ethno pharmacology*, v. 77, n. 1, p. 123-127, 2001.
- CHIBANE, L. B.; DEGRAEVE, P.; FERHOUT, H.; BOUAJILA, J.; OULAHAL, N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018.
- CHRISTO, A.G. *et al.* Local knowledge on medicinal plant gardens in a rural community near the Atlantic Rain Forest, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.20, n.4, p.494-501, 2010.
- CHOPRA, I.; LINTON, A. The antibacterial effects of low concentrations of antibiotics. *Advances in Microbial Physiology*, 1986.
- CRESCI, M *et al.* *Corynebacterium phoceense* sp. nov., strain MC1(T) a new bacterial species isolated from human urine. *New microbes and new infections*, v. 14, p. 73–82, nov. 2016.
- COX S. D.; MARKHAM J. L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *J. Appl. Microbiol*, 2007.
- De SOUZA, C.; FARIA Y.V.; SANT'ANNA, L.O *et al.*, Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110 (2) (2015) 242–248, 2007.
- COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- CUTULI, M. A.; PETRONIO PETRONIO, G.; VERGALITO, F.; MAGNIFICO, I. *et al.* *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: new developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*, 10, n. 1, p. 527-541, 2019.

DANGEL, A. et al. *Corynebacterium silvaticum* sp. nov., a unique group of NTTB corynebacteria in wild boar and roe deer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 70, n. 6, p. 3614-3624, 2020.

DAZAS, M. et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar *Belfanti* and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 68, n. 12, p. 3826-3831, 2018.

DJERIBI, R.; BOUCHLOUKH, W.; JOUENNE, T.; MENAA, B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American journal of infection control*, 40, pp. 854-859, 2012.

DOBLER, G.; BRAVENY, I. Highly resistant *Corynebacterium macginleyi* as cause of intravenous catheter related infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 22, n. 1, p. 72-73, 2002.

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23, pág. 223-29, 2013.

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

Dos SANTOS, I.V.F.; BORGES, R.S.; SILVA, G.M.; DE LIMA, L.R.; BASTOS, R.S.; RAMOS, R.S.; SILVA, L.B.; DA SILVA, C.H.T.P.; DOS SANTOS, C.B.R. Hierarchical Virtual Screening Based on Rocaglamide Derivatives to Discover New Potential Anti-Skin Cancer Agents. *Front. Mol. Biosci*, 9, 2022.

DOS SANTOS RODRIGUES, J., DE SOUZA, N., SCARANO, J., DE SOUSA, J., LIRA, M., DE FIGUEIREDO, R., DE SOUZA, E. & MAGNANI, M. Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove Young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *LWT*. 93. p. 293-99.

DOYLE, A.A.; STEPHENS, J.C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139:1-18, 2019.

EFING, L. M. A. C. Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate. *Ilexparaguaiensis* A. St-Hill. 108f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Paraná. 2008.

ESKANDAR, S et al. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium aurimucosum* UMB7769, Isolated from the Female Urinary Tract. *Microbiology resource announcements*, v. 9, n. 22, 2020.

FARIAS, D. C. C.; IMADA, L. F. Y.; KATAYAMA, L. Análise do efeito de toxicidade do chorume utilizando *A. salina*. *Revista Ciências do Ambiente On-line*, vol. 6, n. 1, p. 83-85, 2010.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC., *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FERRO, T. A. F.; ARAUJO, J.M.M.; PINTO, B.L.S.; SANTOS, J.S.; SOUZA, E.B.; SILVA, L.R.; *et al.* Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Front. Microbiol.*, 2016.

FERRO, T.A.; ARAÚJO, J.M.; PINTO, B.L.S.; SANTOS, J.S.; SOUZA, E.B.; SILVA, B.L.; MONTEIRO-NETO, V. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects Against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front. Microbiol.*, 7, 2016, 2016.

FERNÁNDEZ-NATAL, M.I. *et al.* The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical samples: clinical and microbiological data. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 27, n. 3, p. 177-184, 2008.

FERNANDEZ-ROBLAS, R *et al.* *In vitro* activity of tigecycline and 10 other antimicrobials Against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, n. 5, p. 453–455, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092485790800589X>>.

FILIMONOV, D.A.; LAGUNIN, A.A.; GLORIOZOVA, T.A.; RUDIK, A.V.; DRUZHILOVSKII, D.S.; POGODIN, P.V.; POROIKOV, V.V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chem. Heterocycl. Compd.*, 50, 444–457, 2014.

FIRMINO, D.F.; CAVALCANTE, T.A.; GOMES, G.A.; FIRMINO, N.C.S.; ROSA, L.D.; CARVALHO, M.G.; CATUNDA JR, F.E.A. Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. *The Scientific World Journal*, pag.9, 2018.

FRENZEL, C.; TESCHKE, R. Herbal hepatotoxicity: clinical characteristics and listing compilation. *International journal of molecular sciences*, 17, n. 5, p. 588-588, 2016.

FRIEDMAN, M. Chemistry, Antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of Cinnamaldehyde Against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *J Agric Food Chem*, v. 65, p.10406-10423, Dc 6, 2017.

FROLOVA, Y.N.; KHARSEYEVA, G. G.; MIRONOV, A. Y. The sensitivity to antibiotics of biofilm cultures of toxigenic strains *Corynebacterium diphtheriae*. *Klin. Lab. Diagn.*, n. 6, p. 51-53, 2014.

FUNKE, G. *et al.* Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 1124-1128, 1997.

FUNKE, G.; BERNARD, K. A. Coryneform gram-positiver ods. *In: Manual of Clinical Microbiology*, 10 ed. Washington, D.C: ASM Press, pág. 413-471, 2011.

FUX, C. A. *et al.* Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.*, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.

- GATSING, D.; MBAH, J. A.; GARBA, I. H.; TANE, P.; DJEMGOU, P.; NJI-NKAH, B. F. An anti salmonellal agent from the leaves of *Glossocalyx brevipes* Benth (Monimiaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 9, n. 1, p. 84-87, 2006.
- GHALY, A.E.; ALKOAİK, F.N. The yellow mealworm as a novel source of protein. *Am. J. Agric. Biol. Sci*, 4, 319–331, 2009.
- GHERARDI, G. *et al.* *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract infection: Case report and review of the literature. *IDCases*, v. 2, n. 2. p. 56-58, 2015.
- GOLDNER, N. K. *et al.* Mechanism of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum*. *Msphere*, v. 3, n. 4, p. e00371-18, 2018.
- GOMES, D.L *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol* 828, pág. 1419–1427, 2009.
- GOMES, D. L. R. *et al.* SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J. Med. Microbiol.*, v. 62, n. 5, p. 754-760, 2013.
- GRAF, A.C *et al.* Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Molecular & Cellular proteomics*, 18(6), pág.1036-1053, 2019.
- GRUBER, F.P.; HARTUNG, T. Alternatives to Animal Experimentation in Basic Research. *Altex Suppl*, 1:3-31.7, 2004.
- GUO, J.Y.; HUO, H.R.; ZHAO, B.S.; LIU, H.B.; LI, L.F.; MA, Y.Y; JIANG, T.L. *Cinnamaldehyde* reduces IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 activity in rat cerebral microvascular endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 537, p.174–180, 2006.
- HADFIELD, T. L. *et al.* The pathology of diphtheria. *J. Infect. Dis.*, v. 181, p. 116-120, 2000.
- HALL, C. W.; MAH, T.F. Molecular mechanisms of biofilm based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Ver*, 41:276–301, 2017.
- HELANDER, I.M. *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.3590-3595, 1998.
- HENNART, M. *et al.* Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. *Genome Med.*, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2020.
- HERRMANN, G *et al.* Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 202, n. 10, p. 1585-1592, 2010.

HIRATA JR, R. *et al.* Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheria* of different clonal groups in endocarditis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 41, p. 986-991, 2008.

HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *J. Infect. Dis.*, v. 181, n. Supplement_1, p. S156-S167, 2000.

HOQUE, N. *et al.* Physicochemical, Pharmacokinetic and Cytotoxicity of the Compounds Isolated from an Endophyte *Fusarium oxysporum*: *In Vitro* and *In Silico* Approaches. *Toxins*, 14, 159, 2022.

IFIF. *What is the global feed industry. International Feed Industry Federation Factsheet*; International Feed Industry Federation (IFIF): Wiehl, Germany, 2019; Disponível em: <https://ifif.org/wp-content/uploads/2019/06/IFIF-Fact-Sheet-October-11th-2019.pdf> (acesso em 04 de fevereiro de 2023).

JADHAV, S. *et al.* Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, v. 29, p. 125-130, 2013.

JAÉN-LUCHORO, D.; GONZALES-SILES, L.; KARLSSON, R.; SVENSSON-STADLER, L.; MOLIN, K.; CARDEW, S *et al.* *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated *Corynebacterium*. *Syst Appl Microbiol*, 43(1):126039, 2020.

JANDA, W. M. *Corynebacterium* Species and the Coryneform Bacteria: Part I: New and Emerging Species in the Genus *Corynebacterium*. *Clin. Microbiol. Newsl.*, v. 20, n. 6, p. 41-52, 1998.

JASINSKA, E.; BOGUT, A.; MAGRYS, A.; OLENDER, A. Evaluation of the role of staphylococci in the pathomechanism of conjunctivitis. *International ophthalmology*. 2021; 41(7): 2585-2600.

JIA, P.; XUE, Y.J.; DUAN, X.J.; SHAO, S.H. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and *sarA* expression. By methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*, 53:409–16. 2011.

KALT, F *et al.* *Corynebacterium* species rarely cause orthopedic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 12, p. 1–8, 2018.

KAN, H.; KIM, C.H.; KWON, H.M *et al.* Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J Biol Chem*, 283: 25316–25323, 2008.

KANG, S. J. *et al.* Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures. *PLoS One*, v. 13, n. 6, p. e 0199454, 2018.

KATES, O.; STARR, K.; BOURASSA, L. Closing the brief case: non toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in a non-healing lingual wound. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58, n. 12, p. 1–5, 2020.

KHAMIS, A.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afipia* and *Bosea* species, including a strategy for the choice of discriminative partial sequences. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 69, p.6740-6749, 2003.

- KHARE, B.; V. L. NARAYANA, S. Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria: Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Science*, v. 26, n. 8, p. 1458–1473, 2017.
- KIM, Y.G.; LEE, J.H.; KIM, S.I.; BAEK, K.H.; LEE, J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol*, 195:30–39, 2015.
- KLEBE, G. Virtual ligandscreening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, 2006.
- KLINE, K. A.; LEWIS, A. L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 2, 2016.
- KOO, H et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants Streptococci. *Curr Microbiol*. v. 41, p. 192-196, 2000.
- KONRAD, R et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro surveillance : bulletin Europeensur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v.15, ed. 43, p.19699, 2010.
- KOSTAKIOTI, M. et al. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the Dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013.
- KOT, B.; SYTYKIEWICZ, H.; SPRAWKA, I. Expression of the Biofilm-Associated Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biofilm and Planktonic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (11): 3487-3501, 2018.
- KWASZEWSKA, A. K. et al. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. *Pol. J. Microbiol.*, v. 55, n. 3, p. 189-193, 2006.
- LAGUNIN, A.A.; DUBOVSKAJA, V.I.; RUDIK, A.V.; POGODIN, P.V.; DRUZHILOVSKIY, D.S.; GLORIOZOVA, T.A.; FILIMONOV, D.A.; SASTRY, G.N.; POROIKOV, V.V. CLC-Pred: A freely available web-service for in silico prediction of human cell line cytotoxicity for drug-like compounds. *PLoS ONE*, 13, 2018.
- LAGUNIN, A.; STEPANCHIKOVA, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. PASS: Prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics*, 16, 747–748, 2000.
- LEAL, S.M.; JONES, M.; GILLIGAN, P.H. Clinical significance of comensal gram-positive rods routinely isolated from patient samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 2928–2936, 2016.
- LEITE, R.F. et al. Antimicrobial activity of crude extracts from actinomycetes against mastitis pathogens. *J DairySci.*, 01(11):10116-10125, 2018.

- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol* , 25: 697–743, 2007.
- LE, K.; PARK, M.D.; OTTO, M. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-8, 2018.
- LEYTON, B. et al. Treat me well or will resist: uptake of mobile genetic elements determine the resistome of *Corynebacterium striatum*. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 22, n. 14, p. 7499, 2021.
- LI, L.; ZHAO, Z.; LIU, H. Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. *Acta Astronaut*, 92, 103–109, 2013.
- LIAO, J.C.; DENG, J.S.; CHIU, C.S.; HOU, W.C.; HUANG, S.S.; SHIE, P.H.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 105:37-47, 2006.
- LIMA, R. K et al. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. And monoterpenes Against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ciênc. agrotec.*, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.
- LO, SEYNABOU *et al.* Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after urethroplasty stricture of the urethra: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13256-015-0638-0>>.
- LU, S.; OBIANOM, O. N.; AI, Y. Novel cinnamaldehyde-based aspirin derivatives for the treatment of colorectal cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 28, p. 2869–2874, 2018.
- LUO, L.; WANG, Q.; LIAO, Y. The Inhibitors of CDK4/6 from a Library of Marine Compound Database: A Pharmacophore, ADMET, Molecular Docking and Molecular Dynamics Study. *Mar. Drugs*, 20, 319, 2022.
- MACHADO, B. F. M T; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acadêmicos*, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.
- MAKI, D.G; WEISE, C.E; SARAFIN, H.W. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England Journal of Medicine*, 296: 1305–1309, 1997.
- MAMATOVA, A. S.; KORONA-GLOWNIAK, I.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; JÓZEFczyk, A.; WOJTANOWSKI, K. K.; BAJ, T.; SAKIPOVA, Z. B.; MALM, A. Phytochemical composition of wormwood (*Artemisia gmelinii*) extracts in respect of their antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–8, 2019.

- MANDLIK, A. *et al.* Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.*, v.16, n. 1, p. 33-40, 2008.
- MANZELLA, J. P., KELLOGG, J. A.; PARSEY, K. S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, n. 1, p. 37-40, 1995.
- MARTINS, C. A. S. *et al.* Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 104, n. 6, p. 905–913, 2009.
- MARULL, J.; CASARES, P.A. Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: a case report. *Cases J.*, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2008.
- MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. *Braz. J. Med. Biol.*, v. 24, n. 4, p. 399-406, 1991.
- MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D.; PEREIRA, G.A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes Infect* 2: 1507-1512, 2000.
- MATTOS-GUARALDI, A L; FORMIGA, L C; ANDRADE, A F. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and non fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by diferente methods. *Current microbiology*, v. 38, n. 1, p. 37–42, 1999.
- MATTOS-GUARALDI, A. L. *et al.* Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 170, p. 159-166, 1999.
- MENEZES FILHO, A. C. P.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; CHRISTOFOLI, M.; CASTRO, C. F. S. Atividade antioxidante e compostos bioativos em espécies de um fragmento de Cerrado goiano tipo cerradão. *Colloquium Agrariae*, 15(1),1-8, 2019a.
- MENEZES FILHO, A. C. P.; SOUSA, W.C.; CASTRO, C.F.S.; DE SOUZA, L. F. Composição química do óleo essencial das flores de *Myrcia guianensis*(Aubl.) DC. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 24(4), e892, 2019b.
- MEYER, B. N. *et al.* BrineShrimp: A Convenient General Bioassay for active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant research*. V. 45, p. 31-34. 1982.
- MICHALIK, M *et al.* Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological fator of laryngological infections: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2020.
- MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science* 123(3194), 464, 1956.
- MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLA, G.; DI-DELUPIS, G.D. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Research* 31(7), 1801-1806, 1997.

.MIHARA, S.; SHIBAMOTO, T. The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel, member A1) activity associated with allergies. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* V.11, p. 11, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. Brasília, DF, 2009.

MIRANDA, R. B. Citotoxicidade de alguns cimentos reparadores de perfuração radicular sobre células L 929. Dissertação, Universidade do Grande Rio, 107 f. (2007).

MORAIS, A.J.A. Avaliação da atividade antimicrobiana do cinamaldeído em isolados nosocomiais de acinetobacter baumannii resistentes a carbapenêmicos. 2018. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, [S. l.], 2018. Disponível em:https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/32343/3/2018_dis_ajamorais.pdf. Acesso em: 7 fev. 2023.

MORAES, M.N.; SILVEIRA, W.C.; TEIXEIRA, L.E.M.; ARAÚJO, I.D. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. *Revista Médica de Minas Gerais*, 23(1): 99-104, 2013.

MOREIRA, L. O.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; ANDRADE, A. F. B. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. *Arch Microbiol.*, v. 190, n. 5, p. 521-530, 2008.

MORRIS, A.; GUILD, I. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Rev. Infect. Dis.*, v. 13, n. 5, p. 887-892, 1991.

MOUSAVI, F *et al.* Cinnamaldehyde characterization as an antibacterial agent toward *E. coli* metabolic profile using 96-blade solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of proteome research*, v. 15, n. 3, p. 963-975, 2016.

MUNIAN, M. A. *et al.* *Corynebacterium jeikeium* osteomyelitis successfully treated with teichoic acid. *J. Infect.*, v. 35, n. 3, p. 325-326, 1997.

NADELL, C.D.; DRESCHER, K.; FOSTER, K.R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 589–600, 2016.

NGUYEN, Q. H *et al.* Characterization of endophytic *Streptomyces griseorubens* MPT42 and assessment of antimicrobial synergistic interactions of its extract and essential oil from host plant *Litsea cubeba*. *Antibiotics*, 8(4), 2019.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol*, 56:519–23, 2007.

NUNES, B.S.; CARVALHO, F.D.; GUILHERMINO, L.M.; STAPPEN, G.V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144(2), 453-456, 2006.

OLENDER, A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy* 59: 294–306, 2013.

OLENDER, A. *et al.* A novel approach to study the effect of ciprofloxacin on biofilms of *Corynebacterium* spp. using confocal laser scanning microscopy. *Pol. J. Microbiol.*, v. 67, n. 4, p. 431, 2018.

OLENDER, A.; NIEMCEWICZ, M. Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin B–Constitutive-Type Resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Isolated from Upper Respiratory Tract Specimens. *Microb. Drug Resist.*, v. 16, n. 2, p. 119-122, 2010.

OLIVEIRA, Alberto *et al.* Insight of Genus *Corynebacterium*: A scertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. *Frontiers in Microbiology*. [S.l: s.n.], 2017.

de OLIVEIRA SANT'ANNA *et al.* *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov.: a new species of *Corynebacterium* from human infections. *Braz J Microbiol*, 2023.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, v. 34, n. 5, p. 877-886, 2015.

OLSON, M.E.; CERİ, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.*, v. 66, p.86-92, 2002.

ORDÓÑEZ-PALAU, S.; BOQUET, D. Chronic osteomyelitis of the metatarsals amoid due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with rheumatoid arthritis. *Join Bone Spine*, v. 74, n. 5, p. 509-517, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Quality control methods for medicinal plants methods. 1998. p. 41 – 43.

OTT, L. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiol.*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010.

PARRA, A.L., YHEBRA, R.S., SARDINANS, I.G., BUELA, I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the médium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plantextracts. *Revista Cubana Planta Médica*, 8, 395-400. 2001.

PARTE, A.C.; SARDÀCARBASSE, J. MEIER-KOLTHOFF, J.P.; REIMER, L.C.; GÖKER M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(11):5607–12, 2020.

PATEL, NIKUNJ B; PATEL, LENSIN; PATEL, KHUSHI D; PATEL, MAITRI V; KALASARIYA, HARESH S. Admet and cytotoxicity prediction of red seaweed *Gracillaria dura*: an *in silico* approach. *World Journal of Pharmaceutical Research*, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 991-1004, 11 fev. 2020.

PATEY, O.; BIMET, F.; EMOND, J. P.; ESTRANGIN, E.; RIEGEL, P. H.; HALIOUA, B. *et al.* Antibiotic susceptibilities of 38 non-toxinogenic strains of *Corynebacterium diphtheria*. *J*

Antimicrob Chemother., v.36, n.6, p.1108-1110, 1995.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. *J. Med. Microbiol.*, v. 65, n. 11, p. 1311-1321, 2016.

PRETE, D. D. *et al.* Encrusted cystitis by *Corynebacterium urealyticum*: a case report with novel insights into bladder lesions. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 23, n.8, p. 2685-2687, 2008.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Invasion of endotelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheria*. *Microbiol.*, v. 160, p. 537-546, 2014.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Functional characterization of the collagen-binding protein DIP2093 and its influence on host– pathogen interaction and arthritogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol.*, v.163, p. 692–701, 2017.

PEREIRA, W.A *et al.* New Insights into the Antimicrobial Action of Cinnamaldehyde towards *Escherichia coli* and Its Effects on Intestinal Colonization of Mice. *Biomolecules*, 11, 302, 2021.

QIN, L. *et al.* Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. Isolated from blood cultures from hospitalized patients in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, p. JJID. 2015.530, 2017.

RADUCKA, A.; ŚWIĄTKOWSKI, M.; KORONA-GŁOWNIAK, I.; KAPROŃ, B.; PLECH, T.; SZCZESIO, M.; GOBIS, K.; SZYNKOWSKA-JÓŹWIK, M.I.; CZYŁKOWSKA, A. Zinc Coordination Compounds with Benzimidazole Derivatives: Synthesis, Structure, Antimicrobial Activity and Potential Anticancer Application. *Int. J. Mol. Sci.*,23, 6595, 2022.

RALPH, A.C.L.; FERREIRA, S.B.; FERREIRA,V.F.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C. Avaliação da citotoxicidade de naftoquinonas sintéticas em modelo de *Artemia* Francisca na eritrócitos. *61ª Reunião Anual da SBPC*; 2009 July 12-17;Manaus;Brasil, 2009.

RAMOS, J. N. *et al.* Blood stream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect. Dis.* v. 19, n. 1. p. 1-11, 2019.

RANGANATHA, N.; KUPPAST, I.J. A review on alternatives to animal testing methods in drug development. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 4:28-32.6, 2012.

REDDY, B. S *et al.* Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J Med Microbiol.*, v.30, n.1, p.52-57, 2012.

RENOM, F. *et al.* Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonar disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, n. 6, p. 2064–2067, 2007.

REZENDE, M. A. S. (2018). Avaliação Nutricional e Toxicológica da Farinha da Larva de *Tenebrio molitor* (Master's Thesis). Federal Institute of Education, Science and Technology from Southeast of Minas Gerais, Graduate program of Food Science and Technology, Rio Pomba.

RIBEIRO, L.P.; DOMINGUES, V.C.; GONÇALVES, G.L.P.; FERNANDES, J.B.; GLÓRIA, E.M.; VENDRAMIM, J.D. Essential Oil from *Duguetia anceolata* St.-Hil. (Annonaceae): Suppression of Spoilers of Stored-Grain. *Food Biosci*, 36, 100653, 2020.

ROGIERS, G.; BINIAM, T.; KEBEDE, A.; VAN LOEY, C.; MICHIEL, W. Membrane fatty acid composition as a determinant of *Listeria monocytogenes* sensitivity to *trans-cinnamaldehyde*. *Research in Microbiology*, v. 168 (6), p.536-546, 2017.

RIEGER, K.A.; SCHIFFMAN, J.D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, Ed. 113, p.561-568, 2014.

ROGIERS, G.; BINIAM, T.; KEBEDE, A.; VAN LOEY, C.; MICHIEL, W. Membrane fatty acid composition as a determinant of *Listeria monocytogenes* sensitivity to *trans-cinnamaldehyde*. *Research in Microbiology*, v. 168 (6), p. 536-546, 2017.

ROSA, C. S *et al.* Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*. v.18, n. 1, p.19-26, 2016.

SABBADINI, P. S. *et al.* Fibrinogen binds to non toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 706-711, 2010.

SABBADINI, P. S. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. *Microb. Pathog.*, v. 52, p. 165-176, 2012.

SABINO, Y. N.V *et al.* Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>>.

SANGAL, V. *et al.* Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane associated and secreted proteome. *BMC Genomics*, v.16:765, 2015.

SANTOS, C. S. *et al.* Non-opsionic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiol. Immunol.*, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2010.

SANCHEZ ELUCHANS, Nahuel *et al.* *Corynebacterium kroppenstedtii* breast infections: Report of four cases. *Revista Argentina de Microbiologia*, n. xxxx, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.002>>.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares e *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*. v. 37, p. 803-808, 2007.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 275-80, 2004.

- SCHIAR, V. P. P.; SANTOS, D. B.; LÜDTKE, D. S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M. W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 21, 139, 2007.
- SCHMIDT, H; et al. Effect of surface modifications of intraocular lenses on the adherence of *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriologie* 287:135-45, 1998.
- SCHIFFL, H.; MÜCKE, C.; LANG, S.M. Exit-site infections by non-diphtheria corynebacteria in CAPD. *Perit Dial Int* 24(5):454-9, 2004.
- SCHRÖDER, J. et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2012.
- SEVERINO, R. P. Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas. 2008.
- SHARIFF, M.; ADITI; BERI,. *Corynebacterium striatum*: an emerging respiratory pathogen. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 12, n. 7, p. 581–586, 2018.
- SHARMA, S.V.; HABER, D.A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer*, 10, 241–253, 2010.
- SHEN, S.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; LIN, S.; XU, J.; YE, H. Effects of cinnamaldehyde 480 on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control*, 47: 481 196–202, 2015.
- SHREAZ; S.; BHATIA, R.; KHAN, N.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Influences of cinnamaldehydes on H + extrusion activity and ultra structure of *Candida*. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 232-240, 2013.
- SHREAZ, S.; WANI, W. A.; BEHBEHANI, J. M.; RAJA, V. *et al.* Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, p. 116-131, 2016.
- SIEMIANOWSKA, E.; KOSEWSKA, A.; ALJEWICZ, M.; SKIBNIEWSKA, K.A.; POLAK-JUSZCZAK, L.; JAROCKI, A.; JEDRAS, M. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agric. Sci*, 4, 287–291, 2013.
- SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17: 439 – 447, 2000.
- SILVA, C. S.; FIGUEIREDO, S.; DE OLIVEIRA, P. V.; DE SILVA SAMINEZ, W. F. *et al.* "Óleo" essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. *Revista de Investigação Biomédica*, 9, n. 2, p. 192-197, 2018.
- SISON-YOUNG, R. L.; LAUSCHKE, V. M.; JOHANN, E.; ALEXANDRE, E. *et al.* A multicenter assessment of single-cell models aligned to standard measures of cell health for prediction of acute hepatotoxicity. *Archives of toxicology*, 91, n. 3, p. 1385-1400, 2017.

SMITH, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 57, n. 10, p. 1539-1550, 2005.

SONNENWIRTH, A.C. Bacteriemia: alcance de problema. Trad. do inglês por *Editorial Médica Panamericana*, 1975.

SORIANO, F.; HUELVES, L.; NAVES, P.; RODRÍGUEZ-CERRATO, V.; PRADO, G DEL.; RUIZ, V.; PONTE, C. *In vitro* activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *J Antimicrob Chemother* 63:353–356, 2003.

SOUZA, C. *et al.* Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p. 242-248, 2015a.

SOUZA, C.D.; FARIA, Y.V.; SANT'ANNA, L.D.E.O; VIANA, V.G; SEABRA, S.H; SOUZA, M.C.; VIEIRA, V.V.; HIRATA JÚNIOR, R.; MOREIRA, L.D.E.O.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 242-8, 2013.

SOUZA, M.C.; SANTOS, L.S.; GOMES, D.L.; SABBADINI, P.S.; SANTOS, C.S.; CAMELLO, T.C.; ASAD, L.M.; ROSA, A.C.; NAGAO, P.E.; HIRATA R. JR.; GUARALDI A.L. Biofilm formation and fibrinogen and fibronectin binding activities by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* invasive strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*7: 1387-99, 2015b.

STEPANOVIĆ *et al.* Formação de biofilme por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em superfície de plástico. V, 38, ed. 5, pag. 428-432, 2004.

STEWART, P.S. *et al.* Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n. 2, p. 836-838, 2000.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 199-210, 2008.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multidrug resistant human pathogens. *3 Biotech*, 7(3), 1–15, 2017.

SUBRT N, MESAKL R, DAVIES J. Modulation of virulence gene expression. By cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother*, 66(5):979-984, 2011.

SUED-KARAM, B.R *et al.* Biofilm Formation in Bovine Pericardium Biomaterial by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Nosocomial Blood Isolates. *International Journal of Science and Research Methodology*, 21(1): 13-32, 2022.

SUWALSKY, M.; VARGAS, P.; AVELLO, M.; VILLENA, F. *et al.* Human erythrocytes are affected *in vitro* by flavonoids of *Aristolochia achilensis* (Maqui) leaves. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, n. 1-2, p. 85-90, 2008.

- SZEMRAJ, M.; KWASZEWSKA, A.; SZEWCZYK, E. M. New gene responsible for resistance of clinical *Corynebacteria* to macrolide, lincosamide and streptogramin. *B. Pol. J. Microbiol.*, v. 67, n. 2, p. 237-240, 2018.
- TAUCH, A. et al. Insights into the genetic organization of the *Corynebacterium diphtheriae* erythromycin resistance plasmid pNG2 deduced from its complete nucleotide sequence. *Plasmid*, v. 49, n. 1, p. 63-74, 2003.
- TEIXIDO, J; ARIAS, N; TARRATS, L; ROMERO, R. The microbial pattern of the catheter exit-site infection in peritoneal dialysis: a nondiphtheria corynebacteria emergence? *Nefrologia* 27, 350–358, 2007.
- TROST, E. et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J. Bacteriol.*, v. 194, n. 12, p. 3199-3215, 2012.
- TROST, E; GÖTKER, S. et al. Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1) isolated from a vaginal swab of a Woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2010.
- TROST, Eva; OTT, Lisa; et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, 2010.
- TSINZERLING, A. V. et al. Tonsils in diphtheria and the *Corynebacterium diphtheriae* carrier state. *Arkh. Patol.*, v. 42, n. 8, p. 75-80, 1980.
- UPADHYAY, A.; VENKITANARAYANAN, K. *In vivo* efficacy of transcinamaldehyde, carvacrol, and thymol in attenuating *Listeria monocytogenes* infection in a *Galleria mellonella* model. *J. Nat. Med.*, 2016.
- UTCHARIYAKIAT, et al. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC ComplementAlternMed*, V.1, p.158, 2016.
- VALE, I.N.F. Aspecto celulares e moleculares da adesão em isolados clínicos de *Candida spp*, Tese de mestrado Pró- reitoria de pesquisa, Universidade Ceuma, São luis, MA, 76pp., 2013.
- VASCONCELOS, N.G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog*, 120:198-203, 2018.
- VIANA, P et al. Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. Essential oil Against *Corynebacterium ulcerans*. *Ciência e Natura* 42: e9, 2020.
- VISVALINGAM, J; HERNANDEZ-DORIA J.D; HOLLEY R.A. Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Applied Environmental Microbiology*, v. 79, p. 942–950, 2013.

WAGENLEHNER, F.M.E, NABER, K.G. Treatment of Bacterial Urinary Tract Infections: Presence and Future. Review - *Infections.EurUrol*, 49: 235-44, 2006.

WADOOD, A.; AJMAL, A.; JUNAID, M.; REHMAN, A.U.; UDDIN, R.; AZAM, S.S.; KHAN, A.Z.; ALI, A. Machine Learning-based Virtual Screening for STAT3 Anti câncer Drug Target. *Curr. Pharm. Des*, 28, 3023–3032, 2022.

WANG, C. C.; MATTSON, D.; WALD, A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in boné marrow transplant patients with Hickman catheters. *Bone Marrow Transplant*, v. 27, n. 4, p. 445-449, 2001.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; SHI, Y.Q.; PAN, X.H.; LU, Y.H.; CAO, P. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Pathog*, 116, 26–32, 2018.

WIRTANEN, G; HUSMARK, U; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with Bacillus biofilm after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing system. *J Food Protection, Des Moines* 59: 727-733, 1996.

WONG, T. P.; GROMAN, N. Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, v. 43, p. 1114-1116, 1984.

XING, F. *et al.* Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control*, v. 46, p. 343–350, 2014.

YASSIN, A. F.; STEINER, U.; LUDWIG, W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* collins and Jones (1983). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 1001–1005, 2002.

ZAKIKHANY, K.; NEAL, S.; EFSTRATIOU, A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovarmitis in the United Kingdom, 2003-2012. Euro surveillance: bullet in Europe ensurles maladies transmissibles = Europe an communicable disease bulletin, v. 19, n. 22, 2014.

ZASADA, A. A.; MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. Causing infections in human. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 66, n. 6, p. 472-483, 2018.

ZHANG, YUNBIN *et al.* Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, v. 59, p. 282-289, 2016.