



## Potencial antimicrobiano e antibiofilme de *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. e a associação com antimicrobianos comerciais

Antimicrobial and antibiofilm potential of *Eucalyptus globulus* and *Mentha piperita* L. and the association with commercial antimicrobials

J. A. Resende; E. N. R. Fontes; R. C. Rosa; L. D. Gava; F. J. N. Fernandes; M. D. C. Ignacchiti\*

Departamento de Farmácia e Nutrição, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 29500-000, Alegre-ES, Brasil

\*mariana.ignacchiti@ufes.br

(Recebido em 09 de junho de 2022; aceito em 03 de novembro de 2022)

O uso inadequado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária resulta na seleção de linhagens multirresistentes, que se tornaram um problema de saúde e impõe a busca por fatores seguros e eficazes que possam ser utilizados no tratamento de infecções bacterianas persistentes. Neste contexto, estudos com plantas e utilização em terapias combinatórias têm sido recentemente estimulados. Este estudo objetiva avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme dos óleos essenciais (OE) de *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e as interações destes com antimicrobianos comerciais. O potencial antimicrobiano foi avaliado pelo método de difusão de disco e a Concentração Mínima Inibitória (CMI) determinada por microdiluição em caldo. A habilidade de formação de biofilmes foi avaliada em microplaca de 96 poços, utilizando metodologia de cristal violeta. Os ensaios de associação entre os OE e os antimicrobianos foram realizados pelo método de difusão de disco. As linhagens bacterianas apresentaram sensibilidade aos OE testados, exceto *P. aeruginosa*. Os OE ainda foram capazes de inibir a adesão de células bacterianas no primeiro estágio de formação do biofilme em todas as bactérias testadas. Em relação à associação com antimicrobianos, foram observadas um total de 14 interações, sendo 11 sinérgicas e 3 antagônicas. O maior número de interações sinérgicas (8) foi observado contra linhagens Gram-negativas, ao passo que as interações antagônicas foram observadas somente contra Gram-positiva (3). Foram observadas 4 interações sinérgicas contra *P. aeruginosa*, um achado relevante visto que esta espécie se mostra com resistência intrínseca às drogas.

Palavras-chave: óleos essenciais, biofilme, resistência bacteriana.

The inappropriate use of antimicrobials in human and veterinary medicine results in the selection of multidrug-resistant strains, which have become a health problem and imposes the search for safe and effective factors that can be used in the treatment of persistent bacterial infections. In this context, studies with plants and their use in combinatorial therapies have been recently stimulated. This study aims to evaluate the antibacterial and antibiofilm potential of essential oils (EO) from *Eucalyptus globulus* and *Mentha piperita* L. against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and their interactions with commercial antimicrobials. The antimicrobial potential was evaluated by the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) determined by broth microdilution. The biofilm formation ability was evaluated in a 96-well microplate, using crystal violet methodology. Association assays between EO and antimicrobials were performed using the disk-diffusion method. The bacterial strains showed sensitivity to the EO tested, except for *P. aeruginosa*. The EO were still able to inhibit the adhesion of bacterial cells in the first stage of formation in all bacteria tested. Regarding the association with antimicrobials, the interactions varied according to the EO and the bacterial strain tested. A total of 14 interactions were observed, being 11 synergistic and 3 antagonistic. The highest number of synergistic interactions (8) was observed against Gram-negative strains, whereas antagonistic interactions were observed only against Gram-positive (3). Four synergistic interactions were observed against *P. aeruginosa*, a relevant finding since this species shows intrinsic drug resistance.

Keywords: essential oils, biofilm, bacterial resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções microbianas são uma das principais causas de doenças nos últimos anos, sendo que os quadros de sepses são responsáveis por aproximadamente 20% das mortes em todo o mundo [1]. Além disso, o surgimento e disseminação de patógenos resistentes a medicamentos continuam a ameaçar nossa capacidade de tratar infecções comuns [2].

A resistência microbiana tem se tornado o principal problema de saúde pública mundial, representando um risco à qualidade de vida, comprometendo o orçamento dos sistemas de saúde, gerando hospitalização prolongada e um aumento das infecções hospitalares [2]. Recentemente a WHO inseriu a resistência aos antimicrobianos entre as dez ameaças à saúde global [3].

Embora mais preocupante no contexto hospitalar, o fenômeno da resistência antimicrobiana também se difunde entre micro-organismos comunitários causadores de infecções de alta prevalência, como é o caso das infecções urinárias, do trato respiratório e de pele/partes moles. As principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em todo o mundo incluem infecções por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli* (ESKAPE-E). O acrônimo ESKAPE-E incorpora bactérias com resistência intrínseca relevante e capacidade expansiva de adquirir resistência a vários medicamentos [4]. Além disso, estes micro-organismos têm fatores de virulência que contribuem para desenvolvimento de infecções crônicas e ou persistentes, como formação de biofilmes. A dose terapêutica utilizada pela farmacoterapia tradicional em bactérias planctônicas geralmente são ineficazes para tratar os biofilmes, uma vez que a concentração de antimicrobianos necessária para erradicar bactérias com este fenótipo pode ser cerca de 100 a 1000 vezes maior [5]. Desta forma, é essencial projetar estratégias originais e inovadoras que possam erradicar ou prevenir infecções associadas a biofilmes [4, 5].

Apesar dos esforços para conter a resistência aos antibióticos, através de políticas de uso racional de antimicrobianos e redução do uso de antimicrobianos no campo veterinário e agrícola, a situação tem apresentado uma piora constante [6]. Na última década, as procuras por novas drogas antimicrobianas têm voltado à atenção para fontes naturais, com toxicidade seletiva e capacidade de inibir o crescimento microbiano eficientemente, ampliando as possibilidades de terapia medicamentosa contra infecções [7]. Neste sentido, os óleos essenciais (OE) podem ser alternativas naturais interessantes, uma vez que são substâncias geralmente reconhecidas como seguras. Os OE possuem compostos biologicamente ativos em sua composição que são responsáveis por suas propriedades antimicrobianas contra patógenos humanos, tanto na forma planctônica quanto estabelecidos em biofilme [7, 8].

A atividade antibacteriana dos OE, como *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L., tem sido relacionada com sua composição. Terpenos e outros derivados dos OE são capazes de interagir com diferentes moléculas alvo e afetar funções das células microbianas [7]. De modo geral, para os OE são relatados diferentes mecanismos de ação e estas, alterações na bioquímica celular resultam no comprometimento da viabilidade bacteriana [9]. O amplo espectro de alvos bacterianos afetados pelos OE reflete o potencial antimicrobiano desses compostos.

Na prática clínica, a antibioticoterapia combinada é utilizada na tentativa de ampliar o espectro bacteriano e evitar o surgimento de linhagens resistentes [10]. Neste sentido, a combinação de drogas sintéticas com OE pode aumentar significativamente a atividade dessas substâncias e otimizar a efeito inibidor no crescimento microbiano, tornando-se uma alternativa inovadora aos protocolos de tratamento antimicrobianos [7, 11]. A combinação também pode melhorar a biodisponibilidade dos agentes combinados, promover uma redução do tempo de uso e dosagem terapêutica dos antibióticos, diminuir os efeitos adversos da terapia e também os problemas ambientais causados pela lenta degradação/decomposição dos compostos sintéticos [12].

O potencial sinérgico de OE com antimicrobianos sintéticos já foi demonstrada anteriormente. Em estudo conduzido por Benameur et al. (2018) [13], o OE de *Thymus vulgaris* em combinação com cefotaxima mostrou uma ação sinérgica contra linhagens resistentes de *E. coli* e efeito aditivo contra *Enterobacter cloacae*. Ainda, Rosato et al. (2018) [14] observaram

efeito sinérgico do OE de *M. piperita* com a gentamicina resultando na inibição do crescimento de várias bactérias Gram-positivas e negativas. Desta forma, o presente estudo se propõe a investigar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos OE de *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. e a associação in vitro destes com antibióticos utilizados na rotina clínica (ciprofloxacino, gentamicina e penicilina G) contra linhagens bacterianas envolvidas em infecções comunitárias e hospitalares.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e caracterização química dos óleos essenciais

Os OE avaliados (Tabela 1) foram obtidos da By Samia (<http://www.bysamia.com.br/>, By Samia, São Paulo – SP). A composição e caracterização química dos OE foi cedida pela própria empresa.

Tabela 1: Óleos essenciais avaliados.

Óleo essencial	Nome popular	Componente (%)	Densidade (20 °C g/cm <sup>3</sup> ou g/ml)	Lote
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Cineol (80,0), alfa-pineno (10,66), globulol (5,33), aromadendreno (1,63)	0,914	051604BS
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã-pimenta ou Menta	Mentol (43,45), mentona (23,15), cineol (18,0), mentofurano (3,0), isomentona (3,95).	0,904	371555BS

### 2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

As linhagens padrão utilizadas no estudo foram os bacilos Gram-negativos, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); e cocos Gram-positivos, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado de acordo com a técnica de difusão de disco, método de disco-difusão, segundo metodologia do CLSI (2019) [15] com modificações conforme descritas. Colônias isoladas de cada linhagem bacteriana foram suspensas em solução salina 0,9% estéril e a turvação ajustada à escala 0,5 de McFarland. Em seguida, as suspensões bacterianas foram inoculadas em Ágar Mueller-Hilton (AMH). Sobre as placas foram adicionados discos de papel estéreis (Whatman disc 6 mm de diâmetro) impregnados com 10 µL de cada OE, separadamente. Como controle de técnica foi utilizado discos comerciais impregnados com ciprofloxacino (5 µg), penicilina G (10 U) e gentamicina (10 µg). As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por 18-20 horas, o halo de inibição de crescimento bacteriano foi quantificado com o auxílio de um paquímetro e expresso em milímetros (mm). Os graus de inibição de crescimento bacteriano promovido pelo OE foram classificados em, sem inibição, se o halo foi < 6 mm; moderadamente inibitório, se 7-13 mm; e fortemente inibitório, se > 13 mm [16]. Todos os testes foram realizados em triplicata e dois ensaios independentes foram realizados.

### 2.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A determinação da CMI foi realizada de acordo com o método de microdiluição em meio líquido, segundo metodologia do CLSI (2015) [17], com modificações. Para a preparação do inóculo foi utilizada uma colônia isolada a partir do meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA). A colônia isolada foi transferida para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubada a temperatura  $35 \pm 2$  °C por 8 horas. Em seguida, o inóculo foi ajustado para  $1 \times 10^6$  UFC/mL em caldo Mueller-Hinton (CMH). O ensaio foi realizado em triplicata, em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo. Em cada poço foram adicionados 100 µL do inóculo. As soluções de OE foram preparadas em 0,2% de Tween 80. Diluições seriadas 1:2 da solução de OE foram preparadas em CMH e foram adicionadas a cada poço, variando a concentração de 1,56 a 100 mg/mL (0,15-10% v/v). O volume final de reação foi de 200 µL. Após a montagem, a microplaca foi incubada a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. Como controle de crescimento (CC) foram adicionados 100 µL de CMH acrescido de 0,2% Tween 80 e 100 µL do inóculo. O controle de técnica (CT) utilizado foi o antimicrobiano gentamicina na concentração de 4 µg/mL. Também foi feito o controle de esterilidade do ensaio (CN), poço contendo somente CMH. Todos os controles foram submetidos às mesmas condições de cultivo das soluções testes. A formação de pellets no fundo dos poços foi observada após 24 horas. Os pellets foram medidos com o auxílio de um paquímetro. O ensaio para determinação da CMI é considerado válido quando: o CC apresenta botão de crescimento/pellet  $\geq 2$  mm no fundo do poço ou presença de turbidez; o CN apresenta ausência de turbidez e de crescimento após o plaqueamento dos poços. A CMI é definida pelo poço com menor diluição da substância que apresente ausência de crescimento [17].

Após o teste de microdiluição foi feito o subcultivo dos poços da CMI do OE, do CT, CN e CC em ágar nutriente estéril. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 18-24 horas. O resultado foi definido pela presença ou ausência da formação de colônias, sendo o efeito inibidor do óleo classificado como bacteriostático ou bactericida, respectivamente.

### 2.4 Efeito dos óleos essenciais sobre a formação do biofilme

O efeito dos OE na formação de biofilme foi avaliado como descrito por Jadhav et al. (2013) [18], com modificações. O inóculo foi preparado em CMH na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. O ensaio foi realizado em triplicata em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Em cada poço foram adicionados 100 µL da solução de OE na concentração de  $\frac{1}{2}$  CMI. As soluções contendo os OE foram preparadas em CMH acrescido com 5% de DMSO. Em seguida foram adicionados 100 µL do inóculo. O volume final de reação foi de 200 µL. Como controle positivo foi feita a incubação de 100 µL de inóculo e 100 µL CMH acrescido com 5% de DMSO. Foram realizados dois controles: I) 200 µL de CHM; II) 100 µL CMH e 100 µL da solução  $\frac{1}{2}$  CMI em 5% de DMSO. A microplaca foi incubada a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. A formação do biofilme foi avaliada pelo ensaio de cristal violeta (CV) [18]. Após as 24 horas de incubação, o meio foi descartado e a microplaca lavada três vezes com solução salina estéril (0,9%) para remoção de células não aderentes. As células aderentes foram fixadas pela adição de 150 µL de metanol 96% por 15min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 µL de CV (1%). Após 15min, a microplaca foi novamente lavada com solução salina estéril e seca à temperatura ambiente. O CV foi ressolubilizado com 200 µL da solução etanol:acetona (8:2) e a absorbância medida no comprimento de onda 590 nm usando um Multiskan Spectrum (Multiskan™ Sky; Thermo Fisher Scientific, Japan).

As porcentagens de inibição da formação do biofilme na presença do OE foram calculadas empregando a razão entre os valores da Abs 590 nm na presença e ausência do OE. A caracterização fenotípica da formação de biofilme foi feita pela comparação da Absorbância do biofilme (AbsB), para cada linhagem após 24h de incubação, com a respectiva Absorbância do controle positivo (AbsC). Os resultados foram classificados como: não produtor de biofilme, quando  $AbsB \leq AbsC$ ; fraco produtor de biofilme, quando  $AbsB \leq 2x AbsC$ ; produtor moderado de biofilme, quando  $2x AbsC < AbsB \leq 4x AbsC$ ; forte produtor de biofilme quando  $AbsB > 4x AbsC$  [19].

## 2.5 Atividade antimicrobiana após associação dos óleos essenciais com os antimicrobianos comerciais

O estudo da possível interferência dos OE sobre os antimicrobianos comerciais (AM) foi realizado pela técnica de difusão em disco [20, 21]. Os OE foram testados na concentração correspondendo a CMI. Placas de Petri contendo AMH foram inoculados com a suspensão bacteriana ajustada ao padrão 0,5 da escala McFarland. Sobre as placas foram adicionados discos de AM: ciprofloxacino (5 µg), penicilina G (10 U) e gentamicina (10 µg). Em seguida, os discos foram impregnados com 10 µL da CMI dos OE, separadamente. Para a linhagem com CMI >10% (v/v) foi adicionado 10 µL do OE puro. As placas foram incubadas a 35±2° C por 18-20 horas, o halo de inibição de crescimento bacteriano foi quantificado com o auxílio de um paquímetro e expresso em milímetros (mm). Após incubação foi observada a interferência da CMI dos OE sobre o efeito dos AM. Foi considerado efeito sinérgico quando o halo de inibição do crescimento bacteriano formado pela associação de OE e AM apresentou diferença de diâmetro  $\geq 2$  mm, em comparação com o halo de inibição de crescimento bacteriano formado pelo AM isoladamente. Um efeito antagônico foi considerado quando o halo de inibição formado pela associação de OE e AM apresentou diâmetro menor do que o desenvolvido pela ação do AM isolado. Um efeito indiferente foi considerado quando o diâmetro do halo de inibição do crescimento da associação OE e AM for igual, ou 1 mm maior, do que o halo formado pelo AM isolado [20]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos através da média. Para demonstrar que o emulsificante não interfere na atividade do AM foi feito um controle com 10 µL de 0,2% de Tween 80 sobre o disco dos AM. Também foi feito um controle negativo colocando 10 µL de 0,2% de Tween 80 sobre um disco de papel de filtro, para demonstrar que o emulsificante não interfere no crescimento bacteriano. Adicionalmente foi feito teste de difusão em disco das CMI dos OE sobre cada espécie bacteriana.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística do ensaio de atividade antibiofilme foi realizada no programa estatístico GraphPad Prism 5 através do uso do teste *One-way* ANOVA, seguido da análise *post-hoc* Dunnett's para comparações múltiplas. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Potencial antimicrobiano e antibiofilme dos óleos essenciais

A triagem preliminar da atividade antimicrobiana *in vitro* dos OE de *E. globulus* e *M. piperita* foi estudada contra cinco micro-organismos de importância clínica humana utilizando a técnica de difusão de disco. Os resultados mostraram variações nas propriedades antimicrobianas dos OE (Tabela 2). Ao avaliar o OE de *E. globulus* nota-se uma forte inibição sobre *E. faecalis* e *E. coli*, moderada para *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Para o OE de *M. piperita*, forte inibição foi observado para *S. aureus* e *E. coli*, moderada para *E. faecalis* e *K. pneumoniae*. Através da técnica de difusão de disco, não foi observada a inibição de *P. aeruginosa* contra os dois OE avaliados.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OE) *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita*.

Micro-organismo	Zona de inibição (mm)*	
	<i>E. globulus</i>	<i>M. piperita</i>
<i>P. aeruginosa</i>	6,33 ± 0,29	6,33 ± 0,58
<i>E. coli</i>	14,0 ± 0,82	13,67 ± 1,25
<i>K. pneumoniae</i>	11,33 ± 0,94	8,67 ± 0,47
<i>E. faecalis</i>	14,67 ± 5,90	9,33 ± 0,94
<i>S. aureus</i>	11,33 ± 1,25	16,0 ± 0,82

\*Os dados são apresentados como média ± desvio padrão das zonas de inibição de crescimento após 18-20 horas de incubação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, em dois ensaios independentes.

Estudos anteriores realizados com o OE de *E. globulus* relatam halo de inibição inferior para *S. aureus* e nenhuma inibição contra linhagens de *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* [22, 23]. O OE de *M. piperita* promoveu uma maior inibição do crescimento sobre *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*, do que relatada em estudos anteriores [24, 25]. Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo para o óleo de *M. piperita* sobre as cepas *E. coli* e *S. aureus* foi relatado por Chraibi et al. (2021) [26]. Os autores atribuíram a propriedade antimicrobiana do óleo à presença do monoterpene oxigenado mentol (46,3%), que induz danos à membrana celular do micro-organismo [26]. Destaca-se que o óleo do presente trabalho possui 43,45% de mentol em sua composição (Tabela 1).

Sugere-se que a variação da atividade antimicrobiana entre os estudos pode ser relacionada com a composição química do OE; a presença de interações entre os componentes ativos do OE; característica lipofílica e sua dispersão no meio de cultura; e ainda a variação do potencial antimicrobiano em função das linhagens avaliadas [9, 16].

Dados quantitativos da atividade antimicrobiana dos OE foram obtidos através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Foram testadas sete concentrações decrescentes, partindo de 100 mg/mL até 1,56 mg/mL (10% a 0,15% v/v). Após a determinação da CMI, as linhagens bacterianas foram subcultivadas para verificação do tipo de ação inibitória exercida pelos OE. A CMI e a classificação em bacteriostática e bactericida dos OE estudados são mostradas na Tabela 3. Ressalta-se que na maior concentração testada não foi observado inibição do crescimento de *E. coli*, portanto a CMI foi definida como >100 mg/mL (>10%).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima e ação inibitória dos óleos essenciais (OE) de *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita*.

Micro-organismo	<i>E. globulus</i>		<i>M. piperita</i>	
	CMI	Ação	CMI	Ação
<i>P. aeruginosa</i>	50mg/mL (5%)	Bacteriostática	12,5mg/mL (1,25%)	Bacteriostática
<i>E. coli</i>	>100 mg/mL (>10%)	ND	12,5mg/mL (1,25%)	Bacteriostática
<i>K. pneumoniae</i>	12,5mg/mL (1,25%)	Bacteriostática	6,25mg/mL (0,63%)	Bacteriostática
<i>E. faecalis</i>	1,56mg/mL (0,15%)	Bacteriostática	1,56mg/mL (0,15%)	Bacteriostática
<i>S. aureus</i>	12,5mg/mL (1,25%)	Bacteriostática	1,56mg/mL (0,15%)	Bacteriostática

CMM: Concentração mínima inibitória. ND: não determinada

As CMI encontradas para os dois OE tiveram efeito bacteriostático sobre todas as linhagens testadas (exceção de *E. globulus* contra *E. coli*). Esta atividade bacteriostática indica que há uma inibição do crescimento bacteriano, mantendo-o na fase estacionária quando em contato com a substância teste [27]. Ainda, a partir da análise da microdiluição é possível notar que a atividade antibacteriana dos OE foi mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas, apresentando

menores valores de CMI (Tabela 3). Estudos sugerem que em comparação às Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos OE, devido às diferenças na parede celular destes micro-organismos. Gram-negativos possuem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeo (LPS) que dificulta a penetração dos compostos hidrofóbicos, evitando a ação dos OE na célula bacteriana. Gram-positivos não têm essa barreira, permitindo que os componentes hidrofóbicos penetrem e causem as alterações na permeabilidade da membrana e extravasamento de constituintes intracelulares [28, 29].

Para o OE de *E. globulus* a CMI variou de 0,15% a >10% v/v (1,5 a >100 mg/mL). Valor de CMI > 4 mg/mL para o OE *E. globulus* foram relatadas para as linhagens *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* [30]. Cermelli et al. (2008) [22] encontraram a CMI de 0,2% para o OE de *E. globulus* sobre *S. aureus*, resultado inferior a CMI encontrada no presente estudo (1,25%). Tyagi e Malik (2011) [31] descreveram para o *E. globulus* a CMI de 4,5 mg/mL sobre *E. coli* e 2,25 mg/mL para *S. aureus*, resultados que diferem do presente estudo cuja CMI para *S. aureus* e *E. coli* foram superiores. Estudo recente descreve as CMI de 1,9 mg/mL e 2,9 mg/mL para o óleo de *E. globulus* contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, sendo o cineol (> 67%) descrito como composto majoritário [32]. O cineol (80 %) também é o componente majoritário do OE avaliado (Tabela 1).

O ensaio de microdiluição também revelou que o OE de *M. piperita* foi eficiente em promover a inibição do crescimento de todas as linhagens bacterianas, em baixas concentrações 0,15% - 1,25% v/v (1,56-12,5 mg/mL). A ação bacteriostática para o óleo de *M. piperita* já foi observado nas concentrações de 0,4% - 0,7% v/v contra *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* [24, 26]. Um resultado de CMI 3x maior do que a encontrada neste estudo também foi relatado anteriormente, Singh et al. (2015) [24] descrevem uma CMI de 0,5% para o OE de *M. piperita* contra *S. aureus*.

A natureza hidrofóbica dos OE representa um ponto desfavorável na análise metodológica. Os métodos de difusão de disco e microdiluição em caldo foram desenvolvidos e otimizados para testes de susceptibilidade a antimicrobianos de natureza hidrofílica e os OE são misturas complexas de substâncias voláteis e lipossolúveis (hidrofóbicas). Isso pode explicar o resultado encontrado para o óleo de *E. globulus* sobre *E. coli*, apresentando alto valor de CMI (>10%) na microdiluição em caldo e uma forte inibição quando avaliado através da técnica de difusão de disco.

As diferenças dos resultados entre os estudos podem ser relacionadas com alterações na composição química dos OE; isto é, plantas de mesma espécie, mas de quimiotipos diferentes [33, 34]. Diversos fatores podem promover variação nos resultados, como: o método de análise utilizado, as condições de cultivo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes no meio de cultura, o crescimento microbiano; e o uso, tipo e quantidade de emulsificador. Em estudo com OE, os agentes emulsificadores devem ser utilizados em concentrações que variem 0,2 a 20% em solução com o óleo. Para o emulsificante Tween 80 a concentração ideal é no máximo 0,2% para que não haja interferência do agente emulsificador na viabilidade da bactéria [35].

Uma vez que a etapa essencial na formação de biofilme é a fixação celular, foi avaliado o efeito anti-adesão dos OE nas CMI encontradas neste estudo. Como observado na Figura 1, os resultados indicam que os OE são capazes de inibir a aderência celular inicial da maioria das linhagens testadas, com redução significativa na formação do biofilme (com exceção do OE de *M. piperita* para *S. aureus*).

Os resultados quanto à caracterização fenotípica indicam que *P. aeruginosa* nas condições testadas, é classificada como formadora de biofilme muito aderente. Para este micro-organismo, uma taxa significativa de inibição (75,85%) foi observada com adição do OE de *E. globulus* (50 mg/mL), passando a ser classificado como aderência moderada. Na presença de *M. piperita* (12,5 mg/mL) a redução foi em 55,45%, com biofilme ainda classificado como muito aderente.

Para *K. pneumoniae*, a cultura pura apresentou formação de biofilme com aderência moderada e a adição dos OE de *E. globulus* (12,5 mg/mL) e *M. piperita* (6,25 mg/mL) reduziu significativamente em 29,15% e em 38,07% na adesão celular, respectivamente, mantendo-se a classificação dos biofilmes em aderência moderada.

*E. coli*, nas condições testadas, foi classificada como formadora de biofilme pouco aderente. A adição de *M. piperita* (12,5 mg/mL) reduziu significativamente a formação do biofilme

(inibição de 26,32%), passando a ser classificado como não aderente. A avaliação da atividade antibiofilme do OE de *E. globulus*, não foi avaliado devido a CMI ter sido maior que o limite máximo testado neste estudo.

Entre as Gram-positivas, *E. faecalis* e *S. aureus* apresentam-se como formadoras de biofilme moderadamente aderente. Para ambas as linhagens a adição dos OE resultou na mudança da classificação para pouco aderente. O efeito inibitório na formação de biofilme de *E. faecalis*, foi de 22,01% para *E. globulus* (1,56 mg/mL) e 22,87% para *M. piperita* (1,56 mg/mL). Para *S. aureus*, a adição de *E. globulus* (12,5 mg/mL) resultou na inibição de 38,15% e *M. piperita* (1,56 mg/mL) em 14,26 %.

As bactérias podem ser encontradas na forma livre ou envolvidas por uma matriz exopolimérica, na forma de biofilmes. Os biofilmes são comunidades microbianas complexas que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas apresentando nível de organização muito mais elevado do que as células isoladas [36]. Esta coordenação é induzida por um mecanismo de sinalização intercelular conhecido como *quorum-sensing*. É importante destacar que a formação do biofilme pode ser influenciada com diversos fatores, tais como características do meio aquoso; pH; concentração de nutrientes no meio; temperatura e regulação genética [37].

As doenças associadas ao biofilme representam sério desafio para a saúde. Acredita-se que o biofilme seja responsável por cerca de 65-80% das doenças infecciosas que afetam animais e humanos [38]. Poucos estudos já investigaram a atividade antibiofilme dos OE de *E. globulus* e *M. piperita* nas CMI para estas linhagens e fizeram classificação deste fenótipo avaliando o efeito anti-adesão. Merghni et al. (2018) [39] mostraram eficácia do OE de *E. globulus* em reduzir a formação de biofilmes por linhagens de *S. aureus* resistentes à metilicina. Além disso, trabalhos relatam uma atividade anti-*quorum sensing* deste óleo [39, 40]. Benzaid et al. (2019) [16] observaram significativa inibição da formação de biofilme por *M. piperita* contra inúmeros micro-organismos. Neste trabalho, as porcentagens de inibição variaram de 45% a 100% utilizando de 10 µl a 200 µL do óleo. Ainda, Husain et al. (2015) [41] revelaram que o óleo de *M. piperita* em concentrações inibitórias sub-mínimas interferiu na formação de biofilme em *P. aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila*.

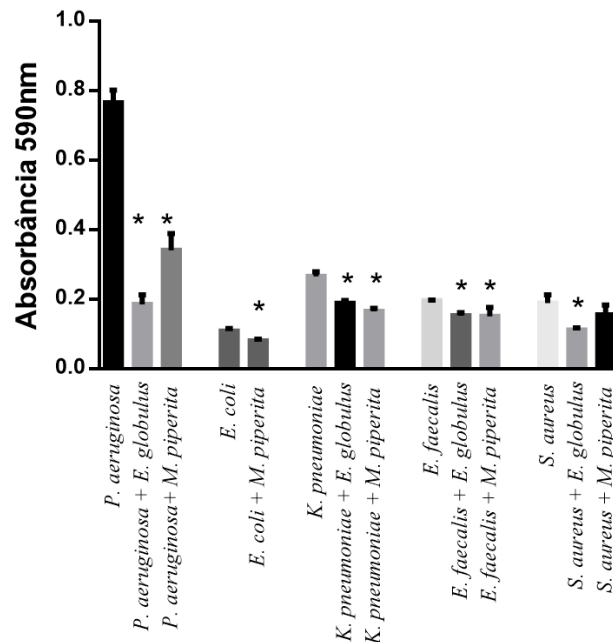


Figura 1: Atividade antibiofilme dos OE de *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita*. Dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA, post-hoc Dunnett's. (\*)  $p < 0,05$ .



### 3.2 Associação dos óleos essenciais (OE) com antimicrobianos comerciais (AM)

As plantas são constituídas por variados compostos químicos e em muitos casos os compostos responsáveis pela ação farmacológica delas são desconhecidos, o que torna maior a possibilidade dos componentes das plantas interferirem na ação dos fármacos convencionais, inibindo ou intensificando seu efeito, assim como modificando os perfis de eficácia e/ou segurança deles [20, 21, 42].

Estudos mostram que o uso associado de fármacos convencionais e plantas medicinais e/ou seus compostos derivados pode modificar a atividade e o efeito terapêutico das drogas, podendo ocorrer alterações nas concentrações plasmáticas dos fármacos e mudanças nos seus perfis de eficácia e/ou segurança [42, 43]. A Tabela 5 mostra a associação e a interação dos OE de *M. piperita* e *E. globulus* sobre a ação antibacteriana de AM. Todos os halos formados pela associação entre os AM + solução 0,2% de Tween 80 não apresentaram diferença significativa quando comparados aos halos dos AM isolados, confirmando a não interferência do emulsificante nos testes. As soluções 0,2% de Tween 80 e CMI dos OE, testadas isoladamente, não exerceram atividade inibitória sobre o crescimento microbiano no ensaio de difusão de disco.

No presente estudo, pode-se observar a ocorrência de interação dos OE sobre a atividade dos antimicrobianos (Tabela 5). Um total de 14 interações foi observado, sendo 11 sinérgicas e 3 antagônicas. O maior número de interações sinérgicas foi observado contra linhagens Gram-negativas [*E. coli* (4), *P. aeruginosa* (4)], ao passo que as interações antagônicas foram observadas contra Gram-positivas, sendo *E. faecalis* (2) e *S. aureus* (1). Rosato et al. (2018) [14] também relataram uma maior ocorrência de sinergismos entre AM e OE contra bactérias Gram-negativas.

Tabela 5. Interação dos óleos essenciais (OE) sobre a atividade dos antimicrobianos comerciais (AM).

AM	Zona de inibição (mm) <sup>#</sup>				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
Ciprofloxacino (C)	25	35	25	24	30
Gentamicina (G)	16	17	12	12	15
Penicilina G (PG)	0	0	0	16	27
<b>(AM + OE)</b>					
C + <i>M. piperita</i>	32↑	35*	25*	24*	31*
C + <i>E. globulus</i>	31 ↑	36*	25*	24*	31*
G + <i>M. piperita</i>	19 ↑	23 ↑	13*	13*	21 ↑
G + <i>E. globulus</i>	19 ↑	22↑	13*	13*	22 ↑
PG + <i>M. piperita</i>	0	9↑	0	13↓	24↓
PG + <i>E. globulus</i>	0	16↑	0	13 ↓	32↑

<sup>#</sup>Os resultados estão expressos como média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano.

Todos os testes foram feitos em triplicata, em dois ensaios independentes.

↑: sinérgico; ↓: antagônico; \*: indiferente [20].

Neste estudo foram verificados 4 sinergismos contra *P. aeruginosa*: gentamicina + *M. piperita*, gentamicina + *E. globulus*, ciprofloxacino + *M. piperita* e ciprofloxacino + *E. globulus*. É importante salientar que esta linhagem não apresentou susceptibilidade para nenhum dos OE testados através da técnica de difusão de disco (Tabela 2). A *P. aeruginosa* é uma bactéria que apresenta altos níveis de resistência intrínseca e capacidade para adquirir resistência adicional, fenômeno que limita alternativas terapêuticas eficazes para as infecções

[44]. A associação do OE com o AM promoveu um aumento no halo de inibição, quando comparado ao AM isoladamente, reforçando a importância deste achado para futuras alternativas terapêuticas.

A associação do OE com o AM promoveu 4 interações sinérgicas contra *E. coli*: gentamicina + *M. piperita*, gentamicina + *E. globulus*, penicilina G + *M. piperita* e penicilina G + *E. globulus*. Cabe ressaltar que a penicilina G, de forma isolada, não é capaz de inibir o crescimento de *E. coli* (Tabela 2), visto que o espectro de ação deste antimicrobiano é voltado para Gram-positivas, especialmente estreptococos e estafilococos [45]. No entanto, quando este AM foi associado aos OE foi observada a susceptibilidade da espécie à combinação do AM + OE (Tabela 5).

Não foi observada nenhuma interação dos OE no efeito dos AM contra *K. pneumoniae*. A interação sinérgica entre gentamicina + *M. piperita* foi anteriormente relatada contra *K. pneumoniae* (ATCC 19833) [14].

Duas interações antagônicas foram observadas contra *E. faecalis*: penicilina G + *M. piperita* e penicilina G + *E. globulus*. Quando avaliado contra *S. aureus*, a interação do OE e AM resultou em 3 sinergismo (penicilina G + *E. globulus*, gentamicina + *M. piperita* e gentamicina + *E. globulus*) e 1 antagonismo (penicilina G + *M. piperita*).

Interações antimicrobianas de sinergismo exibidas pela combinação de OE e AM reduzem as doses eficazes dos agentes combinados, consequentemente permitindo o uso de doses menores de AM, reduzindo seus efeitos negativos [12]. A penicilina G e gentamicina foram os antimicrobianos que mais apresentaram interações, sendo 6 sinergismo para gentamicina; e 3 sinergismos e 2 antagonismos para penicilina G. Ciprofloxacino apresentou 2 interações sinérgicas.

Em relação aos OE, *E. globulus* apresentou maior quantidade de sinergismos (6), seguido por *M. piperita* (5). O efeito sinérgico do OE de *M. piperita* com gentamicina também foi verificado por Rosato et al. (2018) [14]. Os autores sugerem que o realce na atividade antimicrobiana da gentamicina foi devido à presença dos monoterpenos mentol (68%) e mentona (8,36%) na composição do OE [14]. No presente estudo o mentol (43,45%) e a mentona (23,15%) também foram os componentes majoritários do OE de *M. piperita*.

Para Adrar et al. (2016) [46], existe uma correlação positiva entre a atividade antibacteriana dos OE e sua composição química. Os componentes hidrofóbicos presentes nos OE, como os monoterpenos oxigenados, podem interagir com os lipídios de membrana, resultando em alterações da estrutura celular e no aumento da permeabilidade da membrana. Este aumento na permeabilidade facilita a entrada dos AM, resultando em efeito antibacteriano aprimorado, mesmo em doses mais baixas [12, 14]. Trombetta et al. (2005) [47] demonstraram que monoterpenos presente no OE interagem e causam danos na fração lipídica em um modelo de membrana. Outro possível mecanismo de sinergismo pode ser a inibição das bombas de efluxo induzida pela ação do OE que pode resultar na retenção do AM no interior da célula bacteriana devido a incapacidade da bomba de efluxo de bombear antibióticos e, portanto, reduzindo sua dose efetiva [12, 48]. Estudos sugerem que a associação de OE e AM podem ser aplicadas no combate às cepas multirresistentes [14, 49].

O presente estudo reforça a necessidade de serem feitas mais análises que visem o estabelecimento do perfil de interações entre medicamentos antimicrobianos e produtos naturais, como é o caso dos OE. Visto a possibilidade de evitar possíveis falhas terapêuticas, quando for utilizada terapia combinada de antimicrobianos e plantas medicinais, e a possibilidade de terapias combinadas e menores doses na terapia antibiótica.

#### 4. CONCLUSÃO

Os OE de *M. piperita* e *E. globulus* apresentaram potencial antibacteriano e antibiofilme contra cinco cepas padrão de importância clínica humana. Os OE foram capazes de inibir a aderência celular inicial da maioria das linhagens testadas, com redução significativa na formação do biofilme. Adicionado a isso, suas associações com antimicrobianos comerciais comumente utilizados na clínica (gentamicina, penicilina G e ciprofloxacina) demonstraram

ocorrência de interações sobre o poder inibitório dos antimicrobianos. Foram registrado o total de 14 interações, sendo 11 sinergismos e 3 antagonismos. Destaca-se que todas as interações entre OE e AM contra *P. aeruginosa* se mostraram sinérgicas, este resultado é de particular interesse devido a dificuldade de tratamento impostas pela resistência intrínseca desta espécie. Esses resultados tornam os OE um forte candidato ao uso concomitante aos AM. Mais estudos devem ser realizados para melhor compreender os mecanismos responsáveis por essas atividades e possíveis toxicidades.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (modalidade de financiamento 001) e a By Samia, São Paulo – SP, pelo fornecimento do óleo essencial com a finalidade exclusiva de pesquisa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Sepsis. WHO [Internet]; 26 ago 2020 [acessado em 12 fev 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>
2. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance, Fact sheet 194. WHO [Internet]; 17 nov 2021 [acessado em 12 fev 2021]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
3. World Health Organization (WHO). World antimicrobial awareness Week. WHO [Internet]; 18-24 nov 2020; [acessado em 12 fev 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week/2020>
4. Ayobami O, Brinkwirth S, Eckmanns T, Markwart R. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low-and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes & Infections*. 2022 Feb;11(1):443-51. doi: 10.1080/22221751.2022.2030196
5. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010 Apr;35(4): 322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
6. Ahmad M, Khan AU. Global economic impact of antibiotic resistance: a review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019 Dec;19:313-6. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.024
7. Iseppi R, Mariani M, Condò C, Sabia C, Messi P. Essential oils: A natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics*. 2021 Apr;10:417. doi: 10.3390/antibiotics10040417
8. Condò C, Anacarso I, Sabia C, Iseppi R, Anfelli I, Forti L, et al. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. *Natural Product Research*. 2020 Oct;34:567-74. doi: 10.1080/14786419.2018.1490904
9. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2019 Sep;134:103-580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580
10. Andersson DI, Balaban NQ, Baquero F, Courvalin P, Glaser P, Gophna U, et al. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020 Jan;44(2):171-88. doi: 10.1093/femsre/fuaa001
11. Owen L, Webb JP, Green J, Smith LJ, Laird K. From formulation to in vivo model: A comprehensive study of a synergistic relationship between vancomycin, carvacrol, and cuminaldehyde against *Enterococcus faecium*. *Phytotherapy Research*. 2020 Jul;34:1638-49. doi: 10.1002/ptr.6631
12. Sharma K, Guleria S, Razdan VK, Babu V. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Industrial Crops & Products*. 2020 Mar;154:112-569. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112569
13. Benameur Q, Gervasi T, Pellizzeri V, Pl'uchtová M, Tali-Maama H, Assaous F, et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against blaESBL producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. *Natural Product Research*. 2018 May;33:2647-54. doi: 10.1080/14786419.2018.1466124

14. Rosato A, Carocci A, Catalano A, Clodoveo ML, Francini C, Corbo F, et al. Elucidation of the synergistic action of *Mentha piperita* essential oil with common antimicrobials. PLoS ONE. 2018 Aug;13(8):e0200902. doi: 10.1371/journal.pone.0200902
15. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne (PA): CLSI; 2019.
16. Benzaid C, Tichati L, Djeribi R, Rouabhia M. Evaluation of the chemical composition, the antioxidant and antimicrobial activities of *Mentha piperita* essential oil against microbial growth and biofilm formation. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2019 Jun;22(2):335-46. doi: 10.1080/0972060X.2019.1622456
17. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A10: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne (US): CLSI; 2015.
18. Jadhav S, Shah R, Bhavne M, Palombo EA. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria planktonic* cells and biofilms. Food Control. 2013 Jan;29:125-30. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.071
19. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Svabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods. 2000 Apr;40:175-9. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6
20. De Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2006 Jan/Mar;16(1):77-82. doi: 10.1590/S0102-695X2006000100014
21. Zago JAA, Ushimaru PI, Barbosa LN, Fernandes-junior A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009 Dez;19(4):828-33. doi: 10.1590/S0102-695X2009000600005
22. Cermelli C, Fabio A, Fabio G, Quaglio P. Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. Current Microbiology. 2008 Jan;56(1):89-92. doi: 10.1007/s00284-007-9045-0
23. Ait-Ouazzou A, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2011 Nov;91(14):2643-51. doi: 10.1002/jsfa.4505
24. Singh R, Shushni MAM, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry. 2015 May;8(3):322-8. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.01.019
25. Andogan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Özbaşa D, Mumcu E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Archives of Pharmacal Research. 2002 Dec;25(6):860-4. doi: 10.1007/BF02977005
26. Chraïbi M, Fadil M, Farah A, Lebrazi S, Fikri-Benbrahim K. Antimicrobial combined action of *Mentha pulegium*, *Ormenis mixta* and *Mentha piperita* essential oils against *S. aureus*, *E. coli* and *C. tropicalis*: Application of mixture design methodology. LWT. 2021 Jun;145:111352. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111352
27. Pankey G, Sabath L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. Clinical Infectious Diseases. 2004 Mar;38(6):864-70. doi: 10.1086/381972
28. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. Medicines. 2017 Aug;4(3):58. doi: 10.3390/medicines4030058
29. Rapper SL, Vuuren SFV. Odoriferous therapy: A review identifying essential oils against pathogens of the respiratory tract. Chemistry & Biodiversity. 2020 Mar;17(6):e2000062. doi: 10.1002/cbdv.202000062
30. Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. Pharmaceutical Biology. 2011 May; 49(9):893-9. doi: 10.3109/13880209.2011.553625
31. Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chemistry. 2011 May;126(1):228-35. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.002
32. Pino JA, Moncayo-Molina L, Spengler I, Pérez JC. Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil of *Eucalyptus globulus* Labill. from two highs of the canton Cañar, Ecuador. CENIC Journal Chemical Sciences. 2021 Feb;52(1):26-33.
33. Almeida JC, Almeida PP, Gherardi SRM. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. Nutri Time. 2020 Jan/Fev;17(1):8623-33.

34. Reyes-Jurado F, Navarro-Cruz AR, Ochoa-Velasco CE, Palou E, López-Malo A, Ávila-Sosa R. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020 Mar;60(10):1641-50. doi: 10.1080/10408398.2019.1586641
35. Nascimento PF, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli ÂR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007 Mar;17(1):108-13. doi: 10.1590/S0102-695X2007000100020
36. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 2012 Mar;45(2):502-31. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.038
37. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010 Aug;8:623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415
38. Abdullahi UF, Igwenagu E, Mu'azu A, Aliyu S, Umar MI. Intrigues of biofilm: a perspective in veterinary medicine. *Veterinary World*. 2016 Jan;9(1):12-8. doi: 10.14202/vetworld.2016.12-18
39. Merghni A, Noumi E, Hadded O, Dridi N, Panwar H, Ceylan O, et al. Assessment of the antibiofilm and quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogenesis*. 2018 May;118:74-80. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.006
40. Luís Â, Duarte A, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2016 Jan;79:274-82. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.055
41. Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Ahmad E, Tahseen Q, Khan MS, et al. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2015 May;6:420. doi: 10.3389/fmicb.2015.00420
42. Alexandre RF, Bagatini F, Simões CMO. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008 Mar;18(1):117-26. doi: 10.1590/S0102-695X2008000100021
43. Kwiatkowski P, Pruss A, Grygorcewicz B, Wojciuk B, Dołęgowska B, Giedrys-kalemba S, et al. Preliminary study on the antibacterial activity of essential oils alone and in combination with gentamicin against extended- spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and new delhi metallo-  $\beta$ -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microbial Drug Resistance*. 2018 Nov;24(9):1368-75. doi: 10.1089/mdr.2018.0051
44. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*. 2021 Oct;10(10):1310. doi: 10.3390/pathogens10101310
45. Melo VV, Duarte IP, Soares AQ. Guia antimicrobianos. guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG). 1. ed. Goiânia: [editora desconhecida]; 2012.
46. Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*. 2016 Oct;88:112-9. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.12.007.
47. Trombetta D, Castelli D, Sarpietro MG, Venuti V, Cristiani M, Daniele C. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 June;49(6):2474-78. doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
48. Shahverdi AR, Monsef-Esfahani HR, Tavasoli F, Zaheri A. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Food Science*. 2007 Jan/Feb;72(1):55-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00204.x
49. Bag A, Chattopadhyay RR. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoSOne*. 2015 Jul;10(7):e0131321. doi: 10.1371/journal.pone.0131321