

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA



Tese de Doutorado

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Thymus vulgaris* L. e *Cymbopogon martinii* e de seus constituintes majoritários frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Candida albicans* em biofilme formado em sonda urinária

Cristiane Telles Baptista

Pelotas, 2022

Cristiane Telles Baptista

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Thymus vulgaris* L. e *Cymbopogon martinii* e de seus constituintes majoritários frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Candida albicans* em biofilme formado em sonda urinária

Tese de doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (área de concentração: Microbiologia e Parasitologia).

Orientador: Prof Dr Rodrigo de Almeida Vaucher

Pelotas, 2022

Cristiane Telles Baptista

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Thymus vulgaris* L. e *Cymbopogon martinii* e de seus constituintes majoritários frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Candida albicans* em biofilme formado em sonda urinária

Data da Defesa: 12/12/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Orientador)
Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Patricia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Doutor em Ciências Químicas pela Universidade de Buenos Aires

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B222a Baptista, Cristiane Telles

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Thymus vulgaris* L. e *Cymbopogon martinii* e de seus constituintes majoritários frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Candida albicans* em biofilme formado em sonda urinária / Cristiane Telles Baptista ; Rodrigo de Almeida Vaucher, orientador. — Pelotas, 2022.

171 f. : il.

Tese (Doutorado) — Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Biofilme. 2. Antimicrobianos. 3. Óleos essenciais. 4. Sonda urinária. I. Vaucher, Rodrigo de Almeida, orient. II. Título.

CDD : 661.806

Agradecimentos

A Deus pela minha vida e por guiar meus passos nessa longa caminhada.

À minha mãe Rosa e minha irmã Michele, pela educação, pelo incentivo, amizade, companheirismo, paciência, dedicação, carinho, credibilidade e por confiar em mim, sem vocês eu não teria chegado tão longe.

Ao meu esposo Cleber, por todo apoio, dedicação, carinho, paciência, por aguentar todas minhas crises e estresse durante essa caminhada, nunca desistir de mim e sempre acreditar no meu potencial.

A minha filha amada Layres por ser meu incentivo e força para não desistir nunca, é e sempre será por você amor da minha vida.

À minha família em geral, pela amizade, carinho, paciência, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu Orientador Prof. Rodrigo de Almeida Vaucher, pela sua orientação, total apoio, tempo dedicado, ensinamentos, opiniões e críticas, atenção, confiança, paciência, profissionalismo e total colaboração para a realização deste trabalho, muito obrigada pela oportunidade.

Ao nosso grupo de pesquisa que me proporcionou todo o apoio na realização deste trabalho, além das amizades construídas ao longo de nosso convívio e por me ensinar o valor do trabalho em equipe.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade em realizar minha segunda graduação e também a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e recursos financeiros disponibilizados que tornaram este projeto possível.

Resumo

BAPTISTA, Cristiane Telles. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Thymus vulgaris* L. e *Cymbopogon martinii* e de seus constituintes majoritários frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Candida albicans* em biofilme formado em sonda urinária**, 2022, 170f. Tese (Doutorado em Parasitologia e Microbiologia) Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Pseudomonas aeruginosa assim como *Klebsiella pneumoniae* são bactérias Gram-negativas comumente encontradas no ambiente hospitalar e também causam infecções em pacientes imunocomprometidos *Candida* são responsáveis por ocasionar infecções fúngicas em todo mundo, sendo a *C. albicans* a espécie mais frequentemente associada a processos infecciosos em pacientes hospitalizados. Esses micro-organismos são estudados atualmente, devido ao seu grande envolvimento na formação de biofilmes e no aumento da resistência aos antimicrobianos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi inicialmente realizar uma revisão sistemática sobre biofilmes e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho, canela e palmarosa e seus constituintes frente a *K. pneumoniae*. Posteriormente, foi avaliada a atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de tomilho e palmarosa e de seus constituintes majoritários, e sua atividade antibiofilme em sonda urinária. A concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima (CFM) foram avaliadas pelo método de microdiluição em placas de 96 poços (CLSI M7-A6, 2013 CLSI e M44-A2, 2008) utilizando uma cepa de *C. albicans* (ATCC 14053), *C. glabrata*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* cepa PA01, respectivamente. O efeito dos OE e dos CM no crescimento desses micro-organismos foi avaliado com a realização de curva de crescimento em relação ao tempo e o efeito sinérgico também foi determinado. A atividade antibiofilme após tratamento com OE e os CM foi avaliada através das metodologias do ensaio de cristal violeta, determinação das proteínas totais, sinergismo, curva de crescimento, microscopia de força atômica. Para *Candida* spp. ainda foi realizado o teste de inibição da formação de tubo germinativo e pseudohifas, assim como coloração de calcofluor. Já para as bactérias utilizaram-se as técnicas de inibição da produção de exopolissacarídeos, e para *P. aeruginosa* realizou-se ainda os testes inibição da produção de piocianina e teste de motilidade. A partir dos resultados obtidos, foi evidenciado em todos os testes realizados que houve diminuição significativa na formação de biofilme. Para os ensaios de coloração com cristal violeta, os melhores resultados foram do óleo de palmarosa e o constituinte majoritário geraniol, que apresentaram até 86% de redução na formação de biofilme para as bactérias na concentração de 1x CIM. Já para *Candida* a palmarosa e o eugenol apresentaram redução de 85% na concentração de 1x CIM. Na determinação das proteínas o óleo que mais se destacou também foi a palmarosa e o eugenol com redução de 84,4% na concentração de 1x CIM para bactérias. Já para *Candida* a palmarosa e o geraniol que apresentaram maiores reduções chegando a 79% na concentração de 1x CIM. Para *P. aeruginosa* PA01, nos testes de motilidade os óleos que melhor se destacaram foram palmarosa e o tomilho que chegaram a apresentar 100% de

redução de motilidade. Os testes de inibição da formação de tubo germinativo em *Candida albicans*, os melhores resultados foram tomilho, palmarosa e geraniol que apresentaram 100% de inibição em todas as concentrações testadas. Para inibição da formação de pseudohifas todos os compostos apresentaram redução significativa na formação de pseudohifas. Em nossos resultados, os óleos essenciais e seus constituintes majoritários demonstraram atividade antibiofilme em material médico hospitalar, mostrando-se excelentes promissores no controle da formação de biofilme e como alternativa terapêutica eficaz contra resistência microbiana.

Palavras chaves: Óleos essenciais, biofilmes, sondas, geraniol, eugenol, timol

Abstract

BAPTISTA, Cristiane Telles. **Antimicrobial activity of essential oils *Thymus vulgaris* L. and *Cymbopogon martinii* and their major constituents against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and *Candida albicans* in biofilm formed in urinary probe**, 2022, 170f. Thesis (Doctorate in Parasitology and Microbiology) Postgraduate Program in Parasitology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Pseudomonas aeruginosa as well as *Klebsiella pneumoniae* are Gram-negative bacteria commonly found in the hospital environment and also cause infections in immunocompromised patients *Candida* are responsible for causing fungal infections worldwide, with *C. albicans* being the species most frequently associated with infectious processes in hospitalized patients. These microorganisms are currently studied, due to their great involvement in the formation of biofilms and in the increase of resistance to antimicrobials. In this context, the objective of the present study was initially to carry out a systematic review on biofilms and antimicrobial activity of thyme, cinnamon and palmarosa essential oils and their constituents against *K. pneumoniae*. Subsequently, the antimicrobial and synergistic activity of thyme and palmarosa essential oils and their major constituents, and their anti-biofilm activity in urinary catheters, were evaluated. The minimum inhibitory concentration (CIM), the minimum bactericidal concentration and the minimum fungicidal concentration (MFC) were evaluated by the microdilution method in 96-well plates (CLSI M7-A6, 2013 CLSI and M44-A2, 2008) using a strain of *C. albicans* (ATCC 14053), *C. glabrata*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* strain PA01, respectively. The effect of EO and CM on the growth of these microorganisms was evaluated by performing a growth curve over time and the synergistic effect was also determined. Antibiofilm activity after treatment with EO and CM was evaluated using crystal violet assay methodologies, determination of total proteins, synergism, growth curve, atomic force microscopy. For *Candida* spp. the inhibition test of the formation of germ tube and pseudohyphae was also performed, as well as calcofluor staining. As for the bacteria, the techniques of inhibition of the production of exopolysaccharides were used, and for *P. aeruginosa*, the tests of inhibition of the production of pyocyanin and the motility test were also carried out. From the results obtained, it was evidenced in all tests performed that there was a significant decrease in biofilm formation. For the crystal violet staining assays, the best results were for palmarosa oil and the major constituent geraniol, which showed up to 86% reduction in biofilm formation for bacteria at a concentration of 1x_{CIM}. As for *Candida*, palmarosa and eugenol showed a reduction of 85% in the concentration of 1x_{CIM}. In the determination of proteins, the oil that stood out the most was also palmarosa and eugenol with a reduction of 84.4% in the concentration of 1x MIC for bacteria. As for *Candida* a palmarosa and geraniol that presented greater reductions reaching 79% in the concentration of 1x_{CIM}. For *P. aeruginosa* PA01, in the motility tests, the oils that best stood out were palmarosa and thyme, which even showed 100% reduction in motility. In the germ tube formation inhibition tests in *Candida albicans*, the best results were thyme, palmarosa and geraniol which showed 100% inhibition in all tested concentrations. For inhibition of pseudohyphal formation, all compounds showed a significant reduction in pseudohyphal formation. In our results, essential oils and their major

constituents demonstrated antibiofilm activity in hospital medical material, showing excellent promise in controlling biofilm formation and as an effective therapeutic alternative against microbial resistance.

Keywords: Essential oils, biofilms, probes, geraniol, eugenol, thymol

Lista de Figuras

Figuras Revisão de Literatura

Figura 1- Tipos de motilidade bacteriana.	20
Figura 2- Etapas de formação do biofilme bacteriano..	32
Figura 3- Fórmula química do timol.....	48
Figura 4- Fórmula química do eugenol.....	50
Figura 5- Fórmula química do geraniol.....	52

Figuras Artigo Publicado

Figura 1- EO action sites and mechanisms in a bacterial cell.	59
Figura 2- Catheters and probes that are used daily in hospitals.....	64
Figura 3- Biofilm formation in hospital medical equipment	65
Figura 4- Structural representation and possible genes involved in biofilm formation and adhesion of <i>K. pneumoniae</i>	67
Figura 5- Structural representation and possible genes involved in biofilm formation and adhesion of <i>C. albicans</i>	69

Figuras Manuscrito 1

Figura 1- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 31) biofilm formation indices.....	102
Figura 2- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 36) biofilm formation indices,.....	103
Figura 3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain PA01) biofilm formation indices	103
Figura 4- Growth inhibition in <i>K. pneumoniae</i> (strain 31).	104
Figura 5- Growth inhibition in <i>K. pneumoniae</i> (strain 36)..	104
Figura 6- Growth inhibition in <i>P. aeruginosa</i> (PA01)..	105
Figura 7- Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford, (1976) in biofilms formed from <i>K. pneumoniae</i> (strain 31).	105
Figura 8- Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford, (1976) in biofilms formed from <i>K. pneumoniae</i> (strain 36).	106
Figura 9- Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford, (1976) in biofilms formed from <i>P. aeruginosa</i>	106

Figura 10- Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by <i>K. pneumoniae</i> (strain 31)..	107
Figura 11- Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by <i>K. pneumoniae</i> (strain 36)..	108
Figura 12- Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by <i>P. aeruginosa</i> ..	109
Figura 13- Swimming of <i>P. aeruginosa</i> ..	110
Figura 14- <i>P. aeruginosa</i> Swarming..	110
Figura 15- <i>P. aeruginosa</i> Twitching.....	111
Figura 16- Pyocyanin levels measured in <i>P. aeruginosa</i>	111
Figura 17- Amount of exopolysaccharide in the <i>K. pneumoniae</i> biofilm (strain 36).	111
Figura 18- Amount of exopolysaccharide in the <i>K. pneumoniae</i> biofilm (strain 31).	112
Figura 19- Amount of exopolysaccharide in the <i>P. aeruginosa</i> biofilm.....	112

Figuras Manuscrito 2

Figura 1- <i>Candida albicans</i> biofilm formation indices.	136
Figura 2- <i>Candida glabrata</i> biofilm formation indices..	136
Figura 3- Growth inhibition in <i>C. albicans</i>	137
Figura 4- Growth inhibition in <i>C. glabrata</i>	137
Figura 5- Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford (1976) in biofilms formed from <i>C. albicans</i>	138
Figura 6- Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford (1976) in biofilms formed from <i>C. glabrata</i>	138
Figura 7- Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by <i>C. albicans</i>	139
Figura 8- Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by <i>C. glabrata</i>	140
Figura 9- Analysis of the Biofilm of <i>C. albicans</i> formed by the Calcofluor.	141
Figura 10- Analysis of the Biofilm of <i>C. glabrata</i> formed by the Calcofluor.....	141
Figura 11- Effect <i>C. albicans</i> germ tube formation..	142
Figura 12- Effect <i>C. glabrata</i> germ tube formation..	142

Lista de Tabelas

Tabela Artigo Publicado

Tabela 1- Number of published papers in the last 10 years according to the search term.....	58
---	----

Tabelas Manuscrito 1

Tabela 1- Composition of palmarosa oil and thyme oil.....	99
Tabela 2- Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thyme and palmarosa oils µg/ mL.....	101
Tabela 3- Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thymol, eugenol and geraniol oils µg/ mL.	101
Tabela 4- In vitro combinations of essential oils against <i>P. aeruginosa</i> (PA01), <i>K. pneumoniae</i> (strain 31) and <i>K. pneumoniae</i> (strain 36)	101
Tabela 5- In vitro combinations of major constituents against <i>P. aeruginosa</i> (PA01), <i>K. pneumoniae</i> (strain 31) and <i>K. pneumoniae</i> (strain 36)...	102

Tabelas Manuscrito 2

Tabela 1- Composition of palmarosa oil and thyme oil.....	133
Tabela 2- Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thyme, cinnamon and palmarosa oils µg/ mL.	134
Tabela 3- Minimum inhibitory concentration and Minimum fungicidal concentration of thymol, eugenol and geraniol oils µg/ mL	134
Tabela 4- In vitro combinations of essential oils against <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> ..	135
Tabela 5- In vitro combinations of the major constituents against <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> ...	135

Sumário

1. Introdução.....	14
1. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
2. Revisão da Literatura	18
2.1 Gênero <i>Pseudomonas</i>	18
3.1.1 Motilidade bacteriana	21
3.2- Gênero <i>Klebsiella</i>	23
3.2.1- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
3.3- Gênero <i>Candida</i>	26
3.3.1- <i>Candida albicans</i>	27
3.3.2- <i>Candida glabrata</i>	28
3.4- Biofilmes.....	29
3.4.1- Biofilme em material médico hospitalar	37
3.5- Resistência a antimicrobianos	43
3.6- Óleos Essenciais	44
3.6.1- Ação antimicrobiana dos óleos essenciais	46
3.6.2- <i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomilho)	48
3.6.3- Timol	49
3.6.4- Eugenol	51
3.6.5- <i>Cymbopogon martinii</i> (Palmarosa).....	53
3.6.6- Geraniol	54
Capítulo 1.....	54

4.1- Artigo Publicado	54
Capítulo 2	78
5.1- Manuscrito 1	78
Capítulo 3	113
6.1- Manuscrito 2	113
Conclusões finais	143
Referências	145

1. Introdução

A partir da década de 1930, durante um período de cerca de 5 anos, diferentes classes de antimicrobianos foram pesquisadas e lançadas no mercado, incluindo a penicilina em 1940. No entanto, os primeiros casos de resistência aos medicamentos foram relatados no final da década de 1930 (MIMICA; MENDES, 2007; DAVIES; DAVIES, 2010; LEWIS, 2017). O uso generalizado de medicamentos anti-infecciosos levou ao aumento da resistência microbiana, o que representa uma ameaça à saúde pública, pois limita as opções de tratamento associadas à falta de desenvolvimento de novos medicamentos (MARTINS et al., 2013).

Estima-se que o aumento contínuo da resistência microbiana poderia matar aproximadamente 10 milhões de pessoas até 2050, tornando-a mais mortal que o câncer (O'NEILL, 2014; SILVA et al., 2020). As infecções causadas por micro-organismos resistentes aos medicamentos levam a tratamentos complexos, aumento da morbidade, mortalidade e custos, tornando o tratamento inviável na maioria dos casos (OMS, 2005).

Das variadas espécies dentro do gênero *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é considerada a espécie de maior importância clínica, sendo responsável por 75% a 86% das infecções clínicas causadas por bactérias deste gênero (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014). *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno comumente responsável por infecções respiratórias agudas e crônicas, associadas a altas taxas de mortalidade que variam de 42% a 87% dos casos (FUJITANI; SUN; YU, 2011). Logo, a candidíase invasiva é classificada como sendo a quarta infecção mais frequentemente encontrada no ambiente hospitalar em todo o mundo, ficando a *Candida albicans* responsável por cerca de 50% das infecções mucocutâneas e sistêmicas (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER, 2012).

Alguns micro-organismos têm a capacidade de formar biofilme, e estudos recentes têm apontado que tal modelo por suas características próprias pode ser utilizado para avaliação de fármacos e “compostos bioativos para avaliação de suas atividades antibiofilmes”.

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* apresentam destaque no crescimento em biofilmes. Estas são capazes de tirar partido na formação de biofilmes e aumentar a resistência a fatores como a proteção contra antimicrobianos, desinfetantes, sistema imune inato e a várias influências

ambientais negativas, permitindo-lhes assim, abranger vários nichos ambientais e colonizar diversas matrizes de tecido, solo e planta, fato que não é necessariamente observado nas mesmas bactérias quando se desenvolve na forma planctônica (MASÁK et al., 2014; MULCAHY et al., 2014; RIBEIRO et al. 2016).

Com isso, ao longo dos anos, a busca por alternativas terapêuticas oriundas de plantas medicinais, vem aumentando gradativamente e, com isso, diversos estudos utilizando óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais, vêm mostrando suas atividades antimicrobianas, como é o caso dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e palmarosa (*Cymbopogon martini*) (SÁNCHEZ, et al., 2010; SCHELZ, et al., 2010).

Uma espécie que tem despertado muito interesse é o tomilho, reconhecido princípio antimicrobiano (IMELOUANE et al., 2009; SANTURIO et al., 2007; POZZO et al., 2011) e antioxidante (GRIGORE et al., 2010), devido a ação na parede celular bacteriana e segundo os mesmos autores, pode melhorar a função imunológica e apresenta como principal constituinte majoritário o timol.

A palmarosa tem como seu composto majoritário e responsável por todas suas características antimicrobianas e organolépticas o geraniol (70% a 80%) (MALLAVARAPU et al., 1998). Além de possuir propriedades farmacológicas e bioquímicas como ação anti-inflamatória, antidepressiva e até antitumoral, apresenta também atividade antimicrobiana que já foi relatada em diversos estudos (WITTIG et al., 2015; DENG et al., 2015; JAYAHCHANDRAN et al., 2015; KEREKES; et al., 2019).

O eugenol aparece na literatura com muitas propriedades biológicas. Tem sido estudado e atribuído a ele atividades como antioxidantes (JAYAPRAKASHA et al., 2003; MATHEW & ABRAHAM, 2006), antimicrobianas (CHAO et al., 2000; JHAM et al., 2005; MATAN et al., 2006; SINGH et al., 2007; FREIRE, 2008; SILVESTRI et al., 2010), anti-hipertensiva (AGRA et al., 2007). Atribui-se também ação antiespasmódicos, anti-inflamatório, antipirético, larvicida, miorelaxante, sedante e inseticida (GROSSMAN, 2005).

Considerando a resistência antimicrobiana como uma problemática de grande impacto na saúde pública e que está intrinsicamente relacionada com a formação de biofilmes, principalmente no âmbito hospitalar, faz-se necessário um estudo a fim de avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais e seus

constituintes majoritários, visto que a opção terapêutica para as cepas multirresistentes é bastante restrita.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e sinérgica dos óleos essenciais de tomilho e palmarosa e de seus constituintes majoritários, e sua atividade antibiofilme em material médico hospitalar (sonda uretral).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão sistemática sobre biofilmes e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tomilho, canela e palmarosa e seus constituintes frente a *K. pneumoniae*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e dos seus constituintes majoritários com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM);
- Evidenciar a atividade antibiofilme na sonda urinária dos óleos essenciais e dos seus constituintes majoritários de forma isolada e de forma sinérgica;
- Quantificar o biofilme formado em sonda urinária através de técnica padronizada de contagem em UFC/ml em ágar;
- Mensurar os níveis de proteínas no biofilme formado após tratamento;
- Avaliar os níveis de exopolissacarídeos (EPS) nos diferentes biofilmes formados de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* após tratamento com os óleos e seus constituintes majoritários;
- Determinar os percentuais de inibição de biofilme e piocianina de *P. aeruginosa* após contato com os tratamentos;
- Avaliar a atividade inibitória de motilidade de *P. aeruginosa* dos óleos e seus constituintes majoritários;
- Analisar o biofilme formado através da coloração de Calcofluor;
- Avaliar a redução na formação de tubo germinativo e pseudo-hifas em *Candida albicans* após o tratamento.

3. Revisão da Literatura

3.1 Gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa, foi descrita pela primeira vez por Schroeter em 1972, pertence à ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae e ao gênero *Pseudomonas* (OZEN et al, 2013). São bacilos gram negativos, aeróbio estrito, não formadores de esporos, podendo ser encontrados isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, apresentam mobilidade através da presença de flagelo polar monotríquio (STARADUMSKYTE, 2014). A pioverdina e a piocianina são pigmentos fluorescentes difusíveis no meio de cultura produzidos por este micro-organismo. Algumas cepas produzem um pigmento avermelhado (piorrubina) ou preto (piomelanina).

Essa espécie pertence a um grupo de micro-organismos bastante heterogêneo e amplamente distribuído na natureza, apresentando metabolismo bastante versátil. Frequentemente habita o solo, água, vegetal e colonizam regiões úmidas da pele, incluindo as axilas, regiões anogenitais, e ouvidos externos (BARANKIN, 2012). Apresentam mínimas necessidades nutricionais, fator esse que contribui para seu sucesso ecológico e para seu papel como agente oportunista (PEREZ et al, 2011).

Já no processo respiratório, utilizam o oxigênio como o aceptor final de elétrons. Entretanto, em casos estritos, o nitrato pode ser usado como aceptor final alternativo, aceitando o crescimento em condições de anaerobiose. O catabolismo da glicose e outros monossacarídeos ocorrem pela via de Entner-Doudoroff (DADDAOUA et al, 2009). Com isso, para a classificação de *P. aeruginosa* devem ser consideradas algumas características metabólicas. Essa espécie não é fermentadora de carboidratos e produtora de citocromo-oxidase, arginina desidrolase e ornitina descarboxilase. Além disso, produz pigmentos fluorescentes, como a piocianina e a pioverdina, o que facilita sua identificação (ARAI, 2011).

Em relação à patogenicidade, de modo geral, abrange o início do processo infeccioso e os mecanismos que levam ao aparecimento de sinais e sintomas da doença, essas bactérias podem causar infecções graves em pacientes com o sistema imunológico comprometido. Nesses casos, tais micro-organismos costumam ser invasivos e citotóxicos, frequentemente resultando em dano tecidual, disseminação sistêmica, septicemia e morte. A aderência e colonização das células

epiteliais do hospedeiro são promovidas por fímbrias ou Pili que se estendem a partir da superfície celular da bactéria (JAWETZ, 2010).

Para auxiliar na invasividade, algumas enzimas e toxinas locais fazem parte do processo, dentre estas, podem ser citadas as elastases, protease alcalina e fosfolipase C. A produção de exotoxina A por *P. aeruginosa* é responsável pela inibição da síntese protéica em células eucarióticas e apresenta potentes efeitos locais e sistêmicos, incluindo necrose de tecidos moles e choque séptico (PAPOFF et al, 2012; OKUDA et al, 2010). Contudo, a patogenicidade dos bastonetes Gram - negativos não fermentadores depende da aderência a células hospedeiras, produção de polissacarídeos (alginato), toxinas extracelulares, resistência aos fatores bactericidas do soro e presença de lipopolissacarídeo da parede celular (endotoxina). Por ser considerado o mais virulento dessa classe de micro-organismos, esses fatores têm sido exaustivamente estudados em *P. aeruginosa* (ARNOW & FLAHERTY, 1996).

Com isso, as fímbrias ou *Pili* estendem-se a partir da superfície celular e promovem a aderência da bactéria aos receptores do gangliosídeo GM-1, presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro (IRVIN et al., 1989). Já a neuraminidase elimina o ácido siálico e resíduos dos receptores de gangliosídeo GM-1, facilitando a ligação das fímbrias. Ainda que, a expressão de *pili* tenha o papel de mediar a aderência bacteriana e a colonização de superfícies epiteliais, essa estrutura, pode ser prejudicial ao patógeno, pois a aderência direta a receptores na célula fagocítica pode facilitar a morte do micro-organismo (KELLY et al., 1989). Entretanto, a bactéria apresenta mecanismos regulatórios que limitam a expressão de *pili* (ISHIMOTO & LORY, 1998).

Por outro lado, o alginato, polímero de polissacarídeo que confere ao micro-organismo uma aparência mucóide (HOIBY, 1975), funciona como mediador de aderência à mucina, além de promover resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular em leucócitos (MAI et al, 1993). Este polímero é produzido quase pela totalidade de cepas que infectam cronicamente pacientes com fibrose cística, e é responsável pelas colônias mucóides observadas em culturas de amostras clínicas obtidas destes pacientes, sendo considerado o principal determinante de patogenicidade para esses pacientes (DERETIC et al., 1994). Diferentemente, amostras isoladas de pacientes com outros quadros clínicos e amostras do meio ambiente raramente

revelam produção de alginato (MAI et al., 1993). Entretanto, todas as cepas de *P. aeruginosa* apresentam o sistema genético que codifica a produção deste tipo de polissacarídeo (DERETIC et al., 1994).

Dentre os fatores de virulência extracelulares, que facilitam o rompimento da integridade epitelial, podem ser citadas as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina e proteases como hemolisinas e exotoxinas (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995). A fosfolipase C destrói a membrana citoplasmática; destrói o surfactante pulmonar, inativa as opsoninas. A exotoxina A inibe a síntese protéica em células eucarióticas, e é produzida pela maioria das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos e apresenta potentes efeitos locais e sistêmicos, incluindo necrose de tecidos moles e choque séptico, interrompe a atividade celular e a resposta macrofágica (POLLACK, 1983).

A enterotoxina interrompe a atividade gastrointestinal normal, produzindo diarreia. Entre as proteases extracelulares, principalmente a elastase e a protease alcalina, há uma contribuição para a aderência e também para a virulência do micro-organismo. Pesquisas com estas enzimas mostram que em extratos purificados elas causam a necrose de tecidos conectivos por degradarem elastina, laminina e colágeno (HECK et al., 1986). Estas enzimas também apresentam a capacidade de inativar componentes do complemento, clivar IgG e IgA, particularmente em pacientes com fibrose cística (DORING et al., 1984; FICK et al., 1985) e degradar citocinas, incluindo interleucina 2 (IL2), Interferon γ (INF γ) e fator de necrose tumoral (TNF α) (PARMELY et al., 1990).

O lipopolissacarídeo da parede celular, existente em múltiplos imunotipos, permite a determinação do sorogrupo da bactéria em estudo; é responsável pelas propriedades endotóxicas do micro-organismo e a causa da síndrome séptica: febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada, anomalias metabólicas.

O biofilme permite a colonização de cateteres e sondas vasculares (KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, 1991), peritoniais (DASGUPTA & COSTERTON, 1989), urinários (NICKEL, et al., 1989), tubos nasogástricos (MARRIE, et al., 1990), dispositivos ortopédicos, reservatórios de armazenamento de água em farmácia e/ou laboratório (CRISTINA & COSTERTON 1984).

De acordo com Alasil et al, (2015), *P. aeruginosa* é conhecida por causar infecções agudas caracterizadas pela produção de toxinas e infecções crônicas pela

produção de espessa camada de biofilme. Sua patogênese está diretamente relacionada à condição do hospedeiro, afetando principalmente pacientes queimados, com fibrose cística e internados em UTI, cujo sistema imunológico está debilitado. Infecções causadas por *P. aeruginosa* são difíceis de tratar uma vez que estes micro-organismos possuem altos níveis de resistência a vários antimicrobianos, e expressam diversos fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento de infecções persistentes (STRATEVA et al, 2009).

3.1.1 Motilidade bacteriana

A motilidade é uma característica muito peculiar e comum a muitos micro-organismos e tem grande importância na capacidade de subsistência desses organismos, pois permite que as células se movam na direção de nutrientes ou se afastem de ambientes hostis. Clinicamente, motilidade é um importante fator de virulência, permitindo a disseminação do micro-organismo para locais distantes a partir de um foco de infecção (DRAKE, 1988). Além disso, já foi relatado o aumento de resistência a antimicrobianos durante movimentos bacterianos coletivos (KIM, 2003; LAI, 2009; HOL, 2016).

Existem vários tipos de motilidade bacteriana: sliding é uma forma passiva de movimento, mediada pelo crescimento bacteriano, que força as células a se afastarem da origem; gliding é um termo genérico que se aplica a qualquer forma de movimento ativo em uma superfície que não envolva nem pili nem flagelo. Swimming e swarming são ambas mediadas por flagelos e twitching é um movimento através de uma superfície mediada por pili tipo IV (KEARNS, 2010). *P. aeruginosa* apresenta motilidades dos tipos twitching, swimming e swarming, e por isso é o principal modelo bacteriano para estudo de motilidade. **Figura 1.**

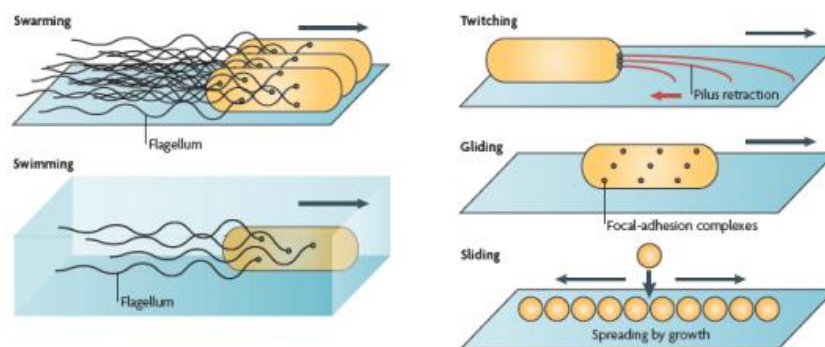


Figura 1: Tipos de motilidade bacteriana. Fonte: Adaptado de KEARNS (2010)

Swimming é um movimento unicelular que ocorre em meio líquido. Além de permitir a colonização de locais distantes, está associado a formação de biofilmes, pois o flagelo utilizado na movimentação serve também de molécula de adesão a superfícies, que é um passo importante na formação de biofilmes (O'TOOLE, 1998).

Adicionalmente, Hol et al (2016), demonstraram que uma população de *Escherichia coli* foi capaz de colonizar uma área com concentração de canamicina 50 vezes superior a CIM através de migração por swimming através de um gradiente de concentração. Essa maior tolerância só ocorreu após uma alta densidade populacional ser atingida, e a CIM dessas cepas voltou aos níveis basais quando reisoladas, mostrando que a resistência não era devida a mutações. Swarming é caracterizado por um movimento rápido e coordenado de um grupo de células em uma superfície semissólida, equivalente a concentrações de ágar de aproximadamente 0,5%.

Resistência aumentada a vários antimicrobianos relacionada a swarming, já foi relatada em várias espécies (KIM, 2003; LAI, 2009), e assim como no experimento de HOL et (2016), foram demonstradas ser independentes de mutações. Um possível mecanismo para essa maior tolerância a antimicrobianos durante swarming é a indução da expressão de genes relacionados a resistência para evitar a autotoxicidade devido a secreção de surfactantes, que possuem atividade antimicrobiana (YANG, 2017). A secreção de surfactantes é uma das mudanças fenotípicas que são necessárias para swarming.

Outras mudanças geralmente envolvem alongamento celular e expressão aumentada de flagelos (KEARNS, 2010). No caso de *P. aeruginosa* consistem na expressão de um motor flagelar adicional além daquele necessário para swimming (TOUTAIN, 2005) e a síntese e secreção de ramnolipídios (KÖHLER, 2000), que consiste de uma mistura de mono e di-ramnolipídios e seus precursores, ácidos 3-(3-hidroxi)alcanoilóxi) alcanóicos (HAAs). Glicose-1-P, um dos precursores na síntese de ramnolipídios, é também necessário para a síntese dos polissacarídeos Pel e Psl, e ativação de uma dessas vias indiretamente inibe a outra através da competição por um substrato, consistindo em uma importante forma de regulação entre a formação de biofilme ou continuação da forma de vida planctônica (WANG, 2014).

A participação de pili tipo IV em swarming é controversa. Alguns estudos apontam que cepas deficientes em pili tipo IV são incapazes de swarming (KÖLER, 2000; LEECH, 2006), porém evidências mais recentes sugerem que pili tipo IV não

só são desnecessários, como interferem negativamente (YANG, 2017). Pili tipo IV, além do papel já mencionado na adesão, permite também o terceiro tipo de motilidade de *P. aeruginosa*, twitching. Nesse movimento, que ocorre em superfícies com consistência equivalente a 1% de ágar, a capacidade de extensão e retração do pilus é usada pela célula para explorar a superfície a qual se aderiu (BURROWS, 2012). Essa movimentação desempenha importante papel na definição da estrutura do biofilme, com cepas capazes de twitching colonizando outras áreas e expandindo o biofilme após atingir uma certa densidade, enquanto cepas incapazes de twitching, formam biofilmes mais espessos e mais localizados na área de fixação inicial (KLAUSEN, 2003).

Outro estudo, de ZHAO et al. (2013) demonstra que cepas de *P. aeruginosa*, à medida que exploram uma superfície através de twitching depositam Psl, que estimulam o movimento de outras células, em um mecanismo de feedback positivo, que leva à formação de microcolônias nos locais onde há maior depósito de Psl. Tanto a presença deste tipo de pilus quanto a motilidade twitching estão relacionados com uma maior virulência, e nem sempre se pode distinguir seus papéis, já que muitos estudos são feitos com cepas deficientes em pili (KLAUSEN, 2003; BURROWS, 2012).

Contudo, alguns estudos usando cepas com pili incapazes de contração e retração demonstraram o papel de twitching como fator de virulência. Por exemplo, ZOFAGHAR et al. (2003), demonstraram que a deficiência de twitching reduz a capacidade de *P. aeruginosa* de colonizar córneas de camundongos, independentemente de ser deficiente em pili ou não.

3.2- Gênero *Klebsiella*

3.2.1- *Klebsiella pneumoniae*

As bactérias gram-negativas mais importantes no ambiente hospitalar incluem membros da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. além de bacilos gram-negativos não fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, os quais contribuem com 27 % dos agentes e 70% de todos os bacilos gram-negativos responsáveis por infecções hospitalares nos Estados Unidos (FALAGAS et al., 2014; NORDMANN et al., 2014; GUH et al., 2015).

As bactérias *Klebsiella pneumoniae* são consideradas importantes agentes etiológicos causadores de infecções no meio ambiente hospitalar e o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, induz pressão seletiva que favorece a proliferação de cepas multirresistentes. (CANDAN; AKSÖZ, 2015). As enzimas do tipo KPC são frequentemente encontradas em *Klebsiella pneumoniae* e estão associadas com infecções nosocomiais, tais como infecções do trato urinário, sepse, pneumonia e infecções intra-abdominais, entretanto não é comum sua ocorrência em infecções adquiridas na comunidade (CHEN et al., 2014). Observa-se, que em outras regiões do mundo, um aumento considerável de bacilos gram-negativos multirresistentes como causa de infecções hospitalares (WANG et al, 2015; BARAN; AKSU, 2016).

Para a realização da identificação das enterobactérias de importância clínica se utiliza provas, as principais são: fermentação de glicose e/ou lactose, motilidade, utilização de citrato, descarboxilação da lisina, oxidase, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), gás (CO₂), indol, urease, fenilalanina desaminase ou triptofanase, de gelatinase ou DNase. Contudo também são utilizadas provas complementares de identificação como a fermentação de outros carboidratos, como sacarose, maltose, arabinose, salicina, dulcitol, manitol, etc; utilização de aminoácidos: arginina e ornitina; hidrólise da esculina; ONPG; utilização de acetato; vermelho de metila; teste de Voges-Proskauer; crescimento em KCN; Ágar Tartarato de Jordan e lipase (BROOKS et al., 2014).

Quando semeadas no ágar MacConkey as colônias de *K. pneumoniae* apresentam-se elevadas e de consistência mucóide, cor rósea brilhante e com aspecto viscoso, devido à cápsula polissacarídica (antígeno K) a qual também tem função de proteger a célula bacteriana contra fagocitose e auxiliá-las na adesividade. O meio de CHROMagar KPC (CHROM é uma técnica de triagem para descoberta de produção de KPC elevadamente sensível e específico, outra forma de detecção definitiva de cepas de KPC pode ser através do teste de reação em cadeia da polimerase PCR esse teste busca pelo gene da bactéria, é específico e sensível, porém não é acessível em muitos laboratórios pelo seu alto custo (RIBEIRO, 2013; LIMA et al., 2014).

O gênero *Klebsiella* foi assim denominado pela primeira vez em 1885 pelo escritor brasileiro Dalton Trevisan, em homenagem ao microbiologista alemão Edwin

Klebs. Trevisan, também foi o responsável pela descrição da espécie da *K. pneumoniae* (BRISSE; et al., 2006).

A *K. pneumoniae* é uma bactéria que expressa resistência a até 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico (MOREIRA et al., 2013). As principais enzimas β -lactamases de interesse clínico são a β -lactamase de espectro estendido (ESBL), a metalo- β -lactamase (MBL), a β -lactamase classe C (AmpC) e a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) (MEYER, PICOLI, 2011). Membros da família Enterobacteriaceae vem apresentando múltiplos e sofisticados mecanismos de resistência aos antimicrobianos destacando-se: a) superexpressão de bombas de efluxo, facilitando a eliminação dos antibióticos para o exterior da célula; b) alteração de porinas da membrana externa, com redução na sua permeabilidade ao antibiótico no interior; e, c) produção de enzimas, como AmpC, ESBL e carbapenemases, que hidrolisam o anel β -lactâmico (CHEN et al., 2014).

De acordo com dados da Anvisa, há relatos de infecções no Brasil desde 2005, na Argentina e nos Estados Unidos quase todas as cidades apresentam casos de infecção (ANVISA, 2011).

Geralmente a transmissão ocorre por contato com secreção ou excreção de pacientes infectados ou colonizados (COTRIM, et al., 2012).

De acordo com Oliveira (2011), a patogenicidade da *Klebsiella* spp. pode ser destinada à produção de enterotoxina estável ao calor; à destreza de metabolizar a lactose; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que auxilia sua fixação às mucosas das células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para causar o processo infeccioso, e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela interrupção da ativação dos componentes do complemento. Embora as cápsulas bacterianas ajudam a defender o micro-organismo da morte no soro, outros fatores evitam a ligação do complemento à bactéria e, por conseguinte, a eliminação da bactéria mediada pelo complemento.

Os sinais e sintomas mais característicos de uma infecção pela KPC são: febre ou hipotermia, taquicardia, agravamento do quadro respiratório e nos casos mais sérios, hipotensão, inchaço e até falência de múltiplos órgãos (OLIVEIRA, 2011). Em relação ao local de infecção, a bactéria produtora de KPC pode causar pneumonia que conseqüentemente envolve a destruição necrótica dos espaços alveolares associada à ventilação mecânica, infecção do trato urinário, infecção de

corrente sanguínea, infecção de partes moles e outros tipos de infecção (MURRAY, et al, 2014).

Através de exames de comparação bioquímica é possível identificar as atividades metabólicas dos dados isolados por gênero e espécies analisados da bactéria (MURRAY, 2010). Os sistemas de testes bioquímicos atualmente constituem os mais precisos na identificação da família Enterobacteriaceae em menos de 24 horas (MURRAY et al.; 2014).

Com isso, medidas profiláticas são necessárias, uma vez que o tratamento ainda é um desafio. Sabe-se que a bactéria KPC causa um maior risco em infecções hospitalares, onde é utilizado grandes quantidades de antibióticos por tempo prolongado e em pacientes nosocomiais por longo período. Nesta perspectiva é essencial a antisepsia eficiente do ambiente, dos instrumentos cirúrgicos e das mãos com o uso de álcool a 70%, são ações fundamentais para contenção do surto. Além disso, os pacientes infectados permanecem isolados, até o controle da infecção, a fim de evitar novos contágios (COTRIM, et al, 2012).

3.3- Gênero *Candida*

O gênero *Candida* foi descrito pela primeira vez em 1923 por Berkhout e alguns anos depois já foram relatadas espécies de importância clínica tais como, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* e *C. parapsilosis*. *Candida* pertence ao Reino Fungi, divisão Fungi Imperfecta, classe dos Blastomicetos, família Cryptococcaceae. As espécies do gênero *Candida* podem ser consideradas comensais, pois fazem parte da microbiota normal de indivíduos sadios e sua presença é um importante fator predisponente para a candidíase. Normalmente são encontrados na cavidade bucal, trato digestivo e genito-urinário. Entretanto, quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou nas barreiras anatômicas secundariamente a queimaduras ou procedimentos médicos invasivos ocorre uma transição da fase comensal para a patogênica, ocasionando, na maior parte dos casos, um processo infeccioso (SAMARANAYAKE, et al., 2001; BARNETT, 2008).

Com isso, o primeiro passo para a colonização e surgimento de infecção é a aderência dos micro-organismos em células e tecidos do hospedeiro, sendo que a formação de biofilmes está fortemente associada à candidíase (KUMAMOTO; VINCES, 2005; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Além do mais, as infecções ocasionadas por essas leveduras possuem grande importância pela alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro, representando uma ameaça crescente para a saúde humana. A incidência de infecções por estes micro-organismos aumentou expressivamente durante os últimos 20 anos, principalmente após o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Existem ainda outros fatores que pré-determinam a infecção por *Candida* como uso de próteses, cateteres, tubos endotraqueais e marcapassos. Apresentam a maior taxa bruta de mortalidade dentre as infecções relacionadas ao cateter vascular, pois esses dispositivos facilitam a colonização desses micro-organismos permitindo a formação de biofilmes (BECK-SAGUE E JARVIS, 1993; WINGETER et al, 2007).

3.3.1- *Candida albicans*

C. albicans é uma levedura comensal encontrada normalmente em pequenas quantidades na pele, cavidade oral, intestino ou microbiota vaginal, cerca de 15% - 60% da população apresenta estes micro-organismos em alguma região. Além disso, as aftas encontradas em mucosas da boca ou da vagina estão relacionadas à candidíase, que normalmente são fáceis de tratar (KIM; SUDBERY, 2011). Esse micro-organismo é considerado um fungo dimórfico que pode se apresentar como leveduras esféricas ou na forma alongada denominadas hifas. Nos estágios iniciais da infecção, a formação de hifas pode promover a aderência e a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro. A capacidade de adesão é a primeira etapa que evidencia o desenvolvimento do processo infeccioso provocado pelo fungo. Quando colonizam superfícies epiteliais, a *C. albicans* encontra-se na forma leveduriforme (SWEET, 1997; JÄRVENSIVU et al, 2004).

Em geral, o tratamento de infecções ocasionadas por *Candida* e, em particular, por *C. albicans* está restrito a quatro principais classes de antifúngicos, dentre eles estão os azóis, polienos, fluoropirimidinas e as equinocandinas. Este último é utilizado como uma alternativa na presença de resistência aos primeiros fármacos antifúngicos (LEAW et al., 2006.; BASMA et al., 2009), contudo devido à alta toxicidade e custos, devem ser sempre utilizados com cautela. Em 2011, a principal causa de infecções fúngicas pulmonares foi ocasionada por *C. albicans* e a taxa de resistência aos antimicrobianos teve uma tendência de aumento com o passar dos anos (CHEN, 2013).

A *C. albicans* é a espécie de maior prevalência em infecções, representando mais de 80% dos isolados. A capacidade desse patógeno em causar infecções está correlacionada como os níveis de imunossupressão do hospedeiro e devido a expressão de fatores de virulência pelo fungo, como aderência às células do hospedeiro, hidrofobicidade celular, a formação de tubos germinativos e hifas, secreção de proteinases e fosfolipases, além da capacidade de formação de biofilmes. Esses aspectos em conjunto, têm como consequência um grande impacto clínico e econômico (ELLEPOLA, SAMARANAYAKE, 2000; AKPAN e MORGAN, 2002; POMARICO et al, 2009).

Atualmente outras espécies do gênero *Candida* também estão sendo relatadas frequentemente tais como a *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. kefyr*. O aumento na prevalência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* é preocupante, na medida em que essas espécies são mais resistentes aos agentes antifúngicos comumente utilizados (MENEZES et al, 2004, LI et al, 2007).

3.3.2- *Candida glabrata*

Cerca de um terço das candidemias que ocorrem nos Estados Unidos tem como principal responsável *Candida glabrata* (CLEVELAND et al., 2012; PFALLER et al., 2014). Uma vez que *C. glabrata* evidencia resistência aos antifúngicos azóis, as equinocandinas são o tratamento mais indicado (KANAFANI e PERFECT, 2008; PAPPAS et al., 2009). As equinocandinas começaram a ser empregadas no início dos anos 2000 (PFALLER et al., 2008). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) entre outros, nos últimos anos, têm relatado um aumento de infecções na corrente sanguínea causadas por cepas resistentes a equinocandinas e espécies multirresistentes de *Candida*, sendo em sua maioria *C. glabrata* (FARMAKIOTIS, et al., 2014; CLEVELAND et al., 2015).

Contudo, esta resistência adquirida a partir da exposição a equinocandinas e intercedidas através de mutações nos genes FKS é um problema, visto que há poucas opções terapêuticas para o tratamento de *C. glabrata*. Uma alternativa seria a utilização de Anfotericina B, porém apresenta alto grau de toxicidade (KAGAN et al., 2012; BEYDA et al., 2014). Com isso, temos que as infecções associadas à *C. glabrata* são naturalmente mais resistentes aos antifúngicos, estando fortemente

relacionadas com infecções sistêmicas que resultam em altas taxas de mortalidade (LI, et al., 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Além disso, cerca de 45% dos portadores de próteses de acrílico desenvolvem uma doença denominada estomatite, tendo a *C. albicans* como a principal responsável por esta infecção. No entanto, *C. glabrata* frequentemente tem sido isolada na superfície do acrílico e no palato, representando o segundo agente patogênico fúngico prevalente na cavidade oral (FIGUEIRAL et al., 2007).

3.4- Biofilmes

Sabe-se que as bactérias são os seres mais antigos da terra e nenhuma outra forma de vida tem tanta importância na sustentação e manutenção da vida no planeta como estas. Ubíquas na natureza, elas estão presentes no solo, no ar e na água, colonizam a pele, as mucosas e o trato intestinal dos homens e de outros animais, estando intrinsecamente ligadas à vida dos organismos e aos diversos ambientes em que habitam (SANTOS, 2004).

Por muito tempo se teve a certeza que as bactérias viviam apenas de forma isolada, planctônica. Entretanto, estudos têm revelado que a maioria das bactérias não cresce apenas como seres individuais, mas também em comunidades estruturadas, fixadas a um substrato. (MENOITA et al., 2012).

O conceito de biofilmes é algo que vem sendo discutido em muitos sistemas desde Antonie van Leeuwenhoek, em 1675, mas a teoria geral da existência dos mesmos só foi publicada em 1978, através de um estudo realizado por Costerton, Geesey e Cheng. A partir dessa publicação, foi observado que várias bactérias não se desenvolvem igualmente quando comparadas como células individuais, mas sim em comunidades estruturadas, denominadas de biofilmes, onde estariam presentes em todos os ecossistemas naturais e também patogênicos (COSTERTON et al., 1981; LÓPEZ et al., 2010).

Embora tenha mais de 70 anos do primeiro relato sobre biofilmes (ZOBELL, 1943), eles ainda representam uma grande preocupação, principalmente, nas áreas de alimentos, ambiental e biomédica (FLINT et al., 1997; SIHORKAR; VYAS, 2001; MAUKONEN et al., 2003; SIMÕES et al., 2010). A partir de então, o conceito de biofilme tem evoluído e impulsionado várias pesquisas nas mais diversas áreas relacionadas à ecologia microbiana (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os micro-organismos presentes em biofilmes apresentam características fundamentais como: a capacidade de adaptação em ambientes diferentes e variabilidade metabólica. As bactérias apresentam dois estados básicos de vida: as células planctônicas, que são caracterizadas como células de vida livre, com metabolismo mais ativo, e as células sésseis, que são constituintes dos biofilmes e que apresentam um metabolismo mais compensado. As células planctônicas são essenciais para garantir rápida proliferação e disseminação dos micro-organismos para outros locais, contudo, as células sésseis têm a característica de cronicidade (CONSTERTON et al., 1981).

O termo biofilme pode ser definido como um ecossistema ou comunidade microbiológica complexa, que tem a sua caracterização por apresentar células irreversíveis que possuem adesão a um substrato ou podendo estar aderidas entre si e colocadas em uma matriz formada por polissacarídeos extracelulares de produção própria. As bactérias presentes em biofilmes encontram-se protegidas do sistema imunológico e da exposição à antimicrobianos, potencializando a dificuldade de seu tratamento (CAIXETA, 2008; SALDANHA, 2013).

Considerada uma estrutura muito porosa e adsorvente, o biofilme é composto fundamentalmente por água, representando 97% de seu conteúdo total. Os micro-organismos constituem apenas uma pequena parte, de 2 a 5%, contudo excretam substâncias poliméricas extracelulares, polissacarídeos, glicoproteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, que juntos compõe a massa seca do biofilme. Tais substâncias são responsáveis pela morfologia, estrutura e integridade funcional, que reunidas formam uma espécie de “rede”, na qual se acumulam água e nutrientes essenciais para a sobrevivência bacteriana (DAVEY; TOOLE, 2000).

Como exemplo clássico de biofilme, pode-se citar a camada de lodo que se forma nas pedras em riachos, do mesmo modo que o tártaro formado nos dentes. E estima-se que mais de 90% dos micro-organismos vivam sob a forma de biofilmes e que estes estão presentes em praticamente todos os ecossistemas (COSTERTON et al., 1987; HALL-STOODLEY et al., 2004).

Com isso, eles representam a parte majoritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade (XAVIER et al., 2003).

Sendo assim, a maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre não com células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas sim como comunidades sésseis (células microbianas associadas a

diversos tipos de superfícies), ou biofilmes (WATNICK; KOLTER, 2000; WEBB et al., 2003).

Os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais diversos tipos de ambientes, sejam eles bióticos como tecidos vegetais e animais, ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos. A opção por sua constituição está no fato de que estes, por meio da formulação de micro-habitats, proporcionam proteção aos indivíduos que dele fazem parte contra as intempéries e estresses do meio ambiente (COSTERTON et al., 1999; MADDULA et al., 2006; JOHNSON, 2007).

É importante salientar que alguns biofilmes bacterianos podem ser considerados benéficos para a saúde humana.

Com isso, a existência de algumas cepas de bactérias que evoluíram para formar biofilmes e que persistem em nichos humanos específicos foi extremamente importante para estabelecer um grupo diversificado de bactérias simbióticas que são referidas como microbioma humano. Um exemplo a ser citado, é a microbiota intestinal que contribui para a síntese de vitaminas, absorção de nutrientes e produção de energia, além de contribuir para a maturação do sistema imunológico. Entretanto, um biofilme bacteriano também pode ser prejudicial para a saúde humana, um exemplo é a bioincrustação bacteriana de implantes cirúrgicos, cateteres e lentes de contato, que além de interferir na função destes sistemas, ainda fornece um mecanismo para a introdução de bactérias patogênicas no corpo humano, incentivando o aparecimento de infecções sistêmicas graves (WEINEL, RENNER, 2011).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), também conhecida como glicocálix, é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa, determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Ainda que a predominância seja de polissacarídeos, ela também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas, ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico) e fosfolípidos (WATNICK; KOLTER, 2000; GUIBAUD et al., 2008).

A formação do biofilme (**Figura 2**) tem início com a adesão primária das bactérias em sua forma planctônica a uma determinada superfície, este processo é considerado complexo, pois ocorre através de interações físico-químicas não específicas entre a bactéria e a superfície abiótica. Tal interação ocorre

aleatoriamente através de força gravitacional, movimento browniano ou de forma ordenada, através de mecanismos de cada patógeno como quimiotaxia e motilidade por meio de flagelos e pili. Este estado é considerado reversível e caracterizado por interações físico-químicas não específicas de longo alcance entre os mesmos, incluindo forças hidrodinâmicas, hidrofóbicas, eletrostáticas, força de van Walls e força de atração e repulsão, que será o fator primordial para determinação desta fase de adesão. (MORAES, et al., 2013; TRENTI et al, 2013). Já a adesão em superfícies bióticas, é observada através de interações moleculares mediadas por ligações específicas (ligante-receptor). Após se aderirem, ocorre a proliferação destes micro-organismos levando a um acúmulo dos mesmos, com isso, são produzidas substâncias que tem a função de atrair outros micro-organismos e fazer com que as células bacterianas produzam uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), que se comporta como uma membrana protetora que recobre totalmente a comunidade bacteriana, tornando o ambiente interno a ele diferenciado, podendo ocorrer alterações de pH, temperatura, umidade, produção de toxinas, expressão dos fatores de virulência e até mesmo troca plasmidial (DONLAN, et al, 2001; CAIXETA, 2008). As substâncias produzidas fazem com que a densidade bacteriana aumenta através da presença de moléculas auto indutoras que ao se acumular induzem a transcrição de genes específicos, regulando várias funções bacterianas, como motilidade, virulência e a capacidade de produção de EPS. Este processo de comunicação pode ser encontrado em diversos micro-organismos, muitas vezes associado a bactérias patogênicas e é referido como *Quorum sensing* (sistema de comunicação intra e interespecies de micro-organismos) (RUTHERFORD; BASSLER, 2012, TRENTI et al., 2013).

A segunda etapa é conhecida como adesão secundária ou adesão irreversível. As bactérias que se aderem à superfície (colonizadores primários) passam a se multiplicar, formando macro colônias, as quais começam a sintetizar EPS e estabelecem o processo de adesão. No decorrer desta fase, os patógenos são capazes de se ligar a células da mesma ou de diferentes espécies (colonizadores secundários), que podem utilizar o EPS como substrato, formando agregados com os micro-organismos já aderidos a superfície (STOODLEY et al., 2002, MENOITA, 2012).

Uma vez estruturada a formação inicial do biofilme, ocorre o processo de troca de substâncias entre o meio interno e o externo. Esta troca acontece através

do gradiente de concentração, e pelos sinalizadores produzidos pelos micro-organismos, fazendo com que o EPS seja mais seletivo, e as bactérias mais próximas a extremidades do mesmo tenham o metabolismo mais ativo do que as que foram aderidas inicialmente (MENOITA, 2012).

Na etapa seguinte, ocorre o processo de dispersão/deslocamento ou desprendimento de porções de biofilme, conhecido como erosão, ou, “sloughing off”, em determinadas situações, o ambiente pode não se encontrar mais favorável, por alterações ambientais, ou devido a programação celular exercidas pelas próprias bactérias. Podem ocorrer no intuito de “crescimento” da área acometida pelo biofilme, incidindo o desprendimento de células mais externas a matriz, ou pelo processo de abrasão, devido a constantes colisões que ocorrem entre a superfície em que o biofilme está aderido e o meio em que se encontra (XAVIER, 2005; MENOITA, 2012; TRENTI, et al., 2013).

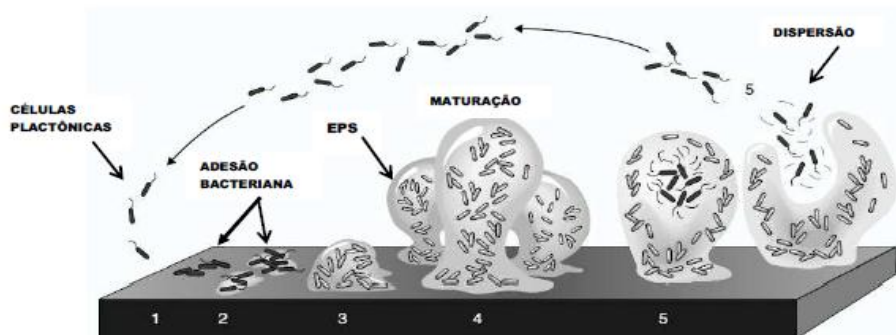


Figura 2: Etapas de formação do biofilme bacteriano.
Fonte: Adaptado de STOODLEY et al., 2002.

Os micro-organismos, em um ambiente natural, não se aderem diretamente a um substrato por si, sendo necessária a formação de uma película “condicionante” nesta superfície. Vários micro-organismos não possuem mecanismos que lhe permitam aderir direta ou fortemente a superfícies, na ausência de filme condicionante. A instauração deste filme ocorre rapidamente e sua velocidade de formação está diretamente ligada à concentração de substâncias orgânicas no meio e sua afinidade pelo suporte sólido. A presença do filme condicionante pode alterar consideravelmente as características físico-químicas da superfície do suporte sólido, favorecendo ou em alguns casos inibindo a adesão inicial de micro-organismos (PERCIVAL et al., 2011).

Sendo assim, o fenômeno de adesão ocorre naturalmente em meios aquosos e tanto as propriedades estruturais da superfície, quanto às características físico-químicas da membrana celular bacteriana são fatores determinantes neste processo. Conhecer o ambiente, as características da superfície e o comportamento bacteriano são pré-requisitos básicos para compreensão do mecanismo de adesão (ARAÚJO et al, 2010).

De acordo com Donlan (2002), as características do meio, tal como o pH, níveis de nutrientes, força iônica, temperatura, concentração de bactérias e tempo de exposição podem desempenhar um papel fundamental na taxa de adesão microbiana em um substrato, assim como a presença de agentes antimicrobianos, que podem dificultar a adesão de micro-organismos sensíveis.

Além das forças eletrostáticas, as características do material como rugosidade, composição química e hidrofobicidade podem facilitar a adesão inicial do micro-organismo (WEINEL, RENNER, 2011). As superfícies ásperas são mais suscetíveis à formação de biofilme, provavelmente devido à redução das forças de cisalhamento e do aumento da superfície de contato. Estudos indicam que os biofilmes também tendem a se formar mais prontamente em materiais hidrofóbicos, como teflon e outros plásticos, do que em vidro e metal (APARMA; YADAV, 2008).

Existem diversas infecções que são proporcionadas por patógenos que se tornaram multirresistentes a antimicrobianos, sendo um dos grandes desafios presentes na saúde pública atualmente, impactando no aumento de morbidade e mortalidade e consequentemente no aumento do tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL et al., 2012).

Com isso, o órgão norte-americano “National Institute of Health” (NIH) afirma que os biofilmes têm relação em torno de 80% de todas as infecções médicas no mundo, sendo as principais: endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções que têm relação com a fibrose cística e colonizadores de implantes biomédicos, como: cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses (DONLAN; COSTERTON, 2002; HOIBY et al., 2011).

Sendo assim, a maioria das infecções causadas por biofilmes estão associadas à utilização de implantes médicos invasivos (cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas, dentre outros).

O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o mesmo e do meio ou fluidos a que os micro-organismos estão expostos (DONLAN, 2001). Um grande número de cateteres é inserido em pacientes todos os anos, e destes, mais de 60% acabam relacionados com a formação de biofilmes. Nestes casos, o período de hospitalização pode aumentar de 2 a 3 dias onerando em 1 bilhão de dólares, todos os anos, os custos associados ao manejo do paciente (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Sendo assim, a problemática da formação do biofilme ocorre devido ao fato de que estas estruturas podem ser 10 a 100 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células planctônicas (não fixas). Essa resistência pode estar relacionada à dificuldade de penetração dos antimicrobianos na matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (como o EPS), com as alterações fenotípicas dos micro-organismos no biofilme, com o desenvolvimento de mecanismos de resistência e ainda devido ao seu modo de crescimento estar associado à natureza crônica das infecções posteriores. Isso significa que apresentam um papel expressivo no aparecimento de doenças infecciosas (TOMIHAMA et al, 2007).

Quando estas células apresentam resistência aos fármacos, torna-se prejudicial para o paciente, utilizar um antimicrobiano com o intuito de acabar com a infecção, obtém-se como resultado uma reinfecção. Isso se dá pelo fato de nem todos os micro-organismos responderem a ação do antimicrobiano. Os patógenos que apresentam esta característica são chamados de dormentes ou persistentes, pois, têm baixas taxas metabólicas e são comuns de serem encontrados na estrutura dos biofilmes, onde há pouca oferta de oxigênio. O baixo metabolismo dessas células persistentes faz com que estas venham a se tornar mais seletivas, tornando-as resistentes aos antimicrobianos. Sabe-se que o antimicrobiano normalmente tem o seu mecanismo de ação no período de crescimento da bactéria, como na síntese protéica, síntese de ácidos nucleicos e de parede celular, portanto o antimicrobiano vai ser eficaz na maior parte da população de bactérias em biofilme, exceto nas persistentes, o que pode proporcionar reinfecção, quando a terapia não propicia outro subterfúgio na eliminação destes patógenos (STEWART, 2002; LEWIS, 2012).

Com isso, é possível de analisar que a presença dos biofilmes é multifatorial e essa resistência foi desenvolvida como uma resposta de estresse do micro-organismo ao meio em que se encontra, visto que a vida em biofilmes permite que

as células produzam respostas diferenciadas às alterações ambientais (MAH, 2012, TRENTI et al., 2013).

Várias espécies do gênero *Pseudomonas* são usadas na área da biotecnologia ambiental como em processos de biorremediação (KABENGE et al., 2017). Porém, no que concerne à capacidade de formação de biofilmes, *P. aeruginosa* apresenta maior relevância, devido à morbimortalidade causada pela infecção por este patógeno oportunista em muitas doenças recorrentes e persistentes que, frequentemente, acometem pacientes debilitados ou imunocomprometidos (MASÁK et al., 2014; MULCAHY et al., 2014). Diversas infecções nosocomiais estão associadas à formação do biofilme em sistema de ventilação, abastecimento de água, feridas crônicas e instrumentos médicos como superfícies de cateteres, bisturis, marca-passos, válvulas cardíacas (MULCAHY et al. 2014). Os biofilmes também podem se formar rapidamente nas indústrias de alimentos e provocar infecções ou intoxicações relacionadas às substâncias produzidas pelas matrizes do biofilme. Isso ocorre devido à capacidade de fixação em superfícies abióticas como luvas, materiais de embalagens, superfícies de distribuição e armazenamento de alimentos, equipamentos industriais e a fixação em superfícies bióticas como carnes, vegetais, ossos, dentre outros o que possibilita maior risco de contaminação bacteriana (SPERANZA, 2017; GALIÈ et al., 2018).

A formação de biofilmes de *K. pneumoniae* foi associada como sendo uma etapa importante na patogênese dessas bactérias, particularmente associado ao uso de cateteres. A matriz dos biofilmes fornece condições necessárias para atenuar a atividade dos fármacos. Trata-se de uma matriz densa de proteínas e polissacarídeos, que impede a difusão eficiente de antibióticos, resultando em uma exposição significativamente reduzida de bactérias o que aumenta a persistência e o estabelecimento de infecções crônicas no trato urinário (CLEGG, MURPHY, 2016; PACZOSA, MECSAS, 2016; SANTAJIT, INDRAWATTANA, 2016).

O biofilme formado por fungos, especialmente por *C. albicans*, é a causa de infecções associadas a dispositivos médicos, como os catéteres (MUKHERJEE et al, 2005). Este micro-organismo é o principal patógeno encontrado em casos de infecções hospitalares, sendo que a remoção do cateter colonizado é quase sempre necessária. O biofilme formado nessas condições pode acarretar uma disseminação de patógenos na corrente sanguínea, o que implica alta morbidade e mortalidade dos pacientes hospitalizados. O crescente número de pacientes

imunocomprometidos, sobretudo transplantados, eleva o grau de atenção à infecções causadas por leveduras patogênicas oportunistas. Em sua maioria, estes patógenos são do gênero *Candida spp.* Dados revelam que 60% das espécies de leveduras isoladas de pacientes com infecções por fungos, são da espécie *C. albicans*, o que torna a infecção por este micro-organismo a mais prevalente dentre os fungos (FREYDIERE et al., 2001). Estas infecções são particularmente sérias, pois as células organizadas em biofilme são resistentes a antifúngicos (KUHN et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2005; BLANKENSHIP et al., 2006). A resistência a antifúngicos é adquirida no início da formação do biofilme, e aparentemente é regida por diferentes mecanismos em biofilme novo e maduro (MUKHERJEE et al., 2005).

3.4.1- Biofilme em material médico hospitalar

A sonda é um recurso importante no amparo à saúde e tem sido amplamente empregado nos cuidados aos pacientes críticos desde a década de 1930. O uso é frequente e demonstrado em estudos que apontam sua inserção em 25% dos pacientes hospitalizados e em 70% quando internados em UTI (LEUCK et al., 2012; DUDECK et al., 2013). Apesar de auxiliar no tratamento de pacientes gravemente enfermos, a sonda vesical é o principal fator de risco para a ocorrência de infecções do trato urinário, e praticamente todas essas infecções estão associadas a sua utilização (NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK, 2016).

A sonda urinária nada mais é que um tubo de drenagem que é inserido na bexiga através da uretra, a fim de formar um sistema de drenagem temporário, permanente ou intermitente, dependendo da indicação e da condição clínica do paciente, como exposto a seguir (OLIVEIRA, 2005):

- Sondagem de alívio: inserção da sonda estéril pelo canal uretral até a bexiga, para drenagem imediata da urina. Após a drenagem, a sonda é retirada.
- Sondagem de demora: inserção da sonda estéril pelo canal uretral até a bexiga para drenagem contínua da urina por um determinado período.
- Sondagem intermitente: realização de sondagens de alívio em intervalos de tempo predefinidos. Essa técnica visa evitar o cateterismo de demora.

- Sondagem suprapúbica: introdução de uma agulha fina e estéril na pele da região suprapúbica ao nível da bexiga para drenagem da urina.

As sondas urinárias consistem em vários tipos, tamanhos e materiais. O tipo mais comum é o de Foley, o qual pode ter dois ou três lúmens. Cada tipo de lúmen é empregado para diferentes funções – normalmente insuflar o balonete, drenar a urina e irrigar a bexiga –, em situações específicas, como cirurgia urológica ou quando a bexiga deve ser lavada continuamente ou intermitentemente, para remover coágulos sanguíneos ou sedimentos (VAHR et al., 2012; JAHN et al., 2012).

Quanto à conformação estrutural e composição do material que são fabricados, as sondas podem ser de silicone, látex, politetrafluoretileno (PTFE) ou revestidos com silicone, hidrogel e antimicrobianos (VAHR et al., 2012; JAHN et al., 2012), conforme descrito a seguir:

Silicone: apresentam melhor biocompatibilidade e é um material considerado hipoalergênico. Uma vez que não possui revestimento, tem lúmen relativamente grande e tendência reduzida para incrustação (depósito de sais na superfície da sonda). Enquanto o silicone pode causar menos irritação dos tecidos, seu balonete tende a perder fluido, fato que aumenta o risco de deslocamento (VAHR et al., 2012). Não há evidências suficientes para determinar o melhor tipo de sonda vesical de demora em adultos. No entanto, o de silicone pode ser preferível a outros materiais, para diminuir a inflamação uretral e, consequentemente, o desenvolvimento de ITU-AC nos pacientes cateterizados por longos períodos (JAHN et al., 2012; VAHR et al., 2012; RAMANATHAN et al., 2014);

Látex: feito de borracha natural, considerado um material flexível, mas com alguns inconvenientes. O uso de sondas de látex é limitado a curto prazo. Normalmente, é evitado sempre que possível, devido à sua baixa biocompatibilidade, à associação com inflamação uretral e à sensibilidade à formação de incrustações por minerais na urina (VAHR et al., 2012; RAMANATHAN et al., 2014). O uso por longos períodos pode causar estenose uretral (GOULD et al., 2009). Além disso, as sondas de látex exibem alta propensão para a formação de biofilme, devido à combinação favorável de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície, que permitem a fixação e a colonização por ampla variedade de micro-organismos (RAMANATHAN et al., 2014);

PTFE: sonda de látex revestido com PTFE, também conhecido como teflon. Essa sonda foi desenvolvido para proteger a uretra do látex. É mais suave do que o

látex puro, o que ajuda a prevenir a incrustação e a irritação. É contraindicado para pacientes sensíveis ao látex (JAHN et al., 2012; VAHR et al., 2012);

Látex revestidos com silicone: são sondas revestidas com silicone por dentro e por fora. O dispositivo permanece com a força e a flexibilidade do látex, e com a durabilidade e a redução de incrustação características da sonda de silicone (JAHN et al., 2012; VAHR et al., 2012);

Revestidos com hidrogel: suaves e altamente biocompatível. Por ser hidrofílico, absorvem fluidos, formando uma proteção em torno da sonda, e reduzem o atrito uretral e irritações (JAHN et al., 2012). A superfície de hidrogel foi desenvolvida para evitar a formação de biofilme, alterando a superfície da sonda e diminuindo a afinidade bacteriana. Entretanto, estudos não apontaram reduções consistentes na ocorrência de ITU-AC com o uso desse dispositivo (NICOLLE, 2012; PICKARD et al., 2012);

Revestidos com prata: a sonda é combinada a uma fina camada de liga de prata com hidrogel. Sondas revestidas com prata-hidrogel estão disponíveis no látex e silicone, e podem reduzir significativamente a incidência de bacteriúria assintomática, mas somente quando permanecem por menos de 7 dias. Não são rotineiramente recomendados, pois a relação entre o custo e o benefício não é favorável, e a possível associação com toxicidade e resistência microbiana não é bem conhecida (TENKE et al., 2012; JAHN et al., 2012; BONFILL et al., 2017).

Alguns critérios devem ser analisados ao escolher uma sonda, como facilidade de utilização, compatibilidade com os tecidos, tendência para incrustação, e formação de biofilme e conforto para o paciente (VAHR et al., 2012). É importante ressaltar que não há evidências suficientes para determinar qual é o melhor tipo de sonda em relação à prevenção de infecção (TENKE et al., 2012; JAHN et al., 2012; VAHR et al., 2012; VERMA et al., 2016).

Outro aspecto a ser considerado na sonda é o diâmetro. Ele é calibrado de acordo com a escala Charrière (Fr), que indica o diâmetro externo e progride um terço de milímetro por número. Assim, uma sonda com calibre 18Fr significa que tem 6mm de diâmetro. A escolha do calibre a ser utilizado deve ser o menor possível, apropriado para a drenagem adequada, a fim de minimizar o trauma uretral que causa inflamação e, conseqüentemente, a infecção (GOULD et al., 2009; VAHR et al., 2012).

A conformação estrutural da sonda pode influenciar na ocorrência e na gravidade da ITU-AC quando favorece, por exemplo, a formação de biofilme, que será discutida posteriormente.

A infecção do trato urinário associada a sonda vesical de demora (ITU-CVD) representa cerca de 40,0% das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e praticamente todos os casos de ITU hospitalar estão relacionados com o uso da sonda vesical (CV) (TERNAVASIO-DE LA et al., 2016).

A incidência de bacteriúria, presença de bactérias na urina, em pacientes sondados é proporcional ao tempo de cateterização, sendo o risco diário de 3,0 a 10,0% chegando a 100,0% em período de 30 dias (VAHR et al., 2012; CARDOSO et al., 2015).

O micro-organismo mais frequentemente associado às ITU-AC é *Escherichia coli*, uma enterobactéria Gram-negativa, que coloniza o intestino. A alta prevalência dessa bactéria se dá por sua motilidade, favorecendo o movimento contra uma corrente líquida, com fluxo de 25mL/hora, facilitando a ascensão por via intra ou extraluminal do CV (NICOLLE, 2014). A presença de fímbrias, que são apêndices filamentosos que se fixam na parede do trato urinário, tem papel menor na patogênese, e apenas 10% das enterobactérias identificadas nas ITU-AC são portadoras de fímbrias (PIGRAU, 2013).

Além de *E. coli*, foram encontrados outros micro-organismos fortemente associados a infecções em estudos internacionais, como *Candida* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Outros Gram-negativos e *Staphylococcus* sp. coagulase negativo contribuíram com menores percentuais (GOULD et al., 2009; NICOLLE, 2012).

Os biofilmes nas sondas urinárias são formados por bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas e fungos através da fixação que se inicia pela deposição de urina na superfície da sonda (DJERIBI et al., 2011). Além disso, a motilidade e presença de flagelos nos uropatógenos facilitam a aderência necessária para a formação do biofilme (TENKE et al., 2012). Estudos identificaram produção significativa de biofilme nas ITU-CVD em amostras de *E. coli* (60,0–80,0%), *Klebsiella* sp (16,0–21,0%), *Staphylococcus* coagulase negativo (3,0–6,0%), *P. mirabilis* (6,0%), *P. aeruginosa* (2,0–4,0%), *Acinetobacter* spp (1,0–2,0%) e

Enterococcus (2,0%) (BROOMFIELD et al., 2009; NIVEDITHA et al., 2012; ALVES et al., 2014).

Um fator importante sobre a etiologia das infecções está associado à resistência bacteriana. Pacientes internados nas UTI possuem alto risco para infecções do trato urinário causada por bactérias resistentes, pois muitos apresentam alterações no sistema imunológico e recebem antimicrobianos de amplo espectro, além de a sonda ser importante reservatório de micro-organismos multirresistentes, ocasionando infecções graves, hospitalizações prolongadas, altos custos e maior mortalidade (BARROS et al., 2013; PIGRAU, 2013; CARRARO-EDUARDO et al., 2015).

Outro aspecto na resistência microbiana e no tratamento das infecções se refere à formação do biofilme, um complexo de material orgânico, constituído por micro-organismos que crescem em colônias organizadas de células envoltas por uma matriz, composta, principalmente, de exopolissacarídeos (EPS) de origem microbiana, formada por macromoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lipídios. O biofilme propicia a adesão do micro-organismo à superfície da sonda, de maneira a dificultar sua remoção e o inverso também pode ocorrer, a superfície da sonda favorece a adesão da bactéria e a partir daí a formação do biofilme, ocasionando a infecção (DONLAN et al., 2002; TERNAVASIO-DE LA VEJA et al., 2016).

O biofilme constitui o principal fator de risco para as infecções e estima-se que cerca de 65,0 a 80,0% das infecções relacionadas a dispositivos invasivos estejam associadas à sua presença. O tempo necessário para se formar um biofilme em uma sonda vesical depende da associação microbiana no dispositivo e do tipo de material (TENKE et al., 2012; SUBRAMANIAN et al., 2012; STICKLER, 2014). Especificamente relacionados as sondas urinárias, o biofilme é considerado como um importante fator, que conduz a tratamentos prolongados, elevados custos de saúde e taxas de mortalidade (DOHNT et al., 2011).

Outro aspecto importante é a capacidade de produção de uréase pelos micro-organismos, que contribui para a formação do biofilme cristalino e consequente obstrução do SVD (STICKLER, 2014). *P. mirabilis*, patógeno mais prevalente nos cateterismos crônicos, é responsável pela maioria das obstruções (STICKLER, 2014; NICOLLE, 2014). A urease produzida por esse micro-organismo hidrolisa ureia seis a dez vezes mais rapidamente em comparação com outras espécies (TENKE et al.,

2012; STICKLER, 2014; NICOLLE, 2014) e a amônia liberada eleva o pH da urina e precipita cristais de cálcio e fosfatos de magnésio na superfície do cateter. Essas incrustações bloqueiam o lúmen do cateter favorecendo o refluxo urinário com possibilidade de evolução para pielonefrite aguda, bacteremia, prostatite crônica, infecção renal crônica, sepse e, em alguns casos, a morte (BROOMFIELD et al., 2009; TENKE et al., 2012; ALVES et al., 2014).

Além disso, as sondas de látex apresentam alta propensão à formação de biofilmes devido à composição favorável de superfícies irregulares hidrofóbicas e hidrofílicas que permitem a fixação e colonização por vários micro-organismos (STICKLER, 2014; RAMANATHAN et al., 2014).

Uma variedade de alternativas de sondas de látex tem sido investigada para evitar a formação de biofilme e, conseqüentemente, a infecção. As alternativas incluem sondas de silicone ou revestidos de silicone, impregnados com antimicrobianos, revestido com prata ou hidrogel. O uso do silicone foi pensado para diminuir a inflamação uretral e fixação bacteriana. Estudo demonstrou vantagem da sonda de silicone puro comparado com o de látex revestido de silicone em termos de incidência de colonização bacteriana, bem como a formação de biofilme (VERMA et al., 2016). Em relação as sondas impregnadas com antimicrobianos e revestidos com prata, esses foram desenvolvidos para retardar a proliferação bacteriana e a superfície com hidrogel é teorizada para evitar a formação de biofilme por alteração da afinidade superficial bacteriana (PIGRAU, 2013; RAMANATHAN et al., 2014; VERMA et al., 2016).

Por outro lado, estudo multicêntrico sugeriu que o uso de sondas impregnadas com antimicrobianos reduziu o risco de ITU-SVD quando comparado com a sonda de látex revestido. Entretanto, esses resultados foram limitados ao curto prazo de sondagem e sua recomendação é incerta quanto à prevenção de biofilme e ITU-SVD em períodos acima de sete dias além de uma relação custo-benefício desfavorável (GOULD et al., 2009; PICKARD et al., 2012).

Assim, a indicação para utilização de sondas impregnadas com antimicrobianos é restrita para situações de insucesso no controle das taxas de ITU-SVD quando já implementadas as recomendações globais para prevenção como o uso restrito, técnica asséptica na inserção e avaliação da necessidade de manutenção da sonda (BROOMFIELD et al., 2009; GOULD et al., 2009; RAMANATHAN et al., 2014). Todos os tipos de sondas atualmente disponíveis

podem ser vulneráveis à formação de biofilme e, além da retirada da sonda, não existem evidências de métodos eficazes para sua prevenção ou controle (GOULD et al., 2009; PICKARD et al., 2012; PIGRAU, 2013; STICKLER, 2014; RAMANATHAN et al., 2014; VERMA et al., 2016).

Outra questão crítica é o tempo de permanência do SVD, que é proporcional ao risco de formação do biofilme. Os biofilmes se desenvolvem de forma dinâmica, com alterações nas populações microbianas e virulência ao longo do tempo e estimulam o crescimento microbiano e a ascensão no sistema urinário (TENKE et al., 2012; NICOLLE, 2014).

Deste modo, a conduta frente à utilização do SV deve ser criteriosa, desde a avaliação da indicação, inserção, manutenção e a sua remoção o mais breve possível (GOULD et al., 2009).

3.5- Resistência a antimicrobianos

Ao longo de toda sua história, o homem foi vítima de muitas doenças infecciosas, que por alguns períodos foram a principal causa de mortalidade. Infecções hoje facilmente tratáveis frequentemente resultavam em óbitos ou deixavam sequelas importantes. Este quadro permaneceu inalterado até a industrialização da penicilina na década de 40. A partir de então, vários outros antimicrobianos foram descobertos e passaram a ser comercializados, possibilitando muitos avanços na medicina e o consequente aumento da qualidade e expectativa de vida da população (PIDDOCK, 2012).

O que ficou conhecido como era de ouro da descoberta dos antimicrobianos, entre os anos 40 e começo dos anos 70, criou uma percepção equivocada de que doenças infecciosas já não representavam um grande problema de saúde. Assim, o foco das pesquisas de medicamentos mudou para doenças não-infecciosas, e a descoberta de novos antimicrobianos despencou (O'NEILL, 2016). Paralelamente a isso, a resistência a antimicrobianos começou a aumentar, e hoje chega a níveis assustadores, como os 80% de resistência à oxacilina em cepas de *Staphylococcus aureus*, ou 50% de resistência a carbapenêmicos em cepas de *Klebsiella pneumoniae* encontradas em alguns estudos. Em 2007, micro-organismos multirresistentes foram responsáveis por 400.000 infecções e 25.000 mortes na Europa (BUSH, 2011) e se estima que em 2050 causarão 10 milhões de mortes por ano (O'NEILL, 2016). O impacto financeiro dessas infecções também é enorme.

Pacientes que apresentam infecções por micro-organismos multirresistentes frequentemente são colocados em isolamento nos hospitais para evitar a disseminação do micro-organismo para outros pacientes. Além disso, o tratamento exige medicações mais caras e que muitas vezes apresentam efeitos colaterais importantes, levando a um aumento no tempo de internação (MARMITT, 2015).

Dessa forma, o tratamento, que já representa de 30 a 50% dos custos com medicamentos em hospitais (TOSCANO, 2015), se torna ainda mais oneroso. O'NEILL (2016) estima que se nada for feito, as perdas econômicas chegarão a U\$100 trilhões até 2050. Embora a escalada da resistência esteja inevitavelmente relacionada ao intenso uso de antimicrobianos pela humanidade, micro-organismos resistentes já existiam muito antes da descoberta da penicilina. O primeiro isolado da National Collection of Type Cultures (NCTC) do reino Unido é uma cepa de *Shigella flexnerii* isolada de um soldado na primeira guerra e estudos recentes demonstraram que era já resistente a penicilina e eritromicina (MATHER, 2014). A presença de genes de resistência a vários antimicrobianos em amostras obtidas na camada de Permafrost, na região do ártico, que estiveram congeladas por milhares de anos e modelos computacionais estimam que genes de resistência se originaram há milhões de anos (PERRY, 2016). Em seu relatório, encomendado pelo governo britânico, O'NEILL (2016) sugeriu algumas ações para combater a ascensão da multirresistência e suas graves consequências, entre as quais o estímulo à pesquisa de novos antimicrobianos.

Entretanto, a compreensão de que o desenvolvimento de resistência é um mecanismo natural inevitável e acelerado pela forte pressão evolutiva imposta pelo uso de antimicrobianos, levou estudiosos a propor formas de controle de infecção que dificultem o desenvolvimento de resistência, como a utilização de vacinas (KENNEDY, 2017), terapia antimicrobiana combinada (REX CONSORTIUM, 2013) e interferência em mecanismos de virulência (ALLEN, 2014) bem como sua regulação e relação com biofilmes.

3.6- Óleos Essenciais

Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas apresentam o chamado metabolismo secundário. Os vegetais produzem uma ampla variedade de compostos orgânicos, que não têm

ação direta conhecida em seus processos vitais, como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Estas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Dentre os metabólitos secundários estão os óleos essenciais, que vêm ganhando espaço devido à sua utilização crescente nas áreas de alimentos, cosméticos, no controle de micro-organismos, agindo como bactericidas, fungicidas e virucidas, e no controle de nematóides, insetos e parasitos (ALTOÉ, 2012).

Existem relatos de que os egípcios já conheciam suas propriedades medicinais, à aproximadamente seis mil anos, mas somente a partir da Idade Média, com a descoberta das propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais passaram a ser extraídos e comercializados pelos Árabes, que teriam sido os primeiros a desenvolverem métodos como o arraste a vapor e a hidrodestilação, para obtenção destes compostos. Aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, desses 300 são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrônômica, de alimentos, sanitária, de cosméticos e perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

Com isso, os óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, bioativos, voláteis, com odor e cor característicos, estão presentes em todos os órgãos das plantas, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas e cascas. São formados principalmente por classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, terpenos, fenilpropanóides e álcoois aldeidados. De acordo com Simões et al. (2004), esses constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços).

Segundo Simões et al. (2007) os óleos essenciais são misturas de substâncias orgânicas voláteis, de consistência semelhante ao óleo, definida por um conjunto de propriedades, entre as quais se destacam volatilidade, aroma agradável e solubilidade em solventes orgânicos apolares, entre outras. Assim, diferem dos óleos fixos, que são misturas de triacilglicerídeos, obtidos geralmente de sementes. São, também, denominados de essências, óleos etéreos ou óleos voláteis. Quando

recentemente extraídos, são incolores ou ligeiramente amarelados, alguns podem apresentar coloração intensa, como o óleo de camomila, que é azul intenso, devido à presença dos derivados do azuleno.

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleurage, CO₂ supercrítico e microondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação, que se divide em duas técnicas, arraste com vapor de água e cooção, que é a destilação repetida, a fim de se obter maior concentração dos princípios ativos (SANTOS, 2004).

Na natureza, os óleos essenciais têm a função de proteger a planta contra ataques de predadores, como insetos e micro-organismos, além de atrair polinizadores para dispersão de pólenes e sementes. Seus constituintes conferem características de aroma, cor e funções antissépticas e são armazenados em células secretoras, epidérmicas, cavidades, canais ou tricomas glandulares presentes em todos os órgãos das plantas. Juntamente com os extratos, os óleos essenciais se enquadram como aromatizantes naturais permitidos para aplicação em alimentos, obtidos por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos (BAKALLI *et al.*, 2008).

3.6.1- Ação antimicrobiana dos óleos essenciais

De acordo com aumento da resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas e a susceptibilidade de atuarem sobre numerosos tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH e condições do meio ambiente, surge a busca por novas alternativas terapêuticas, o que incentiva a procura por antibióticos naturais (SARTO; JUNIOR, 2014).

A interação inicial entre os elementos dos óleos essenciais e a célula microbiana se dá por difusão passiva da molécula, componente da parede celular de bactérias Gram-positivas e fungos ou membrana externa de bactérias Gram-negativas (HAMMER; CARSON, 2011). Contudo, também pode ocorrer interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias Gram-negativas, conforme demonstrado recentemente por La Storia *et al.* (2001), em estudos utilizando o carvacrol contra diferentes espécies bacterianas.

Os óleos essenciais são compostos tipicamente lipófilos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento da permeabilidade por danificar a estrutura de

diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (BAKKALI et al., 2008). Sendo assim, o aumento da fluidez da membrana parece estar entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento com óleos essenciais. A expansão e também o aumento da fluidez da membrana citoplasmática podem causar a quebra da integridade com consequente perda de pequenos componentes intracelulares, como hidrogênio, potássio e sódio. A perda destes íons está associada ao decréscimo do potencial de membrana, pH intracelular e pool de ATP, causado pelo dano ao gradiente de íons que ocorre entre o interior e exterior da célula. Concentrações elevadas de óleos essenciais ou longos períodos de exposição podem ocasionar danos maiores à membrana citoplasmática, acarretando perda de macromoléculas, como DNA e proteínas, fator estritamente relacionado à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011).

De acordo com Ayala-Zavala et al., (2009) e Burt (2004), o mecanismo de ação dos óleos essenciais, pode incluir também, a destruição da parede celular e membrana citoplasmática, danificação de proteínas de membrana, liberação de conteúdo celular, coagulação do citoplasma, depleção da força próton motiva, inativação de enzimas essenciais e perturbação da funcionalidade do material genético.

Além dos recentes estudos da manipulação de óleos com ação antimicrobiana, têm-se avaliado diferentes misturas de óleos essenciais, a fim de comprovar os seus níveis de sinergismo ou antagonismo, visto que não se pode afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica, podendo haver a interação entre os diferentes componentes do óleo. Além disso, o estudo dessas misturas de óleos tem a finalidade de maximizar a atividade e minimizar as concentrações para não haver interferência diante das características sensoriais dos alimentos, bem como se podem constituir bases para a produção de conservantes de alimentos naturais (NGUEFACK et al., 2012).

Sendo assim, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais é uma característica importante destes compostos que já foi relatada *in vitro* inúmeras vezes (OUSSALAH et al., 2007; TRAJANO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Assim, devido ao chamado “consumismo verde”, caracterizado pelo apelo por parte dos consumidores para redução da utilização de conservantes químicos, e a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos visando sanar o problema de resistência às alternativas convencionais, estudos vêm sendo

realizados sobre o emprego de óleos essenciais no controle microbiano (SOLOMAKOS et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Emprego ainda mais recente, que também corrobora com a necessidade do desenvolvimento de antimicrobianos naturais, é a utilização de óleos essenciais no controle de biofilmes.

Com isso, vários autores enfatizam essa ação antimicrobiana, podendo destacar o óleo essencial do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides Cham.*) que levou a inibição completa dos micro-organismos *Salmonella tryphymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*. Isto pode ser atribuído ao alto teor de timol e carvacrol presentes no óleo essencial desta planta (BARA; VANETTI, 1998). O *Croton zehntneri* (“canela de cunhã”, “canelinha” ou “canela-brava”), possui constituintes químicos mono e sesquiterpenos e como componente majoritário o estragol, representando 76,8% do teor do óleo essencial. Quando avaliado sobre culturas de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus β -haemolyticus* o óleo essencial demonstrou potencial biológico contra bactérias patogênicas e toxicidade ativa, incentivando assim novas pesquisas com substâncias isoladas dessa espécie, na busca de alternativas terapêuticas que possam servir de subsídio para novas fontes racionais a partir de produtos naturais (COSTA et al. 2008).

3.6.2- *Thymus vulgaris* L. (Tomilho)

T. vulgaris L., conhecido popularmente no Brasil por tomilho (*thyme*, em inglês), trata-se de uma planta aromática perene originária da região Mediterrânea, pertencente também à família Lamiaceae (ISMAILI et al., 2004). O tomilho vem sendo utilizado pela população mundial como planta aromática, na culinária, como conservante de alimentos, além de seu lado medicinal também ser explorado (JAMALI et al., 2012).

Thymus spp apresentam uma gama de biocompostos responsáveis por inúmeras atividades farmacológicas. Foi verificado que o óleo essencial de diferentes espécies de tomilho pode apresentar como maiores constituintes os terpenos timol, carvacrol, *p*-cimeno, γ -terpineno, cariofileno, linalol e borneol (JAMALI et al., 2012).

Seus benefícios foram descrito na literatura, com apresentação de atividades antibacteriana (AL LAHAM, AL FADEL, 2014; de LAS MERCEDES et al., 2015), antiviral (SÁNCHEZ, AZNAR, 2015), antifúngica (MAISSA, WALID, 2015;

KOHIYAMA et al., 2015; KHALEDI et al., 2015), anti-inflamatória (AAZZA et al., 2014), anticâncer (AL-MENHALI et al., 2015), anti-hipertensiva (ALAMGEER et al., 2014), antioxidante (AAZZA et al., 2014), antitumoral (AAZZA et al., 2014), pró-apoptótica em célula tumoral (ESMAEILI et al., 2014), anti-proliferativa (ESMAEILI et al., 2014), anti-nematódeo (GIARRATANA et al., 2014).

3.6.3- Timol

Metabólitos secundários são compostos bioativos extremamente comuns nas plantas, como exemplo, temos os compostos fenólicos. Os fenóis são substâncias que podem ser voláteis ou não. Dentre os compostos não voláteis temos os flavonóides, os ácidos fenóis e os taninos. E em relação aos compostos voláteis, podemos citar o timol. O timol (5-metil-2-isopropilfenol), representado na **(Figura 3)**, é o principal monoterpreno encontrado nos óleos essenciais de espécies, como *Thymbra spicata*, *Thymus vulgaris*, *Thymus ciliates*, *Monarda fistulosa* (Lamiaceae), *Lippia sidoides* (Verbenaceae), *Nigella sativa* (Ranunculaceae) e *Trachyspermum ammi* (Apiaceae) (MARCHESE et al., 2016; JAFARI et al., 2017). Esse composto apresenta-se na forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos e odor aromático, característico do tomilho. Seu ponto de fusão é 52°C e ebulição 233°C (ZHU et al., 2015).

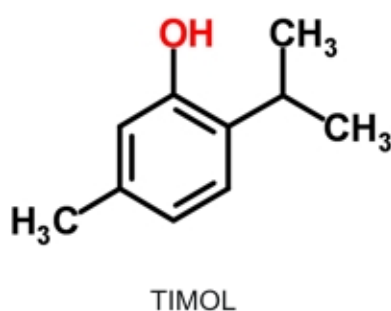


Figura 3: Fórmula química do timol.

Fonte: <https://www.oleos essenciais.org/timol/>

Esse composto apresenta importante atividade antimicrobiana, no entanto seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido. Mas acredita-se de uma forma geral que o timol cause danos estruturais e funcionais na membrana citoplasmática (SIKKEMA et al, 1995) e liberação de LPS (SHAPIRA, MIMRAN, 2007). Além de

interação com proteínas de membrana e alvos intracelulares. Podendo afetar processos de geração de energia reduzindo a capacidade de recuperação das células (DI PASQUA, 2010).

A anfipaticidade dos compostos fenólicos pode explicar as suas interações com biomembranas e, portanto, a atividade antimicrobiana. A parte hidrofílica da molécula interage com a parte polar da membrana, enquanto que o anel de benzeno hidrofóbico e as cadeias laterais alifáticas estão inseridos na parte hidrofóbica da membrana bacteriana. O envolvimento do grupo hidroxila na formação de pontes de hidrogênio e a acidez deste composto fenólico podem justificar sua atividade antimicrobiana (BRAGA et al, 2011).

Este fenol possui múltiplas atividades biológicas, algumas delas são a antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-mutagênica, analgésica, anticonvulsivante, antiepiléptica, anti-hemolítica, radioprotetora, hipocolesterolêmica, imunossupressora, cicatrizante e antioxidante (JAFARI et al., 2017; BELATO, 2018).

Uma das principais atividades do timol, presente em óleos essenciais de diversas plantas, é a sua atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. O seu mecanismo compreende na ruptura da membrana citoplasmática dos micro-organismos, aumentando a permeabilidade celular, causando extravasamento do material celular e a desregulação da sua função (MICHALSKA-SIONKOWSKA et al., 2017; LI et al., 2017). Segundo Chauhan e Kang, 2014, a ruptura da integridade da membrana foi confirmada como o principal mecanismo de ação do timol contra *Salmonella enterica sp.*

É considerado um antimicrobiano de amplo espectro, atuando sobre espécies de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus plantarum*, *Candida spp*, vírus e protozoários. Outro efeito relatado é a inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e a prevenção contra cáries dentárias (BELATO et al., 2018).

As propriedades antimicrobianas e os mecanismos de ação do timol, que se dá devido ao seu grupo hidroxil, demonstraram ser eficientes contra uma ampla gama de bactérias (OUSSALAH et al.2007), inibindo o crescimento de diversas espécies, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica sp.*, *Listeria monocytogenes* e *Shigella sonnei* (TROMBETTA et al.2005; OUSSALAH et al.2007; KHAN et al.2017). Oussalah, et al., 2007 relataram que concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) podem reduzir a taxa de crescimento das espécies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*.

Outros fatores que determinam a eficácia antibacteriana do timol e outros fenóis incluem a carga líquida da superfície da membrana, bem como sua composição lipídica e a presença e concentração de LPS (TROMBETTA et al.2005). Além da alteração na membrana celular da bactéria, outros mecanismos de ação do timol foram descritos, como a inibição da formação de biofilme bacteriano; da motilidade, através de seu efeito no flagelo do micro-organismo; e da bomba de efluxo. Os autores constataram também, os efeitos sinérgicos do timol com antibióticos convencionais, podendo fornecer métodos alternativos para superar o problema de resistência a bactérias. (MILADI, ZMANTAR et al.2017).

3.6.4- Eugenol

O Eugenol (**Figura 4**), (4-alil-2-metoxifenol), é um hidroxifenilpropeno, principal composto identificado no óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo) e também está presente em *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Ocimum gratissimum* L. (manjerição), *Pimenta dioica* (pimenta jamaicana), e em outras plantas e condimentos (KONG et al., 2014).

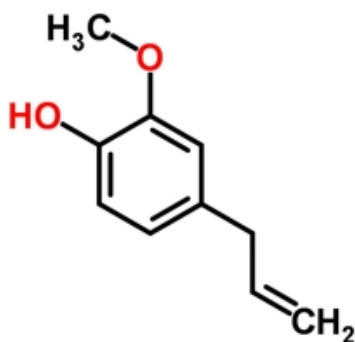


Figura 4: Fórmula química do eugenol.

Fonte: <https://www.oleosessenciais.org/eugenol/>

Tanto a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) têm permitido uma dose diária aceitável de eugenol de 2,5 mg/kg de peso corporal para os seres humanos. Além disso, a *Food and Drug Administration* (FDA) reportou o eugenol como substância segura e considerada não carcinogênica e não mutagênica (KONG et al., 2014).

O eugenol foi isolado pela primeira vez em 1929 e sua produção comercial teve início nos Estados Unidos em 1940. Pode ser produzido sinteticamente, no

entanto é predominantemente extraído a partir de óleos essenciais de várias espécies vegetais. Essa substância é classificada como um fenilpropanóide do tipo alilfenol e possui aspecto de um óleo amarelo claro com um odor característico de cravo e um sabor picante. É uma substância com inúmeras aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (KAUFMAN, 2015).

Ele encontra amplas aplicações que vão desde perfumarias, aromatizantes e em medicamentos. O eugenol é usado em combinação com óxido de zinco como curativo cirúrgico, agente de capsulagem, revestimento de cavidade, cimento temporário em lavagens bucais e terapia endodôntica, no estudo de secreções mucosas e em citologia gástrica (BANSODE, 2017). Na indústria ele é empregado para acentuar o paladar de doces de bebidas, sendo ainda empregado na manufatura de cosméticos (LEAL-CARDOSO, 1994).

A atividade antimicrobiana do eugenol pode ser atribuída à presença de um grupo hidroxila livre na molécula (NAZZARO et al., 2013) que apresenta ação nas células bacterianas através de diversos mecanismos. Um deles é a perturbação da membrana citoplasmática que aumenta a permeabilidade inespecífica da membrana e afeta o transporte de íons e ATP (DEVI et al., 2010).

Em 2015, Biasi-Garbin, et al. estudaram as alterações morfológicas e estruturais em células de *Streptococcus agalactiae* e observaram que após 5 horas de incubação com uma concentração inibitória de eugenol, as células apresentaram várias alterações na morfologia celular e rompimento da parede. Devi, et al., 2010 avaliaram a atividade antibacteriana do eugenol e seu mecanismo de ação contra *Salmonella typhi*. Esses autores mostraram que este composto apresenta ação na membrana celular bacteriana, alterando sua permeabilidade e ocasionando o vazamento de íons e perda de outros conteúdos celulares.

Estudos evidenciaram o mecanismo de ação do eugenol contra vários isolados de *S. aureus*, incluindo cepas resistente à vancomicina, e demonstraram que o eugenol foi capaz de desencadear a citotoxicidade celular devido à produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) que induzem a inibição do crescimento celular, rompimento da membrana celular e danos ao DNA, resultando em decomposição celular e morte bacteriana. (HYLDGAARD et al., 2012). Vários relatos na literatura mostram a atividade antimicrobiana do eugenol frente à diversas bactérias como *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

3.6.5- *Cymbopogon martinii* (Palmarosa)

Os óleos essenciais extraídos das ervas aromáticas como o *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Cymbopogon winterianus* e *Cymbopogon citratus* tem um enorme valor comercial para aplicações tanto ambientais como agrícolas, alimentares e médicas, além de perfumaria e aromaterapia (SINHA et al,2014)

Óleo essencial de importância comercial, o óleo de palmarosa tem ação antibacteriana e antifúngica atribuída principalmente ao seu componente majoritário, o geraniol. Este óleo é altamente valorizado na indústria de perfumaria como fonte de geraniol de alta qualidade (PRASHAR et al.,2003). Ele também é muito valorizado pelas indústrias de cosméticos por seu odor doce de rosas (THAKKER et al.,2016)

A Palmarosa é uma planta alta, áspera, perene e aromática, da família dos capins (Poaceae) (SMITH E RANA, 2015). O odor de seu óleo essencial traz um cheiro suave de rosa floral com nota herbal. É extraído de folhas e floração da planta. Seu composto majoritário é responsável por todas suas características antimicrobianas e organolépticas é o geraniol (70-80%). Abaixo do geraniol, o segundo composto mais abundante é o acetato de geraniol. Em menores quantidades o óleo é constituído também pelo linalol, (E)- β -ocimeno e β -cariofileno (MALLAVARAPU et al., 1998). O óleo essencial da Palmarosa é geralmente utilizado como matéria-prima de perfumaria em sabões e perfumes de odor de rosa (BURDOCK, 2010) e preparação de produtos cosméticos e de higiene (DUBEY et al., 2000). Além disso, também é usado para aromatizar produtos de tabaco, alimentos e bebidas não alcoólicas (RAO et al., 1985).

Na medicina popular é usado para os tratamentos de lombalgia, articulações rígidas, doenças de pele e para irritações cutâneas. Além de seu uso cosmético, é um anti-helmíntico eficaz (KUMARAN et al., 2003) e repelente de insetos à base de plantas (KUMAR et al., 2007; BARNARD e XUE, 2004). O óleo comprovou sua eficácia contra as larvas do *Aedes aegypti*, vetor responsável pela dengue (TENNYSON et al., 2013). Além disso, o óleo essencial extraído do *Cymbopogon martinii* é tradicionalmente utilizado para o tratamento de epilepsia em crianças e em casos de febre na Índia (BHATT et al.,2012).

Frente às inúmeras propriedades promissoras, a Palmarosa pode se inserir dentro das novas tendências de mercado, incluindo o de cosmético e alimentício,

que buscam minimizar a concentração de aditivos sintéticos ou substituí-los por substâncias naturais e na indústria farmacêutica com o objetivo de ajudar a resolver questões de resistência bacteriana. (ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2014).

3.6.6- Geraniol

O geraniol (**figura 5**), representado por (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol), é um monoterpeno de aspecto oleoso e translúcido podendo apresentar coloração pálida amarelada, possui aroma semelhante ao de rosas e é um grande componente de óleos vegetais, sendo encontrado em espécies como *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon winterianus* e *Rosa damascena*, entre outras (DEVAKI, 2015).

Muito apreciado no mercado de fragrâncias, o geraniol está presente em 76% dos desodorantes e perfumes no mercado europeu e em 33% de formulações cosméticas (LAPCZYNSKI et al., 2008). Além disso, possui importantes propriedades farmacológicas e bioquímicas como ação anti-inflamatória, anti depressiva e até mesmo antitumoral através da supressão de angiogênese, já foi demonstrado no geraniol a eficácia como repelente de insetos e sua atividade antimicrobiana tem sido destacada em diversos estudos (WITTIG et al., 2015; DENG et al., 2015; JAYACHANDRAN et al., 2015).

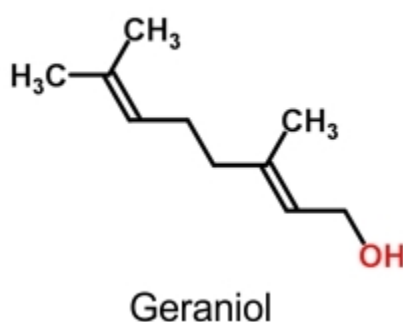


Figura 5: Fórmula química do geraniol.

Fonte: <https://www.oleos essenciais.org/geraniol/>

Já foi relatada atividade antifúngica do geraniol contra cepas de *Trycophyton*, cuja investigação do mecanismo de ação propunha ligação ao ergosterol e subsequente desestabilização da membrana celular provocando a morte do micro-organismo (PEREIRA et al., 2015). Esses dados corroboraram com resultados encontrados anteriormente, quando foram observadas menor espessura da membrana celular, descontinuidades em sua superfície, assim como sua destruição

em maiores concentrações, além da ocorrência de anormalidades na estrutura mitocondrial fúngica (MIRON et al., 2014).

Capítulo 1

4.1- Artigo Publicado

Current Research in Complementary & Alternative Medicine (FI 1.50)

Volume 06

Número 162

DOI 10.29011/2577-2201.100062

A systematic review of essential oils' antimicrobial and antibiofilm activity against *Klebsiella pneumoniae*

Cristiane Telles Baptista^a, Milena Mattes Cerveira^a, Victor Barboza dos Santos^a, Edila Maria Kickhofel Ferrer^a, Roger Giusti Miller^a, Thobias Toniolo de Souza^a, Patrícia Daiane Zank^a, Andressa de Oliveira Blanke^a, Vitor Pereira Klein^a, Rafaely Piccioni Rosado^a, Rowena Moreira Silveira^a, Luíze Garcia de Melo^a, Claudio Martin Pereira de Pereira^b, Leonardo Quintana Lopes^c, Janice Luehring Giongo^{a*}, Rodrigo de Almeida Vaucher^{a*}

^a Laboratory of Biochemistry Research and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBiOM), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

^b Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

^c Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author.

Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Email addresses: rodvaucher@hotmail.com (R A Vaucher)

janicegiongo@hotmail.com (J L Giongo)

Abstract

Biofilms are sessile microbial life forms recognized for their surface adherence and the formation of extracellular polymeric substances consisting of a gluey network that surrounds the cells. Biofilms can be produced by bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*. Several studies investigate strategies, including the use of essential oils to detain, reduce or even eliminate their formation, especially in hospital medical supplies. The present study performed a systematic review among different databases about the use of essential oils in the control of *K. pneumoniae* biofilm formation. Because of this bacteria's proclivity for acquiring resistance, the selected research shows that this is a good model. The search for alternative techniques to manage these diseases is extremely important because a large proportion of bacteria do not react to traditional therapies, making control impossible. The current study focuses on high-impact published studies and show that essential oils are efficient against *K. pneumoniae*, mainly because of their resistant nature. Because certain bacterial strains do not respond to standard therapies, the hunt for new approaches

to control this infection is critical. After an extensive search in the literature, a high number of studies related to this topic were found, from which we selected 120 among all.

Keywords: Biofilms, essential oils, hospital medical supplies, *Klebsiella pneumoniae*.

1. Introduction

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative bacteria, considered an opportunistic pathogen because it can grow in a wide range of hosts and environments. Over in the past years, there has been an increase in infections caused by resistant *K. pneumoniae* strains, leading to serious consequences, especially in hospital areas, such as longer hospitalization time, the absence of therapeutic options, and also an increase in morbidity and mortality numbers (1). Normally, the infections caused by *K. pneumoniae* are asymptomatic and can reach the gastrointestinal tract, the skin, the nose, and the throat of healthy individuals (2). The transmission occurs mainly through hand contact. Nevertheless, when there is a homeostatic imbalance, this microorganism can cause a variety of infections depending on the site, generating urinary and respiratory infections but also more severe complications in the blood as well as hepatic abscess, meningitis, and sepsis (3). The infection can be transmitted mostly through direct or indirect contact between patients, health professionals, contaminated objects, visitors, or travelers (4). In hospitals, for example, the high number of people circulating in an enclosed area leads to possible bacterial resistance. In addition, the absence of hand sanitization from professionals and visitors contributes to the dissemination of these resistant strains in different places, such as public transport, supermarkets, beaches, and parks (5). In this sense, there are several factors involved in the dissemination of *K. pneumoniae* in a hospital environment. Considering that this bacteria is an opportunistic microorganism, and it possesses a great ability to produce biofilms, and it has been the subject of extensive studies in the development of nosocomial infections (6). Among these, catheters use, time of stay in these environments, long hospitalization time in the Intensive Care Unit (ICU), prolonged antimicrobial therapy, reutilized instruments in surgeries and implants, and/or devices can all provide open access to *K. pneumoniae* infections (7, 8). Susceptible individuals such as diabetics, transplanted patients, and people with

compromised hepatic function and dialysis patients are among the group at risk considering their immunodeficiency, which results in a defect in the immune system that can no longer work properly against the infection. This immunodeficiency is a side effect of the therapies as a consequence of their treatment, considering that in these conditions, the immune system does not work properly (4, 9). Biofilms are classified as a microbial community that sits in a thin layer of either biotic or abiotic surfaces, established through the extracellular polymeric substances that originate from the biofilm itself. *K. pneumoniae* biofilm formation has been linked to an important pathogenic feature of this bacteria, particularly in the use of medical catheters. Biofilm matrix provides the necessary conditions to mitigate drug delivery regarding its dense polysaccharide and protein layer in which the antibiotic can't diffuse properly, resulting in significant exposure to bacteria and, therefore, the establishment of chronic infections in the urinary tract (4, 10, 11). Alternative methods are being studied to minimize the consequences caused by biofilm formation. Among these methods is the research on the activity of antibiofilm formation of essential oils (EOs) derived from plants. EOs are a viable therapy option for contaminated patients who have been infected with resistant strains. There has been a tremendous surge in research on aromatic and medicinal plants in recent years (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). However, to obtain an adequate and commercial formula, there are a few factors to consider, such as geographical morphology, climate, and cultural conditions (13). The primary purpose of this study is to conduct a systematic review of the usage of essential oils in the administration of *K. pneumoniae* biofilms using scientific databases.

2. Materials and methods

The current study was undertaken using a bibliographic search of PUBMED, MEDLINE, Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Academic Google, and other relevant websites, from 2012 to 2022. "Biofilm," "*K. pneumoniae* and biofilm," "biofilm and medical catheters," "biofilm and essential oils," and "*K. pneumoniae* and essential oils" were the top search terms because they addressed the study's major goal. The initial search was undertaken by reading the titles and abstracts and only full and published papers were chosen to participate in this review follows the careful reading.

3. Results and discussion

The keyword "biofilm" was the most comprehensive among all others regarding the present study in our search. From the period selected, there were 100,951 published papers, whilst for the term "*Klebsiella pneumoniae* and biofilm," 10,979 studies were found. 7,387 publications were found for the term biofilm and medical catheters, and for the term "biofilm and essential oils," there were 42 studies. As for the term "*Klebsiella pneumonia* and essential oils," only 20 publications were found. These results are presented in **Table 1** and suggest that the majority of the studies are not focusing on the main goal of this review.

Table 1: Number of published papers in the last 10 years according to the search term.

Search term	Number of published papers between 2012 and 2022
Biofilm	100,951
<i>K. pneumoniae</i> and biofilm	10,979
biofilm and medical catheters	7,387
biofilm and essential oils	42
<i>K. pneumoniae</i> and essential oils	20

This review included the main studies discovered through the selected databases. The relevance of biofilm formation was stated in the work of (23), in which the author observed a significant increase in the number of publications since 1983. These data showed that biofilms had been a relevant subject over the years for the scientific community and the need for further studies to identify the causes and possible solutions for this matter.

3.1 Use of essential oils in *K. pneumoniae* strains

Total number of studies found correlating the use of EOs in *K. pneumonia* strains was 20. As of today, *K. pneumonia* is the most nosocomial pathogen that carries the carbapenemase gene (KPC) that gives resistance to carbapenem, a

classic beta-lactam antibiotic that is used for the treatment of bacterial infections. As a result, the search for novel antimicrobials is necessary. Natural products, such as EOs, are a promising source due to their complex composition. These products are demonstrated to be effective against resistant strains, as shown in **Figure 1**, but the mechanisms underlying their actions are not fully understood.

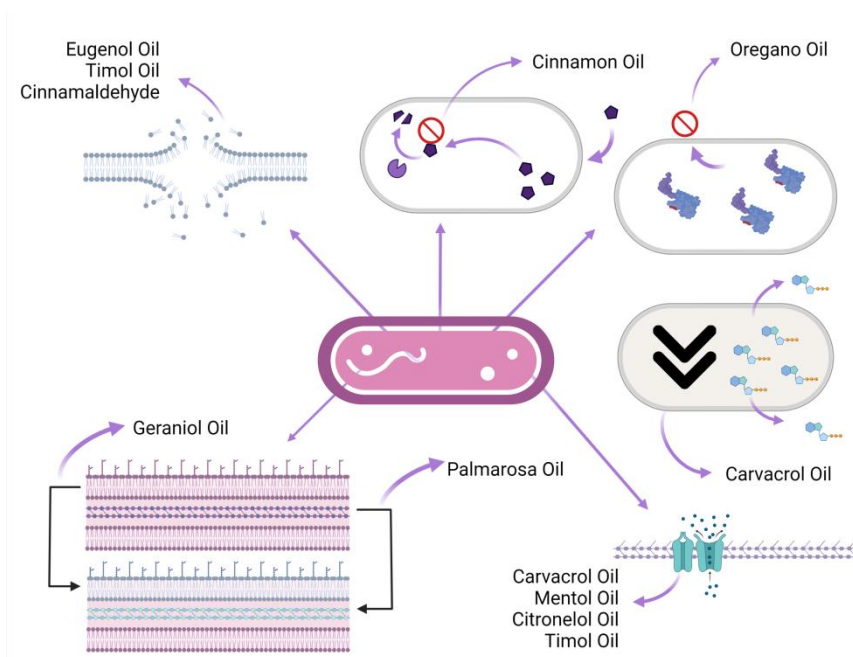


Figure 1: EO action sites and mechanisms in a bacterial cell.

Eugenol promotes disruption of the cytoplasmic membrane, increasing its nonspecific permeability, causing ion leakage and excessive loss of other cellular components, including intracellular proteins, leading to cell death. Geraniol, linalool act on the wall, changing permeability and modifying membrane proteins and periplasmic enzymes, as well as altering the membrane, ion transport, and energy production. Palmarosa oil penetrates the lipophilic part of the cell membrane generating na imbalance in the membrane potential and losing its selective permeability. The compounds methyl carvacrol, menthol, citronellol, and thymol also cause a widening of the cell membrane that leads to the passive diffusion of ions between the phospholipids. They also act on the cell wall of bacterial cells, causing rupture and extravasation of the extracellular contents. Carvacrol induces leakage and loss of ATP from bacterial cells. Cinnamaldehyde inhibits ATPase enzymes and disrupts the outer cell membrane (78, 79, 80).

A better understanding of the molecular mechanisms of EOs when used as an antibacterial agent against KPC-*K. pneumoniae* could lead to improved clinical efficacy. According to (16), the proteomic perspective was investigated toward KPC-*K. pneumoniae* cells when comparing the untreated cells with cells treated with cinnamon essential oil (*Cinnamomum verum* J. Presl) (CBO). The authors reported that cells exposed to CBO express a higher level of oxidative stress that eventually tears the bacterial membrane, possibly by interacting with the lipid bilayer.

Interestingly, different repair membrane pathways were affected by oxidative stress and hence contributed to cell viability loss. (19) investigated the antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. (CCeo) isolated and in combination with polymyxin B (a commercial antibiotic) against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. The association between CCeo and polymyxin B showed a reduced number of viable cells in a 4-hour treatment. When associated with polymyxin B, a synergistic effect was displayed, and the bacterial growth was rapidly inhibited, demonstrating that the CCeo is a promising candidate in the development of an alternative method for carbapenem-producing strains. *Cinnamomum verum* essential oil has been used as an alternative treatment for different diseases. (24) showed the antibacterial and antibiofilm properties of essential oil leaves from *Cinnamomum verum* against, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. All tested strains displayed sensitivity towards cinnamon oil steamer. Cinnamaldehyde are one of the major compounds in cinnamon EO, and its concentration ranges between 60 and 80% when obtained from the bark of the *Cinnamomum* genus (25). Different studies demonstrate the antimicrobial activity of cinnamaldehyde against different bacteria, including *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *V. parahemolyticus* and *Salmonella* spp. (25).

(26) tested the cinnamaldehyde and eugenol antibacterial activity against Enterobacteriaceae ESBL quinolone-resistant (QR) strains along with their *in vivo* toxicity in a murine pharmacological model. In this study, the authors observed the high efficiency of cinnamaldehyde and eugenol as promising antibacterials with no considerable toxicological and behavioral effects. (27) add that wound infection is a great site for pathogenic microorganisms. Cinnamon and clove oil are effective antibacterial agents due to their ability to reduce virulence and pathogenicity in a wound healing *in vivo* model against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*.

The ethanolic extract (CEE, 0,01-1 mg/plate), essential oil (CNO, 0.125-1 mg/plate) from cinnamon bark, and cinnamaldehyde (CLD, 0,125-1 mg/plate) were eficiente against different pathogens, such as *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, and *S. typhimurium* (*S. typhimurium*) in an agar diffusion protocol. CEE and CLD showed promising antimutagenic and antimicrobial properties, respectively. Therefore, their properties should be explored in depth in an *in vivo* condition.

Aromatic herbs such as oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) is used for ornamental, culinary, and phytotherapy purposes all over the world. The antibacterial activity of these plants has attracted the scientific community's interest as a potential alternative to conventional antibiotics in addressing microorganism resistance. There has been a tremendous increase in the growth of several aromatic and therapeutic plants in recent years. (13) showed that *K. pneumonia* displayed a higher sensitivity towards thyme oil, followed by oregano, whilst sage oil did not present any antibacterial activity.

(28) tested the hybrid *Lavandula* essential oil against *K. pneumonia* strains, in which the authors observed a moderate antibacterial activity along with a bacteriostatic property. These results were in agreement with (15), which confirmed the strong antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*), arbovitae (*Thuja plicata*), Cassia (*Cinnamomum cassia*), lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) against *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *C. koseri* and *K. pneumoniae*. The enzyme extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) is synthesized by the Enterobacteriaceae family, which includes *K. pneumonia* and *E. coli*. Penicillin, cephalosporin, cephamycin, and carbapenem are among the beta-lactam antibiotics that the ESBL can hydrolyze. The bacteria that produce ESBLs spread predominantly from ranches to slaughterhouses and human meals derived from animals.

(21) discovered that *Syzygium aromaticum* (clove) and *Cinnamomum verum* (cinnamon) have effective antibacterial action against resistant *K. pneumonia* and *E. coli* ESBL-strains. (18) analyzed the antibacterial effects of four different EOs, *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita*, and *Thymus vulgaris* as an alternate method to prevent the progress and dissemination of *K. pneumonia* and *E. coli* ESBL-strains, Metallo beta-lactamase (MBL)-producing *P. aeruginosa* and KPC-producing *K. pneumoniae*. *M. alternifolia* and *T. vulgaris* EOs presented the

most effective antibacterial activity in all tested strains, with *M. alternifolia* as the best candidate even at low concentrations.

The antibacterial activity of oregano (*Origanum syriacum* L.), thyme (*Thymus syriacus* Boiss.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L), and clove (*Syzygium aromaticum*) EOs were the most effective among 28 different EOs in a study performed by (29) against four different Gram negative strains, *K. pneumoniae*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* O9 (*Y. enterocolitica* O9) and *Proteus* spp.

The authors compared their efficiency with that of cephalosporin and ciprofloxacin, two well-established antibiotics that were effective. The discussed studies demonstrate promising antibacterial activity against *K. pneumoniae*, especially for its resistance to conventional treatments. As a result, it is necessary to discover new alternative methods to control the spread of antimicrobial-resistant strains.

3.2 Elements of biofilm formation in a hospital environment

One of the causes for researching bacterial biofilm formation in medical devices, as evidenced by the papers chosen for this study, is that they are responsible for a high infection rate, accounting for roughly 80% of human illnesses.

Bacterial resistance has been a major factor in the high rate of hospital infections worldwide (30, 31). There has been an increase in the mortality rate, demonstrating the seriousness of biofilm formation and the need for a clean hospital environment, contributing to the reduction of health costs and also patient quality of life.

This the investigation is essential considering that the microorganism's ability to develop a biofilm is directly proportional to its aptitude to cause an infection. Research conducted by (30) showed the risk of infection in catheters in hemodialysis patients in Brazil. Several other studies also demonstrated a high number of infections in patients with catheters and prosthetic devices (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37).

Biofilm formation is a prokaryotic adaptation used by several microorganisms, called resistant microorganisms, that have developed a growth strategy to overcome antibiotics and vaccines. These evolutionary steps allow the survival of organisms in hostile environments and the colonization of new sites through dispersion mechanisms (23). As a result, these microorganisms acquire strong intercellular

communication and can rapidly respond to subtle changes in their surroundings through a signaling mechanism called *quorum sensing* (38).

Among the several microorganisms that can produce biofilm are *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *C. albicans*. *K. pneumoniae* is a gram-negative bacteria and an important opportunistic pathogen that can cause several health problems, including tract infections, bacteremia, pneumonia, and hepatic abscesses. There is an alarming situation regarding multi-resistant (MDR) and hypervirulent (hvKP) *K. pneumoniae* strains, whose mechanisms are not yet fully understood. Therefore, it is necessary to elucidate the pathogenic and resistance pathways of this microorganism (39).

(23) discussed that microorganism resistance is related to poor penetration from antimicrobial agents to the polysaccharide membrane in which the bacteria develop the biofilm. Assays that can evaluate both the action and properties of antimicrobials against biofilms are of great value the minimizing infection rates. Several other factors can influence biofilm formation, such as altered bacterial growth and gene expression (41, 42, 43).

The well-ordained tridimensional biofilm structure is a result of different molecular associations compared to Other non-sessile microorganisms. Among the molecules expressed on the biofilm surface that allow substrate adhesion and, consequently, an elaborated structure are fibrinogen-binding proteins, fibronectin, capsular polysaccharide-adhesion factors, autolysin, and teichoic acid. This explains the antibiotic selectivity towards bacterial strains and the lack of capacity to eliminate biofilm formation from resistant microorganisms. In addition, virulence factors and nutrient optimization contribute to higher antibiotic resistance. (41).

During biofilm formation, the microorganisms can be found in a progressive accumulation phase of virulence factors, increasing the risk of infection in patients. As a result, research on biofilm formation in a medical environment must be kept up to date for academic and scientific communities. (38, 40).

3.3 Biofilm formation in hospital catheters

Biofilm formation in hospital catheters is a serious worldwide health problem because it is responsible for triggering several infectious diseases (44). **Figure 2** shows different catheters and probes used in hospitals daily.



Figura 2: Catheters and probes that are used daily in hospitals.

Contamination of urinary catheters, for example, can result in urinary infections (44). Likewise, a central venous catheter can also present an infection. This demonstrates the subject's relevance to ensuring a high-quality service from hospitals and providing a better quality of life for patients (44, 45, 46).

(47) highlights that catheter-associated urinary infections are common in patients with long urinary catheterization periods. The factors related to biofilm formation are crucial for choosing the best intervention strategy to minimize the risk of infection. Furthermore, contamination of a central venous catheter is very concerning because microorganisms can circulate throughout the entire organism, exacerbating an already severe infection (44, 45, 46).

Central venous catheters are widely used in hospitals because they provide convenient access to a patient's vascular system. As a result, it allows for the administration of drugs and other vital components, particularly in hospital circumstances (48).

On the contrary, urinary infections are responsible for high morbidity and mortality rates (40). One of the main causes of infections in hemodialysis patients is material manipulation by health professionals (30, 49). The use of urinary catheters is essential in patients where access to the arteriovenous fistulae is not possible and, or access to the blood needs to be fast (49).

The use of urinary catheters is associated with a high infection rate as a result of biofilm formation (**Figure 3**), restricting the benefits that they could provide for patients (49, 50). On catheter surfaces, the most reported microorganisms are *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *C. albicans* (49, 51).

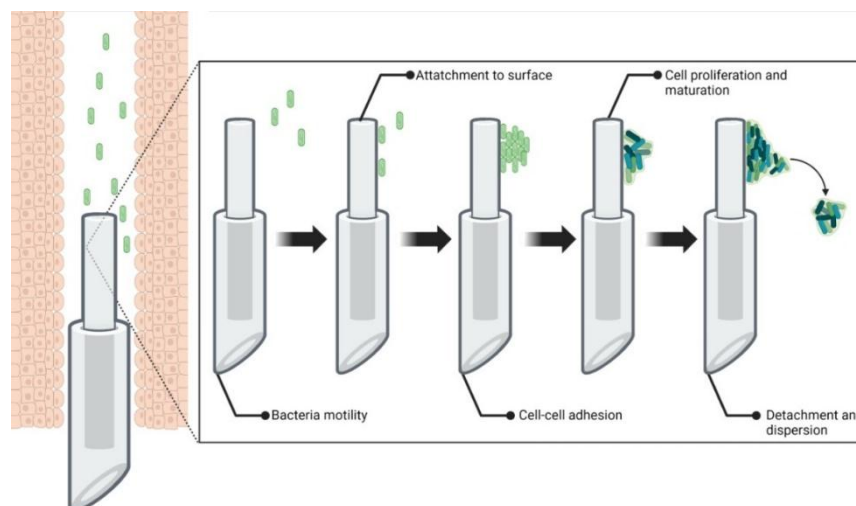


Figure 3: Biofilm formation in hospital medical equipment.

3.4 Use of essential oils in biofilms

Bacterial biofilms are associated with high resistance against several antimicrobial agents, contributing to persistent microbial infection and, consequently, therapy failure. (12) tested the efficiency of vanilla (*Vanilla planifolia*), patchouli (*Pogostemon cablin* syn. *P. patchouli*, *P. heineanus*), and ylang-ylang (*Cananga odorata* subsp. *Genuine*) EOs stabilized by Iron Oxide-C14 nanostructures against *K. pneumonia* and *S. aureus* biofilms.

The vanilla nanoparticles created a thin coating layer on the catheter's surface that strongly inhibited both the initial 24h-adherence from *S. aureus* and the 48h-development. Patchouli and ylang-ylang EOs nanoparticles primarily inhibited the initial adhesion. All nanostructures showed similar efficiency toward *K. pneumoniae* biofilm, presenting a new antibiofilm and anti-adherent coating-surface design.

(14) studied the effects of *Thymus vulgaris* against the planktonic form of six clinical isolates of pathogenic bacteria and their biofilm structures, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *K. pneumoniae*. According to MIC and MBC concentration results, *Thymus vulgaris* extracts were efficient at inhibiting bacteria in their planktonic form. In addition, antibiofilm formation behavior displayed a concentration-dependent behavior.

Thymol and piperine are two bioactive compounds with several pharmacological activities, such as. (22), evaluated their antibiofilm capacity, isolated or in combination with three aminoglycoside antibiotics (streptomycin, amikacin, and

kanamycin) against *K. pneumonia* biofilm. The results showed that thymol, in combination with antibiotics had a synergistic effect in both biofilm formation and biofilm destruction, implying a possible alternative therapy for *K. pneumonia* biofilm-related infections.

Recently, (20) performed a comparative study between the antimicrobial activity of liquid and volatile fractions from five EOs, *Syzygium aromaticum* L., *Boswellia serrate* Roxb., *Juniperus virginiana* L., *Pelargonium graveolens* L., and *Melaleuca alternifolia* Cheel., against six planktonic and biofilms from *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *C. albicans*. The results contribute to EOs benefits, demonstrating the ability to fight biofilm-forming pathogens.

A preliminary study demonstrated eugenol's antibacterial activity against *K. pneumoniae*. However, its mechanism of action remains unexplored, (52) investigated the antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *K. pneumonia* strains. Eugenol was able to inhibit biofilm formation and inactivate the carbapenem-resistant *K. pneumonia* (CRKP) cells. Moreover, eugenol displayed strong inhibitory effects on biofilm formation and gene expression associated with it. These findings suggest that eugenol possesses a strong antimicrobial effect and can potentially be used to control CRPK-related infections.

Cinnamomum verum EO has been used as a therapeutic alternative for several diseases, (53) studied the antibacterial and antibiofilm properties of this EO against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. The results were promising, considering the *Cinnamomum verum* EO did not display cytotoxicity in HaCat cells for any tested concentrations. Furthermore, according to phytochemical analysis, eugenol was the most abundant component in the EO.

(54) performed a study to evaluate the antibacterial and antibiofilm activities of selected constituents from EOs against NDM-1-producing uropathogenic *K. pneumonia* strains. The results provide a more detailed analysis of the phytochemicals in their application against *K. pneumoniae*.

Pimpinella anisum L., *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, and *Cuminum cyminum* L. EOs have antibacterial action against planktonic and biofilms of *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *P. mirabilis*, and *C. albicans*. Cinnamon and clove displayed the best results among all tested EOs. When analyzing biofilms,

Cinnamomum zeylanicum appears to be the best EO to inflict a disturbance on gram-negative bacteria biofilms (55).

These studies demonstrate the efficacy of EOs toward microbial biofilms and resistant bacteria. Besides, it is important to mention that all selected publications showed promising results and can be important tools as alternative methods to control these microorganisms.

3.5 *K. pneumoniae* gene influence in biofilm formation

(56) demonstrates that bacterial fixation in catheters is initiated by adhesins, such as fimbriae, presented on the bacterial surface. *K. pneumoniae* produces mainly two types of fimbriae: type 1 and type 3 (57).

These two fimbriae are mechanically different because of their functions (58). These fimbriae are made up mostly of protein primary structure monomers, with an average molecular weight of 20 kDa and adhesin subunits.

The main monomeric structures in type 1 and type 3 fimbriae are FimA and mrkA, respectively. The main adhesin subunits, fimH or mrkD, can be coded by chromosomal and plasmidial genes (58, 59). Type 1 fimbriae are mannose-specific and are expressed in several enterobacteria, whereas type 3 fimbriae are specific for collagen IV and V (6, 60).

Type 1 fimbriae promotes adhesion and bacterial invasion along with biofilm formation, which is characteristic of bacterial virulence (61). As seen in **Figure 4**, both type 1 and type 3 fimbriae are expressed during biofilm formation. However, according to some authors, type 3 fimbriae contribute to biofilm formation (62), but type 1 doesn't (63).

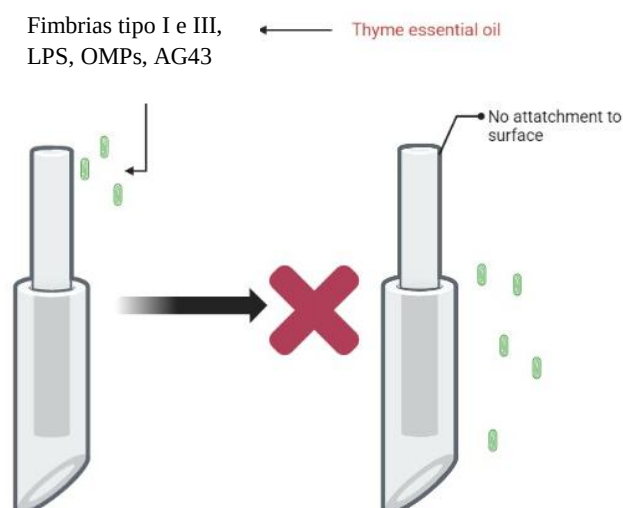


Figure 4: Structural representation and possible genes involved in biofilm formation and adhesion of *K. pneumoniae*.

The fimbriae relation to *K. pneumonia* biofilm formation has already been confirmed, but more studies are necessary because it has not been clarified which genes are involved in this process. There are a few examples regarding other microorganisms that can help to understand, including *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli*, and *S. aureus*.

The initial phase (0–11h) of *C. albicans* biofilm formation occurs initially with yeast adherence to the substrate, followed by cell coaggregation and colonization (0–11 h) (42, 65). The presence of yeast is critical for surface anchoring. Then, growth and proliferation occur, with the development of the basal layer, cell anchoring, and production of the extracellular matrix material, as the intermediate phase (12–30 h). The maturation phase occurs between 31 and 72 h, in which the pseudohyphae grow and mature, followed by hyphae extension from germinative tubes and dissemination of cells (42, 65, 66).

Molecular mechanisms of biofilm regulation have already been described by a few authors (42, 67, 68). The first step is adherence, which occurs through the *ALS* gene family, expressed by yeasts and hyphae, and responsible for adherence and aggregation to other microorganisms. The *HWP1* gene encodes a hyphae-adhesin only, whereas the *EAP1* gene grants adherence to polystyrene and the *CSH1* gene confers superficial hydrophobicity adherence, along with other lesser-known adhesins (42,69) **Figura 5.**

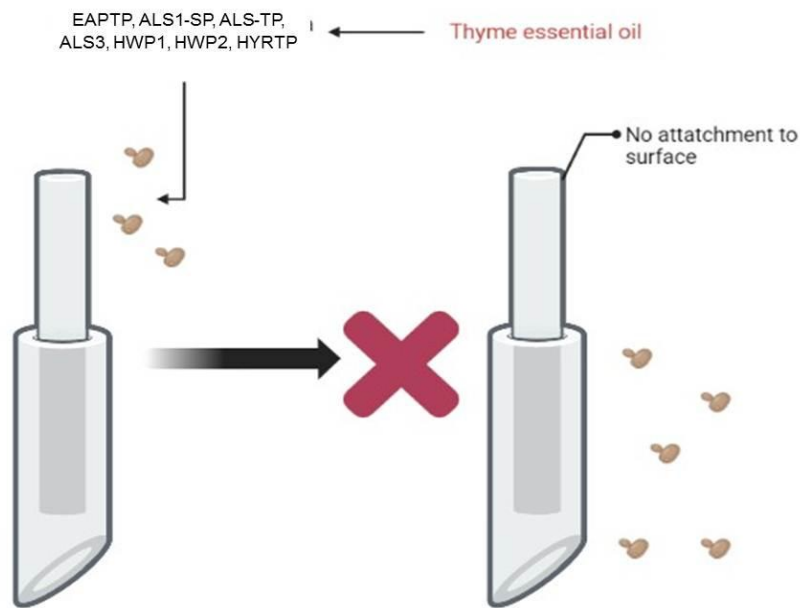


Figure 5: Structural representation and possible genes involved in biofilm formation and adhesion of *C. albicans*.

Adherence is followed by maturation, with hyphae formation, and the *EFG1* gene is involved in morphological transition regulation and can produce an adherent structure to polystyrene, polyurethane, and glass. Other genes are also required for morphological differentiation, such as *CPH1*, *TEC1*, *SUV3*, *NUP85*, *UME6*, *MDS3*, and *KEM3* (66). Extracellular matrix production is mediated through the expression of *ADH1*, *GCA1*, and *GCA2* genes (70).

When the biofilm is established, it allows invasion and cell damage through gene expression from the main histolytic enzymes, secretory aspartic proteases (*SAPs*), and phospholipases (*PLBs*) (71). The last process is cell dispersion to create new communities that are down-regulated by *UME6* and *SUR7* genes and up-regulated by *PES1* and *NRG1* genes (72). Changes in expression of these genes during biofilm maturation are controlled by molecule accumulation of *quorum sensing* (70, 73). Genes related to filamentation and adherence are mainly regulated by *EFG1*, *BCR2*, and *TYE1* transcription factors (74, 75).

(76) evaluated 165 transcriptional regulators in *C. albicans* biofilm, in which 6 mutants were selected for the transcriptional network controls, *bcr1Δ/Δ*, *tec1Δ/Δ*, *efg1Δ/Δ*, *ndt80Δ/Δ*, *rob1Δ/Δ*, and *brg1Δ/Δ*. The authors showed that 1061 genes were regulated by at least one of the 6 biofilm regulators, and they bind to promoting regions of de *BCR1*, *TEC1*, *EFG1* and *BRG1*. Moreover, they demonstrated that

Tec1, Efg1, Ndt80 e Rob1 bind to *ROB1*, Efg1 e Ndt80 bind to *NDT8*, and this regulation is positive. Bcr1, Efg1, Ndt80, Rob1, and Brg1 are activators and repressors of their target genes, whilst Tec1 acts only as a positive regulator. The biofilm network-target genes of these 6 regulators comprehend around 15% of the *C. albicans* genome.

Although *C. albicans* is a model for the study and representation of biofilm formation and its related genes, more studies should be performed with other biofilm-forming microorganisms to understand the adherence and formation mechanisms, for more specific control and treatment.

4 Conclusions

This study, through a systematic review of high-impact publications and scientific relevance, pointed to the alarming situation of biofilm formation in hospital catheters as a worldwide health problem. Microbial resistance and failure to properly clean and sterilize materials that allow proliferation are among the factors that contribute to biofilm formation in a hospital environment. Virulence factors related to each microorganism are also critical for the gravity of a possible infection in patients.

Biofilm formation in a hospital environment is characterized as one of the main causes of hospital infections, increasing the cost of public health by increasing hospitalization time and possible death. Furthermore, cleaning methods and disinfection comprehend promising alternatives that can destroy the biofilm-forming microorganism, increasing patients' quality of life and minimizing unnecessary expenses from public health.

However, EOs-plant-derived antimicrobial activity has drawn the attention of scientists because it can be used as an alternative to antibiotic resistance from pathogens. As a result, in the last few years, there has been an increase in the growth of several aromatic and medicinal plants due to their efficient antimicrobial properties. In this sense, it is important to provide a review that compiles all the results.

Competing Interests

The authors declare no competing financial interests.

Funding

The current research was funded by the Foundation of Amparo Research of Rio Grande do Sul (FAPERGS) [17/2551-0001078-7].

Acknowledgments

Thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Federal University of Pelotas for supporting the scholarships to students.

References

1. MIRANDA, I. F.; SANTOS, M. L.; OLIVEIRA, W. C. S.; OLIVEIRA, M. C. 2019. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo kpc: disseminação mundial e situação atual no brasil. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR. V. 25, p. 113–119.
2. GATO, P. C.; MAIA, A. L.; SANTOS, K. A. S.; SANTOS, L. A.; SILVA, E. M. R. 2022. *Klebsiella pneumoniae* bacterial resistance profile in the intensive care unit in a teaching hospital in west pará during 2018 to 2019. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.8, n.1, p.1208-1225 jan. <https://doi:10.34117/bjdv8n1-077>.
3. PETERSON, E.; KAUR, P. 2018. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. Frontiers in Microbiology, v. 9, n. NOV, p. 121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
4. PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 80, n. 3. <https://doi.10.1128/MMBR.00078-15>.
5. AIRES, C. A. M.; CONCEIÇÃO-NETO, O. C.; OLIVEIRA, T. R. T.; DIAS, C. F.; MONTEZZI, L. F.; PICÃO, R. C.; ALBANO, R. M.; ASENSI, M. D.; ASSEF, A. P. D. C. 2017. Emergence of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* sequence type 392 in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e00317–17. <https://doi: 10.1128/AAC.00317-17>.
6. SCHROLL, C.; BARKEN, K.B.; KROGFELT, K. A.; STRUVE, C. 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumonia* biofilm formation. BMC Microbiology. V. 10, Article number: 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>
7. KAISER, T. D. L.; SANTIAGO, D. D.; MATOS, B. V. 2016. Isolados De Enterobactérias Provenientes De Um Hospital Da Região De Santa Teresa-Es. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama, v. 20, n. 1, p. 3-7, jan./abr.

8. RUSSO, T. A.; OLSON, R.; FANG, C. T.; STOESSER, N.; MILLER, M.; MACDONALD, U.; HUTSON, A.; BARKER, J. H.; LA HOZ, R. M.; JOHNSON, J. R. 2018. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 9. <https://doi:10.1128/JCM.00776-18>.
9. MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 22 January. <https://doi:10.3389/fcimb.2018.00004>.
10. CLEGG, S.; MURPHY, C. N. 2016. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 1. <https://doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>.
11. SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*. <https://doi:10.1155/2016/2475067>.
12. BILCU, M.; GRUMEZESCU, A. M.; OPREA, A. E.; POPESCU, R. C.; MOGOSANU, G. D.; HRISTU, R.; STANCIU, G. A.; MIHAILESCU, D. F.; LAZAR, V.; BEZIRTZOGLU, E.; CHIFIRIUC, M. C. 2014. Efficiency of Vanilla, Patchouli and Ylang Ylang Essential Oils Stabilized by Iron Oxide Nanostructures@C14 against Bacterial Adherence and Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains. *Molecules*. Nov; 19(11): 17943–17956. <https://doi:10.3390/molecules191117943>.
13. FOURNOMITI, M.; KIMBARIS, A.; MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; THEODORIDOU, I.; PAPAEMMANOUIL, I.; KAPSIOTIS, I.; PANOPOULOU, M.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. E.; ALEXOPOULOS, A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Ecol Health Dis*, 26, 23289. <https://doi:10.3402/mehd.v26.23289>.
14. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. 2015. The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avicenna J Phytomed*. Jul-Aug;5(4):309-18. PMID: 26442753; PMCID: PMC4587606.
15. KOZICS, K.; BUČKOVÁ, M.; PUŠKÁROVÁ, A.; KALÁSZOVÁ, V.; CABICAROVÁ, T.; PANGALLO, D. 2019. The Effect of Ten Essential Oils on Various Drug-Resistant Skin Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. *Molecules*. Dec; 24(24): 4570. <https://doi:10.3390/molecules24244570>.
16. YANG, S. K.; YUSOFF, K.; AJAT, M.; THOMAS, W.; ABUSHELAIBI, A.; AKSEER, R.; LIM, S. H. E.; LAI, K. 2019. S. Rupture of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* membrane via the induction of oxidative stress by cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum verum* J. Presl). *PLoS One*. 14(4): e0214326. <https://doi:10.1371/journal.pone.0214326>.
17. YANG, X.; RAJIVGANDHI, G. N.; RAMACHANDRAN, G.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; ALMANAA, T. N.; MANOHARAN, N.; VIJI, R.

2020. Preparative HPLC fraction of essential oil of *Hibiscus rosa-sinensis* against biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae*. *Saudi J Biol Sci.* Oct; 27(10): 2853–2862.
18. ISEPPI, R.; CERBO, A. D.; ALOISI, P.; MANELLI, M.; PALLES, V.; PROVENZANO, C.; CAMELLINI, S.; MESSI, P.; SABIA, C. 2020. *In vitro* activity of essential oils against planktonic and biofilm cells of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)/carbapenemase-producing gram-negative bacteria involved in human nosocomial infections. *Antibiotics (Basel)*. May; 9(5): 272. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050272>.
 19. VASCONCELOS, N. G.; QUEIROZ, J. H. F. S.; SILVA, K. E.; VASCONCELOS, P. C. P.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. 2020 Synergistic effects of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *PLoS One*. 15(7): e0236505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236505>.
 20. DUDEK-WICHER, R.; PALECZNY, J.; KOWALSKA-KROCHMAL, B.; SZYMCHYK-ZIÓŁKOWSKA, P.; PACHURA, N.; SZUMNY, A.; BROZYNA, M. 2021. Activity of liquid and volatile essential oil fractions against biofilm formed by selected reference strains on polystyrene and hydroxyapatite surfaces. *Pathogens*. May; 10(5): 515. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050515>.
 21. GINTING, E. V.; RETNANINGRUM, E.; WIDIASIH, D. A. 2021. Antibacterial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) essential oil against extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria. *Vet World*. Aug; 14(8): 2206–2211. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2206-2211>.
 22. NDEZO, B.; BISSO, R.; TOKAM, C. K.; DZOYEM, J. P. 2021. Efficacy of the synergistic antibiofilm of thymol and piperine in combination with three aminoglycoside antibiotics against *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*: 7029944. <https://doi.org/10.1155/2021/7029944>.
 23. BERGAMO, B.; DEMOLINER, F.; TIMM, C. D.; CARVALHO, N. R.; HELBIG, E.; GANDRA, E. A. 2020. Biofilm formation and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolates. *Ciência e Tecnologia de Alimentos Ciênc. anim. bras.* 21. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-48029>.
 24. WIJESINGHE, G. H.; FEIRIA, S. B.; MAIA, F. C.; OLIVEIRA, T. R.; JOIA, F.; BARBOSA, J. P.; BONI, G. C. 2021 *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of *Cinnamomum verum* leaf oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *An Acad Bras Cienc.* <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201507>.
 25. SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J.; CORKE, H. 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 14, p. 5484-90, jul. <https://doi.org/10.1021/jf070424d>.
 26. DHARA, L.; TRIPATHI, A. 2019. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. v. 39, p. 65-73. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03692-y>.

27. ANANDHI, P.; THARANI, M.; RAJESHKUMAR, S.; LAKSHMI, T. 2022. Antibacterial activity of cinnamon and clove oil against wound pathogens. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. [https://doi: 10.47750/jptcp.2022.871](https://doi.org/10.47750/jptcp.2022.871).
28. SOUZA, E. R. L. DE, CRUZ, J. H. DE A., FERREIRA, J. L. S., OLIVEIRA, H. M. B. F. DE, & OLIVEIRA FILHO, A. A. 2021. Potencial antimicrobiano e antiaderente do óleo essencial de *Lavandula híbrida* grosso contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of health investigation*,10(6), 906–912. <https://doi.org/10.21270/archi.v10i6.5008>.
29. AL-MARIRI, A.; SAFI, M. 2014. In vitro antibacterial activity of various plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iran J Med Sci*. Jan; 39(1): 36–43. PMID: 24453392; PMCID: PMC3895893.
30. FERREIRA ACB, DEPRÁ MM, PIES OTC, SOUSA ICR, ROCHA LKM, FILHO JCPS. 2014. Infecções em cateteres de hemodiálise: aspectos microbiológicos e de resistência em uma unidade de referência de Belém. *Rev Soc Bras Clin Med*.;12(4):288-92.
31. ALVES M, REBELO M, GONÇALVES V, PIEDADE J, ROCHA R, BARREIRA J, FERREIRA I. 2016. Biofilme bacteriano e infecção hospitalar. *Saúde: Conexões e sustentabilidade para o entendimento global*; 1, 110-122.
32. GULATI, M.; NOBILE, C. J. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microb Infect*, v. 18, n. 5, p. 310-321. <https://doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002>.
33. BEN-AMI, R. 2018. Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 3. <https://doi:10.3390/jof4030097>.
34. JESUS, J.S.; COELHO, M.F.; LUZ, R.A. 2018. Cuidados de enfermagem para prevenção de infecção do trato urinário em pacientes com cateterismo vesical de demora (CVD) no ambiente hospitalar. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*, v. 63, n. 2, p. 96-99. <https://doi.org/10.26432/1809-3019.2018.63.2.96>.
35. ÍÑIGO, M.; POZO, J. L. Del. 2018. Practical approach by type of pathogens Fungal biofilms : From bench to bedside. *Revista Espanola De Quimioterapia*, v. 31, n. suppl 1, p. 35–38. PMCID: PMC6459572 PMID [30209921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30209921/).
36. OLIVEIRA, A. C. DE, CRUZ, R. R. DO N. R. DA, CARVALHO, C. A. DE, DÓRIA, A. C. O. C., LIMA, J. S. B. DE, PESSOA, R. S., & KHOURI, S. 2018. Avaliação do crescimento de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *in vitro*, em lúmen de cateteres de poliuretano. *Revista Univap*, 24(46), 74–83. <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v24i46.1951>
37. TUON, F F B; RIBEIRO, V; CIESLINSKI, J; LIMA, C; KRAFT, L; SUSS, P; TELLES, J. 2022. Sonicação como uma ferramenta para romper biofilmes e recuperar microrganismos em cateteres vesicais. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. V. 26, Supplement 1, Jan. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101770>.
38. MELO IA, GUERRA RC. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. *Salusvita*. 33(3): 389-414, 2014.
39. WANG, G.; ZHAO, G.; CHAO, X.; XIE, L.; WANG, H. 2020. The virulence, biofilm and antibiotic resistance characteristic of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. Sep; 17(17): 6278. <https://doi:10.3390/ijerph17176278>.

40. DA SILVA HRA, BONIFÁCIO MAS, DE OLIVEIRA MSC, ELLER LKW. 2017. Avaliação dos genes de virulência e formação de biofilmes em *Escherichia coli* isoladas em um laboratório clínico de Presidente Prudente/SP. *Colloq Vitae*; 9(3): 13-23.
41. AL-BAYATI, M.; SAMARASINGHE, S. 2022. Biofilm and Gene Expression Characteristics of the Carbapenem-Resistant Enterobacterales, *Escherichia coli* IMP, and *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 Associated with Common Bacterial Infections. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 4788. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084788>.
42. PONDE, N O.; LORTAL, L.; RAMAGE, G.; NAGLIK, J. R.; RICHARDSON, J. P. 2021. *Candida albicans* Biofilms and Polymicrobial Interactions. *Crit Rev Microbiol*. February ; 47(1): 91–111. <https://doi:10.1080/1040841X.2020.1843400>.
43. PARK S, DINGEMANS J, GOWETT M, SAUER K. 2021. Glucose-6-phosphate acts as an extracellular signal of SagS to modulate *Pseudomonas aeruginosa* c-di-GMP levels, attachment, and biofilm formation. *mSphere* 6: e01231-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01231-20>.
44. HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. 2013. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais- o estado da arte. Artigo de Revisão, *Arquivos de medicina*, Porto, Portugal, v. 27, n. 1, p. 27-36, fev.
45. CAUMO K.; DUARTE M.; CARGNIN S.T.; RIBEIRO, V.B.; TASCA, T.; MACEDO, A.J. 2010. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar, *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v.11. n. 16, p. 89-96, jul. /dez. <http://191.232.52.91/index.php/revista/article/view/163>.
46. MARQUES, P. B.; CARNEIRO, F. M. C.; FERREIRA, A. P. 2011. Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. *Rev Pan-Amaz Saude* [online], vol.2, n.1 [citado 2022-04-31], pp.53-58. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000100006&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 2176-6215. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232011000100006>.
47. VIEGA PIM. Caracterização de bacteriófagos de *Proteus mirabilis* e avaliação da sua eficácia em biofilmes. Tese (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade do Minho, 2014.
48. RIBEIRO KL. Desenvolvimento de cateteres venosos centrais modificados com peptídeos antimicrobianos para redução de incidência de biofilmes. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
49. PIMENTEL, N.M.S. Infecções em cateteres de hemodialisados. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
50. DANSKI MTR, PONTES L, SCHWANKE AA, LIND J. 2017. Infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter venoso central para hemodiálise. *Rev baiana enferm*; 31(1): 1-10. <https://doi.org/10.18471/rbe.v31i1.16342>.
51. ESMANHOTO CG, TAMINATO M, FRAM DS, BELASCO AGS, BARBOSA DA. 2013. Microrganismos isolados de pacientes em hemodiálise por cateter venoso central e evolução clínica relacionada. *Acta Paul Enferm*. 26(5):413-20. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002013000500003>.

52. QIAN, W.; SUN, Z.; WANG, T.; YANG, M.; LIU, M.; ZHANG, J.; LI, Y. 2020. Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. Microb Pathog. Feb. <https://doi:10.1016/j.micpath.2019.103924>.
53. BASSETTI, M.; VENA, A.; CROXATTO, A.; RIGHI, E.; GUERY, B. 2018. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context 7: 1-18. <https://doi:10.7573/dic.212527>.
54. KWIATKOWSKI, P.; SIENKIEWICZ, M.; PRUSS, A.; LOPUSIEWICZ, L.; ARSZYNKA, N.; KOSZKO, I. W.; KILANOWICZ, A.; KOT, B.; DOLEGOWSKA, B. 2022. Antibacterial and antibiofilm activities of essential oil compounds against uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* that produce metallo- β -lactamase-1 from New Delhi. Antibiotics (Basel). <https://doi:10.3390/antibiotics11020147>.
55. CONDÒ, C.; ANACARSO, I.; SABIA, C.; ISEPPI, R.; ANFELLI, I.; FORTI, L.; NIEDERHAUSEN, S.; BONDI, M.; MESSI, P. 2020. Antimicrobial activity of spice essential oils and their efficacy on mature biofilms of human pathogens. Nat Prod Res. Feb;34(4):567-574. <https://doi:10.1080/14786419.2018.1490904>.
56. JACOBSEN, A. L.; PRATT, R. B.; DAVIS, S. D.; EWERS, F. W. 2008. Comparative community physiology: nonconvergence in water relations among three semi-arid shrub communities. The New phytologist, v. 180, n. 1, p. 100–13. <http://www.jstor.org/stable/25150555>. Accessed 21 May 2022.
57. , G. F.; CLEGG, S.; ALLEN, B. L. 1989. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. Journal of bacteriology, v. 171, n. 3, p. 1262–70. <https://doi:10.1128/jb.171.3.1262-1270.1989>.
58. CHEN, F.-J.; CHAN, C.-H.; HUANG, Y.-J. 2011. Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. Journal of bacteriology, v. 193, n. 7, p. 1718–25. <https://doi:10.1128/JB.01395-10>.
59. SHARON, N. 1987. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. FEBS letters, v. 217, n. 2, p. 145–57. [https://doi:10.1016/0014-5793\(87\)80654-3](https://doi:10.1016/0014-5793(87)80654-3).
60. WITKOWSKA, D.; MIESZAŁA, M.; GAMIAN, A. 2005. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella* fimbriae are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. FEMS immunology and medical microbiology, v. 45, n. 2, p. 221–30. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.04.005>.
61. SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. 2005. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. American Society for Microbiology, v. 73, n. 8, p. 4626–4633. <https://doi:10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005>.
62. STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; REISNER, A. 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. FEMS immunology and medical microbiology, v. 65, n. 2, p. 350–9. <https://doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00965.x>.
63. STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. 2009. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and

- assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity*, v. 77, n. 11, p. 5016–24. <https://doi:10.1128/IAI.00585-09>.
64. SCHROLL, C.; BARKEN, K. B.; KROGFELT, K. A; STRUVE, C. 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC microbiology*, v. 10, p. 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>
65. SENEVIRATNE CJ, JIN L, SAMARANAYAKE LP. 2008. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 14(7):582-90. <https://doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x>.
66. GLOAG, E. S.; FABBRI, S.; WOZNIAK, D. J.;STOODLEY, P. 2020. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm*. Dec; 2: 100017. <https://doi:10.1016/j.bioflm.2019.100017>.
67. NOBILE CJ, NETT JE, HERNDAY AD, HOMANN OR, DENEALT JB, NANTEL A. 2009. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol*. 7(6):e1000117. <https://doi: 10.1371/journal.pbio.1000133>.
68. NAILIS H, VANDENBROUCKE R, TILLEMANN K, DEFORCE D, NELIS H, COENYE T. 2009. Monitoring *ALS1* and *ALS3* gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia*.;167(1):9-17. <https://doi:10.1007/s11046-008-9148-6>. Epub 2008 Aug 6.
69. KARKOWSKA-KULET AJ, RAPALA-KOZIKM, KOZIK A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*.56(2):211-24.
70. FINKEL JS, MITCHELL AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 9(2):109-18, 2011.
71. ZHUW, FILLER SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol*. 12(3):273-82, 2010.
72. BERNARDO SM, LEE SA. *Candida albicans* SUR7 contributes to secretion, biofilm formation, and macrophage killing. *BMC Microbiol*.10:133, 2010.
73. UPPULURI P, PIERCE CG, THOMAS DP, BUBECKSS, SAVILLE SP, LOPEZ-RIBOT JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell*. 9(10):1531-7, 2010.
74. GANGULY S, MITCHELL AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*.14(4):380-5, 2011.
75. DWIVEDI P, THOMSON A, XIE Z, KASHLEVA, GANGULY S MITCHELL AP, et al. Role of Bcr1- activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One*. (1): 16218, 2011.
76. DA CUNHA, J. A.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. 2018. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens—a review. *Journal of Applied Microbiology*, v. 125, n. 2, p. 328-344

Capítulo 2

5.1- Manuscrito 1

Essential oils and major constituents activity against biofilm formed by multidrug-resistant bacteria in hospital medical material

Cristiane Telles Baptista¹, Thobias Toniolo de Souza¹, Rafaely Piccioni Rosado¹, Luíze Garcia de Melo¹, Gabriele Oliveira Lassance¹, André Gundel², Rogério Antônio Freitas³, Claudio Martin Pereira de Pereira³, Leonardo Quintana Lopes⁴, Janice Luehring Giongo^{1*}, Rodrigo de Almeida Vaucher^{1*}

Artigo submetido a Revista Natural Product Research

Essential oils and major constituents activity against biofilm formed by multidrug-resistant bacteria in hospital medical material

Cristiane Telles Baptista¹, Thobias Toniolo de Souza¹, Rafaely Piccioni Rosado¹, Luíze Garcia de Melo¹, Gabriele Oliveira Lassance¹, Claudio Martin Pereira de Pereira², Rogério Antônio Freitag², Leonardo Quintana Lopes³, André Gundel⁴, Janice Luehring Giongo^{1*}, Rodrigo de AlmeidaVaucher^{1*}

^{1*}*Department, University, City, Country*

¹Laboratory of Biochemistry Research and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBiOM), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

²Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

³Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Professor associado da Universidade Federal do Pampa, campus Bagé.

*Corresponding Authors: Janice Luehring Giongo and Rodrigo de Almeida Vaucher, Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Essential oils and major constituents activity against biofilm formed by multidrug-resistant bacteria in hospital medical material

Abstract

Pseudomonas aeruginosa as well as *Klebsiella pneumoniae* are Gram-negative bacteria commonly found in the hospital environment and also cause infections in immunocompromised patients. They are prominent in growing in biofilms and increasing resistance to factors such as protection against antimicrobials, disinfectants, the innate immune system, and various negative environmental influences. The use of essential oils has been gaining ground in the control of biofilm and resistant microorganisms. The objective of this work was to test the antibacterial activity of thyme and palmarosa oils and their major constituents eugenol, thymol and geraniol against biofilm formed in hospital medical material. MIC and CFM were evaluated by the plate microdilution method using *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* strains. The antibiofilm activity after treatment with EO and CM was evaluated through the crystal violet assay, determination of total proteins, synergism, growth curve, atomic force microscopy, inhibition of exopolysaccharide production, and for *P. aeruginosa* it was also performed the pyocyanin production inhibition tests and the motility test. From the results of the present study, it was evidenced in all tests that there was a significant decrease in biofilm formation and that EO and their MC are promising in controlling biofilm formation.

Keywords: Biofilm; Essential oils; Antimicrobial activity; Multidrug resistant bacteria

1. Introduction

Biofilms are responsible for up to 80% of antimicrobial-resistant nosocomial infections. The vast majority of microorganisms are associated with infections related to medical devices, such as catheters and urinary catheters [1]. Along these lines, catheter-associated urinary tract infections account for more than 1 million cases in the US and nearly 80% of nosocomial infections worldwide. Annual treatment costs exceed \$350 million per year, which shows the urgency of the situation [2].

Of the varied species within the genus *Klebsiella*, *K. pneumoniae* is considered the most medically important species, accounting for 75% to 86% of clinical infections caused by bacteria of this genus [3].

The genus *Pseudomonas*, more specifically *P. aeruginosa* is a pathogen responsible for acute and chronic respiratory infections, associated with high mortality rates ranging from 42 to 87% of cases [4].

P. aeruginosa and *K. pneumoniae* stand out in growing in biofilms. These species are able to take advantage of biofilm formation and increase resistance to

factors such as protection against antimicrobials, disinfectants, the innate immune system and various negative environmental influences, thus allowing them to cover various environmental niches and colonize diverse tissue matrices. , Soil and plant, a fact that is not necessarily observed in the same bacteria when it develops in the planktonic form [5].

In this sense, the components found in medicinal plants play an important role in traditional and modern medicine, since microbial resistance is an increasingly worrying threat to global public health, requiring the search for new antimicrobial agents. The WHO encourages the use of medicinal plants in the traditional medical system, and in the last decade there has been an increase in research on these plants, for a possible solution in the fight against infectious diseases [6].

Over the years, the search for therapeutic alternatives from medicinal plants has gradually increased and, with this, several studies using essential oils extracted from aromatic and medicinal plants have shown their antimicrobial activities, as is the case of thyme essential oils. (*Thymus vulgaris* L) and palmarosa (*Cymbopogon martini*) [7].

Thymes's major constituent in its essential oil is Thymol and their antimicrobial activity is attributed to its action on the bacterial cell wall. Eugenol according to literature reports, has significant antibacterial and antifungal properties. Palmarosa essential oil is rich in Geraniol, a compound that also has antimicrobial, immunomodulatory and antitumor activity [8].

A study that evaluates the antimicrobial activity of essential oils and their major constituents would bring a crucial contribution in the medical-care field, considering that antimicrobial resistance is a problem of significant impact on public health and that the therapeutic options for multidrug-resistant strains are quite restricted.

This study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity and the synergism of Palmarosa and Thyme essential oils and their major constituents Geraniol, Eugenol and Thymol against *Klebsiella pneumoniae* (strains 31 and 36) biofilm and *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 in hospital probe material.

2. Material and methods

2.1 Sample collection, culture and bacterial identification

The samples of *K. pneumoniae* used correspond to different biological materials from patients hospitalized at the Hospital Escola da Universidade Federal

de Pelotas (HE- UFPel). *P. aeruginosa* is ATCC and belongs to library of the Research Laboratory in Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Federal University of Pelotas (UFPel).

From these samples, bacterial isolates were obtained by cultivation on blood agar and MacConkey culture media and incubated in a microbiological oven at 37°C for 24 hours. After colony growth, they were introduced into identification panels, as well as antibiogram panels, at a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL, standardized by the McFarland turbidity scale and introduced into the BD Phoenix 100 Automated Microbiology equipment, to microorganism identification (ID) and antimicrobial susceptibility profile (TSA).

2.2 Characterization of essential oils

The essential oils of *Cymbopogon martini* (palmarosa) and *Thymus vulgaris* L. (thyme) were purchased commercially from FERQUIMA Ltda. The major constituents geraniol, thymol, and eugenol were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil). The characterization of the essential oils was carried out at the Federal University of Pelotas (UFPel), in the Chemistry course. The compounds were prepared and analyzed by GC, Varian 3800 Gas Chromatograph equipped with a closed capillary tube silica column (25m × 0.25mm) coated with SE-54. For the analysis the following media were used: He (1mL/min) was used as the carrier gas, in the column injector at 200°C, FID 250°C, and column temperature from 60°C to 325°C with 4°C/min. The analyses were performed on an HP 5973-6890, GC/MSD operating system in EI mode at 70 eV, equipped with an HP-5 (30m X 0.25mm) cross-linked capillary column. The column and injector temperatures were the same as for GC.

The identification of essential oils of palmarosa, cinnamon and thyme was based on the retention index (Retention Index, RI), determined with reference to the homologous series of n- alkanes, C7-C30, under similar experimental conditions, comparing with the similar mass of the mass spectra with NBS Library [9] and as described by Adams [10]. The relative amounts of the individual components were calculated based on the GC peak area (FID response).

2.3 Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration

The determination of the CIM was performed using the microdilution technique, according to the M7-A6 method of CLSI [11]. The compounds were prepared in a 1:2 dilution in DMSO 50% in a sterile tube, so that the concentrations of the mother solutions of thymol, eugenol, geraniol, thyme, and palmarosa were 150µg/mL, 533,500µg/mL, 439.00µg/mL, 473.00µg/mL and 437,500µg/mL, respectively. The compounds were stored at 4°C to minimize volatilization. The assays were performed in 96-well plates, in which 100µL of Mueller Hinton broth with 100µL of the compounds were added to the first well. From the first well, serial dilution followed until the tenth well of the plate. After serial microdilution, 10µL of the 0.5 McFarland scale inoculum (1.5×10^8 CFU/mL) was added to all wells and incubated for 24 hours at 37°C. A negative control containing only the culture medium and a positive control for microbial growth containing the culture medium and 10µL of the inoculum were performed. The CIM was defined as the lowest concentration of the compound that inhibited microbial growth and was observed by the turbidity of the culture medium in the wells of the plate. This test was performed in duplicate and the CIM was determined after seeding 1µL of the contents of the wells corresponding to 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM in BHI agar and incubated for 24 hours at 37°C for subsequent quantification of colonies.

2.4 Synergism

The determination of synergism was performed using the microdilution technique in 96-well plates, with one plate for each bacterium. The two essential oils and the three major compounds were cross-linked by serial dilution up to 1:256. 100µL of Mueller Hinton broth was added to all wells of the plate, with 100µL of compound A in the first well, following serial dilution to 1:256. Next, 100µL of compound B was added, and cross-linking of the different concentrations of the compounds was performed. Finally, 10µL of the microbial inoculum on the 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL) was added to all wells of the plate and incubated for 24 hours at 37°C. A negative control containing only the culture medium and a positive control for bacterial growth containing the culture medium and 10µL of the inoculum were performed. The CIM was defined as the lowest concentration of the compound that inhibited microbial growth and was observed by the turbidity of the culture medium in the wells of the plate. This test was performed in duplicate in two independent experiments.

For the analysis of the results, the following mathematical formula was used: ΣFIC (sum of the fraction of the inhibitory concentration) = $FICA + FICB$, where, $FICA$ (fraction of the inhibitory concentration of compound A) = $CIMA$ (combined with compound B) / $CIMA$ (alone) and $FICB$ (fractional inhibitory concentration of compound B) = $CIMB$ (combined with compound A) / $CIMB$ (alone). Considering synergistic effect when $\Sigma FIC < 0.5$; additive when $\Sigma FIC > 5$ and < 1 ; indifferent if $\Sigma FIC > 1$ and < 2 and antagonism if $\Sigma FIC > 2$ [12].

2.5 Preparation of hospital medical supplies

The most commonly used materials in the composition of the probes are polytetrafluoroethylene (PTFE), polyurethane, silicone, polyamide, and polyester, with the most flexible and kink-resistant probes being the least associated with infectious events. For the experimental trials, hospital probes were used. This material was cut into a length of two centimeters and arranged two per test tube with a screw cap. This material was sterilized for later use.

2.6 Antibiofilm assay on hospital medical material

Strains of *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strains 31 and 36) belonging to the library of the Research Laboratory in Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Federal University of Pelotas (UFPeL). The samples were inoculated in BHI agar without glucose (0%) and BHI supplemented with 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3% glucose, incubated at 37°C for 24 hours, and transferred to BHI broth. Then, aliquots of the cultures were added to the BHI broth with the same glucose concentration until reaching MacFarland's 0.5 scales. Subsequently, in each tube containing the hospital medical material, 3mL of BHI broth was added, along with 150μL of inoculum of each microorganism suspension, and the majority of oils and/or constituents were added at concentrations corresponding to 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM, to test their efficacy in inhibiting biofilm formation. The negative controls were tubes with uninoculated BHI broth. The positive controls, on the other hand, contained only inoculum and BHI broth. The tubes were incubated at 37°C for 48 hours [13 with adaptations].

2.7 Quantification of biofilm formation by crystal violet staining

After the time had elapsed, the microorganism suspension was aspirated and a probe was removed from each tube, which was reserved for later protein quantification and colony counting. The probe that remained in the tube was washed 3 times with 2mL of sterile 0.9% saline solution and then transferred to another sterile tube. The biofilm was then fixed in an oven at 60°C for 60 minutes. The tubes were stained with 2mL of 1% Hucker's crystal violet solution for 15 minutes, washed 5 times with sterile 0.9% saline solution, and then 2mL of 95% ethanol was added for 10 minutes. Then 200µL of each tube was transferred in triplicate to 96-well plates and absorbance was read in a microplate reader (Rosys Anthos 2010) at a wavelength of 492 nm [14 with adaptations].

2.8 Count of viable biofilm colonies

These assays were performed from the antibiofilm technique (2.6). After the incubation time (48 hours) at 37°C, the tubes containing two probes were removed from the incubator and one probe from each tube was washed 3 times with 2mL of sterile 0.9% saline solution. Then, using a needle with a syringe containing 1mL of saline solution, the probes were scraped. With the help of a 1µL calibrated loop, this liquid with the scrape was seeded in BHI agar and incubated for 24 hours at 37°C for the quantification of colonies. For the validation of the assay, a negative control (culture medium only) and a positive control (culture medium and microorganism) were used [15].

After incubation, colonies were manually counted and the numbers obtained were multiplied by 1,000,000 to find the number of CFU/mL. These values were transformed into a logarithmic scale to create time-of-death graphs. A reduction in CFU number from baseline by $\geq 3 \log_{10}$ was defined as an antimicrobial effect.

2.9 Determination of biofilm proteins

The protein concentration of the samples was determined through the method initially described by Bradford [16] with an adaptation of the technique [17]. Commercially purchased Bradford reagent was used for this assay and a standard curve with bovine albumin (BSA) (Sigma) was performed at concentrations from zero to 74 µg/mL. All samples were analyzed by COBAS. The concentration of the samples was determined by comparison with the standard curve of BSA, plotted and

analyzed by linear regression in a GraphPad curve analysis program. Prism Version 6.0.

2.10 Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy (AFM) was performed at the Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Bagé campus, under the supervision of Professor Dr. André Gundel. For visualization of the biofilm by AFM, the substrates were fixed with absolute methanol for 1 minute. Images were obtained using an Agilent Technologies 5500 microscope [18].

2.11 Inhibition of bacterial motility

P. aeruginosa strain PA01 was used to evaluate the ability to inhibit swimming, swarming, and twitching motility types. Appropriate media for the evaluation of each of the motility types were prepared according to [19]. A 0.5 McFarland inoculum was seeded by mincing on plates with and without the addition of oils and major constituents at concentrations 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM, and after incubation at 37°C for 48 hours growth was evaluated by reading colony diameter.

2.12 Pyocyanin quantification

The quantification of pyocyanin was performed after the formation and treatment of biofilms. Each probe was scraped with the aid of a syringe containing sterile 0.9% saline solution, this material was centrifuged at 12000 rpm for 15 minutes and the supernatant was reserved. To each 5mL of supernatant, 2.5mL of chloroform was added. The samples were shaken vigorously on the vortex for about 30 seconds and then centrifuged at 4000rpm for 10 minutes for phase separation. The aqueous phase was discarded and to the organic phase was added 1mL of a 0.2M HCl solution. Again this solution was shaken vigorously for 30 seconds for extraction and then centrifuged for phase separation. The aqueous phase was collected and set aside to be read at 520nm later. The concentration of pyocyanin in µg/mL was calculated according to its molar extinction coefficient [20 and 21 with modifications]. The experiment was carried out in technical triplicates from two biological replicas.

2.13 Determination of biofilm exopolysaccharide levels

The exopolysaccharide present in the biofilm were measured by the phenol-sulfuric acid method [22, with modifications]. After biofilm formation and treatment, the probes were scraped using a syringe containing sterile 0.9% saline solution, this material was centrifuged at 12000rpm for 15 minutes and the supernatant was discarded. The pellet was pipetted and added to 40µL of deionized water, 40µL of 5% phenol solution, and 200µL of 95-97% sulfuric acid. The plate was incubated for 30 minutes at room temperature. The absorbance was read at 490 nm with a microplate reader. Different concentrations of glucose were used as standard values for the absorbance conversion of the exopolysaccharide.

2.14 Statistical analysis

For the trials the analyses were performed by 1-way ANOVA, followed by Dunnett's test. The significance level was set at 5%. The graphs were performed in GraphPad Prism software (Graphpad Software, INC).

3. Results and discussion

3.1 Characterization of essential oils

The results of the chemical analyses of thyme and palmarosa oil are shown in **Table 1**. The following major compounds were identified for palmarosa oil: geraniol (35.27%), neral (13.09%), and geranyl acetate (9.68%). Thyme oil presented as major compounds: thymol (49.27%), p-cyme (20.18%), and carvacrol (11.86%).

3.2 Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal/Fungicide Concentration

The CIM of the essential oils, as well as their major constituents, are shown in Tables 2 and 3. The CIM of thyme and palmarosa oils against *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strain 31), and *K. pneumoniae* (strain 36) can be evidenced in **Table 2**, where *P. aeruginosa* (PA01) results were 29.01µg/mL, 22.06µg/mL. The CIMs for *K. pneumoniae* (strain 31) were 104.1µg/mL, 16.0µg/mL, and for *K. pneumoniae* (strain 36) were 349.0µg/mL, 11.20µg/mL respectively.

The CIM of thymol, eugenol, and geraniol against *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strain31), and *K. pneumoniae* (strain 36) were shown in **Table 3**. For *P. aeruginosa* (PA01) the results were 29.01µg/mL, 27.7µg/mL, and 25.3µg/mL. The CIMs for *K. pneumoniae* (strain 31) were 104.1µg/mL, 5.74µg/mL, 16.5µg/mL, and

for *K. pneumoniae* (strain 36) were 349.0µg/mL, 9.37µg/mL, 11.60µg/mL respectively.

From these results, we observed that higher concentrations of thymol oil were necessary to inhibit the growth of *Klebsiella pneumoniae* strains. This is because these strains are multidrug-resistant, showing resistance to several conventional drugs, while other strains are ATCC. While the other oils and main constituents behave as potential antimicrobial agents.

3.3 Synergism

The *checkboard* results for thyme and palmarosa essential oils are described in **Table 4**, and it is evident that there was synergism in all tested combinations against *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strain 31), except for the thyme/palmarosa associations that were antagonistic against *K. pneumoniae* (strain 36).

Essential oils have antibacterial activity and can act alone or synergistically with other compounds present. In addition, antimicrobial activity resulting from synergistic effects between essential oils and some antibiotics has been reported. Uzair et al. [23] showed synergistic activity between essential oils and amoxicillin against methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* infections (MRSA). The synergism between thyme and ciprofloxacin showed maximum inhibition of bacterial growth [24]. In 2011, Lv et al. [25] observed synergistic activity using ten essential oils (among them: oregano, sage and bergamot) against *S. aureus*

For the major constituents thymol, eugenol and geraniol, the *checkboard* results are described in **Table 5**, and it is evident that there was synergism in all combinations tested against the microorganisms *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strain 31), however, for *K. pneumoniae* (strain 36) in the combinations thymol/eugenol and thymol/geraniol, there was the antagonism of the compounds tested.

Compounds in essential oils can interact with each other, resulting in synergies of additive, indifferent or antagonistic effects [26]. In recent years, many studies have investigated combinations of essential oils and their components. Eugenol and thymol were tested to show synergistic activity against *L. Monocytogenes*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*, while at the same time demonstrating an indifferent effect against *E. aerogenes*. These synergistic effects are related to the

mechanism of action of each compound, such as the disruption and disintegration of the outer membrane of gram-negative bacteria by thymol, allowing eugenol to access the cytoplasm and destroy bacterial enzymes. Gallucci et al. [27] also evaluated the associated effect of eugenol with geraniol, showing only partial synergism against *Bacillus cereus*, and indifference against *E. coli* and *S. aureus*.

3.4 Quantification of biofilm formation by crystal violet staining

The anti-biofilm activity for the different species tested showed that all were sensitive to the compounds used in their concentrations (0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM), except for *K. pneumoniae* (strain 36), which did not show very significant results against thyme and thymol. In a previous study, Iseppi et al., [28], demonstrated significant antibiofilm activity of $P < 0.01$ for thyme essential oil against biofilm formed by *K. pneumoniae*. These findings are not in agreement with ours, it is believed that it may be because it is a multidrug-resistant *K. pneumoniae* (strain 36). However, for the other microorganisms, thyme and thymol showed significant results in reducing biofilm formation (**Figures 1, 2, and 3**).

It is noted that for *K. pneumoniae* (strain 31) the oil that best showed antibiofilm activity was 1x CIM palmarosa at a concentration of 16µg/mL reduced by 86%. Of the major constituents that best demonstrated inhibition of biofilm formation was 1x CIM eugenol which at a concentration of 5.74µg/mL reduced 79.8% (**Figure 1**). In contrast, thyme and thymol were the compounds that showed the least antibiofilm effect at all concentrations tested.

For *K. pneumoniae* (strain 36) (**Figure 2**), it was evidenced that thyme and thymol were not as efficient in inhibiting biofilm formation regardless of the concentration tested. Whereas palmarosa oil followed by geraniol were the ones that best demonstrated an antibiofilm effect, both at 1x CIM concentrations 11.20µg/ml and 11.60µg/ml, and resulted in a reduction of 86.2% and 85.8% respectively.

In the case of *P. aeruginosa* (PA01) (**Figure 3**), all oils and their major constituents, in all concentrations, showed a reduction in biofilm formation. However, the ones with the best results were palmarosa and geraniol, both at 1x CIM concentrations, 22.06µg/ml and 25.3µg/ml, and resulted in a reduction of 85.5% and 83.9% respectively.

In previous studies, Kozics and collaborators [29], evidenced the antimicrobial activity of some essential oils, including oregano, thyme, clove, arborvitae, cassia,

lemongrass, melaleuca, eucalyptus, lavender, and sage, against resistant microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, and *Klebsiella pneumoniae*). The results show that these essential oils can be effective in preventing the growth of resistant microorganisms.

From the results of the antibiofilm activity of the oils and their major constituents, we observed that for all microorganisms tested there were no significant differences between these groups, showing the same biofilm reduction profile. For *K. pneumoniae* (strain 36), we observed that thyme oil, as well as thymol, did not show such a considerable reduction compared to the control group.

Mohsenipour et al., [30], also examined the effect of thyme extracts on the planktonic form and biofilm structures of six pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenic serotype of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*). The results found by the authors suggest that thyme extracts can be applied as antimicrobial agents against pathogenic bacteria, particularly in biofilm forms.

The studies carried out by Sakkas et al., [31] investigated the antimicrobial activity of five plant essential oils against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Among the oils used are basil, chamomile blue, organum, thyme, and tea tree oil. The bacteria used were *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Our studies are similar to those of Mohsenipour et al., [30] and Sakkas et al., [31], since for *P. aeruginosa* the percentage of biofilm reduction was quite significant as shown in **Figure 3**. Both thyme essential oil and its major constituent thymol showed promising results.

In the present study, as mentioned above, we obtained palmarosa essential oil as being one of the oils that best showed antibiofilm activity as shown in the figures above. A preliminary study found that eugenol expressed an antibacterial activity against *K. pneumoniae*. However, the mechanism of action of eugenol against *K. pneumoniae* remains unexplored. Qian et al. [32], developed a study to obtain more information about the antibacterial effect of eugenol against carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) and possible modes of action. The results found were very promising, eugenol showed strong inhibitory effects on biofilm formation and inactivated CRKP cells growing in biofilms. These findings suggest that eugenol exhibits an antimicrobial effect against CRKP strains and can potentially be used to

control CRKP-related infections. In our studies, overall, eugenol also showed promising results in all antibiofilm treatments.

The antimicrobial activities of essential oils (EOs) and their major constituents from plants have drawn the attention of researchers, as they can be used as alternatives for the control of resistant microorganisms. Such resistance is associated mainly with two important virulence factors, which are: adhesion and biofilm formation. Thus, in recent years, there has been significant interest in the cultivation of various aromatic and medicinal plants aiming at an alternative to minimize resistance [33; 34].

3.5 Count of viable Biofilm colonies

In growth curve assays, we evaluated the antimicrobial activity of the oils and their major constituents against the growth of the microorganisms tested at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM for *K. pneumoniae* (strain 31) for 48 hours (**Figure 4**).

For *K. pneumoniae* (strain 36) in the 48-hour period is evidenced in **Figure 5** the antimicrobial activity of the oils and their major constituents tested at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM.

In **Figure 6** we evaluate the antimicrobial activity of the oils and their major constituents against the growth of the microorganisms tested at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM for *P. aeruginosa* (PA01) at 48 hours.

The results evidenced in this study prove the reduction in the growth of viable colonies, corroborating the findings in the crystal violet quantification tests.

3.6 Determination of biofilm proteins

The present study determined the number of proteins present in the biofilm after exposure to different concentrations (0.25x CIM, 0.50x CIM, 1x CIM) of the oils and major constituents. As can be seen in **Figures 7, 8, and 9** the number of proteins was reduced in the presence of the oils and the major constituents at the concentrations tested. This was an expected result because through the crystal violet technique it was already possible to visualize a decrease in the amplitude of the biofilm.

Biofilms are not only composed of microorganisms. The matrix of these microbial communities consists of water, cells, proteins, products resulting from cell

lysis, and EPS [35]. Proteins are components of all living cells and have been successfully used as a measure of cell biomass in biofilms.

3.7 Atomic Force Microscopy (AFM)

In the present study, a highly sensitive technique was used to visualize the reduction of biofilms of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* species after treatment with essential oils and their major constituents as shown in the figures below. The substrates were submitted to Atomic Force Microscopy, which is one of the most effective tools to analyze the structures and properties present in biological samples, being one of the few techniques that allow the observation of these samples in aqueous solutions with a nanometric resolution [36; 37].

Figures 10, 11, and 12 show the presence of biofilm formed by *K. pneumoniae* (strain 31), *K. pneumoniae* (strain 36), and *P. aeruginosa* (PA01), as well as the activity of essential oils and their major constituents. When comparing the positive control with the other groups, an evident decrease in the biofilm can be observed.

With the AFM technique, it was possible to evaluate in a truer way the antibiofilm activity of the different groups tested, confirming the essential oils and their major constituents have activity against the microorganisms tested. Several works evidence the activity of essential oils using AFM [38; 39; 40; 41;42].

3.8 Inhibition of bacterial motility

According to the increasingly common development of multidrug resistance by various microorganisms, some authors have postulated that inhibition of virulence factors may be a way to decrease the morbidity and mortality of these pathogens without stimulating the development of resistance. This strategy is called bacterial interference. Among bacterial interference is the inhibition of motility.

In the present study, it was possible to demonstrate that after treatment with thyme and palmarosa oils, as well as their major constituents at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM, there was a considerable reduction in bacterial motility in the three media used compared to the control group. This can be seen in **Figures 13, 14, and 15**.

3.9 Pyocyanin quantification

In the present study, a reduction in pyocyanin production was evidenced after treatment with essential oils and their major constituents at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM (**Figure 16**).

Pyocyanin is a bluish pigment, belonging to the phenazine class, and is produced by most *P. aeruginosa* strains. Due to its prominent antibiotic and redox activity, it plays an important role both for virulence and for the cell's own physiology [43; 44].

3.10 Determination of biofilm exopolysaccharide levels

The exopolysaccharide of the biofilms were treated with thyme and palmarosa oil and the constituents thymol, eugenol, and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM. The assay demonstrated a reduction of exopolysaccharide significantly compared to the control. The results are shown in **Figures 17, 18, and 19**.

Figure 19 shows the number of exopolysaccharide in the *P. aeruginosa* biofilm. And we can see that compared to the control group, the results are very promising.

4. Conclusion

After treatment with thyme and palmarosa essential oils, as well as their majority constituents thymol, eugenol, and geraniol, within 48 hours there was significant inhibition of biofilm formation. These results suggest that the tested compounds have potential as antimicrobial agents, mainly because they present activity against multiresistant strains, producing enzymes of clinical importance, little described in the existing literature.

Competing Interests

The authors declare no competing financial interests.

Funding

Current research was funded by Foundation of Amparo Research of Rio Grande do Sul (FAPERGS) [17/2551-0001078-7].

Acknowledgments

Thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Federal University of Pelotas for supporting the scholarships to students.

References

- [1] Vergidis P, Patel R. Novel approaches to the diagnosis, prevention, and treatment of medical device-associated infections. (2012) *Infect Dis Clin North Am.* Mar;26(1):173-86. [https://doi: 10.1016/j.idc.2011.09.012](https://doi.org/10.1016/j.idc.2011.09.012). PMID: 22284383; PMCID: PMC3269005.
- [2] Lo, J.; Lange, D.; Chew, B. (2014). Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. *Antibiotics*, v. 3, n. 1, p. 87–97, 2014.
- [3] Broberg, C.A.; Palacios, M.; Miller V.L. (2014). *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Reports* 2014; 6:64. [https://doi:10.12703/P6-64](https://doi.org/10.12703/P6-64).
- [4] Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. (2011) Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Source. *Chest*. 139(4): 909-919.
- [5] Ribeiro, S. M., Felicio, M. R., Boas, E. V., Goncalves, S., Costa, F. F., Samy, R. P., Franco, O. L. (2016). New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & therapeutics*, v. 160, p. 133-144. [https://DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.02.006](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.006).
- [6] Mickymaray, S.; Aboody, M. A.; Rath, P. K.; Annamalai, P.; Nooruddin, T. (2016). Screening and antibacterial efficacy of selected Indian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Volume 6, Issue 3, March. Pages 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.005>.
- [7] Sánchez, A.A. et al. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, v.50, p.585-590. [http://doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x](http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x)
- [8] Kerekes, E. B.; Vidacs, A.; Tokó, M.; Petkovits, T. (2019). Anti-Biofilm Effect of Selected Essential Oils and Main Components on Mono- and Polymicrobial

Bacterial Cultures. Microorganisms • September. <http://doi:10.3390/microorganisms7090345>.

[9] Masada, Y. (1976) Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. New York (N.Y.): Wiley.

[10] Adams, J. (1995). The Precautionary Principle. First published: December. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0270.1995.tb00504.x>.

[11] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2013.

[12] Rondevaldova, J.; Novy, P.; Kokoska, L. (2015). Efeito antimicrobiano combinatório in vitro de plumbagina com oxacilina e tetraciclina contra *Staphylococcus aureus*. Pesquisa em fitoterapia , 29.1, 2015: 144-147. <https://doi.org/10.1002/ptr.5237>

[13] Sandberg, M.; Maattanen, A.; Peltonen, J.; Vuorela, P. M.; Fallarero, A. (2008). Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilm: an approach to careening of natural antimicrobial compounds. Int. J. Antimicrob. Agentes. V. 32.

[14] Tomaras, A. P.; Dorsey, C. W.; Edelman, R. E.; Atis, L. A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology. Dec, 149, p. 3473-84, pt. 12.

[15] Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, v.6, p.71–79.

[16] Bradford, M. M. (1976). Anal. Biochem., v.72, p.248.

[17] Zor, T.; Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. Analytical Biochemistry. v.236, n.171, p.302-308.

[18] Bonez, P. C. et al. (2017). Anti-biofilm activity of A22 ((S-3, 4-dichlorobenzyl) isothiurea hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: Influence on biofilm formation, motility and bioadhesion. Microbial pathogenesis, v. 111, p. 6-13.

[19] Kurashi, M. (1958). Studies on the biosynthesis of pyocyanine. (II): Isolation and determination of pyocyanine. v. 36, n. 6, p. 174-187.

[20] Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas*

aeruginosa: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. J. Bacteriol. 172:884-900.

[21] Yang, Y., Sreenivasan, P., Subramanyam, R., Cummins, D. (2006). Avaliação multiparamétrica mentos para determinar os efeitos de açúcares e antimicrobianos em um biofilme orapolimicrobiano, Appl. Ambiente. Microbiol. 72. 6734-6742.

[22] Chatterjee, S.; Biswas, N.; Datta, A.; Dey, R.; Maiti, P. (2014). Atomic force microscopy in biofilm study. Microscopy, v. 63, p. 269 – 278.

[23] Uzair, B et al. (2017). Óleos essenciais mostrando atividade anti-MRSA in vitro e sinérgica com antibióticos do grupo das penicilinas. Revista do Paquistão de ciências farmacêuticas, 30.

[24] Allam, N. G., Eldrieny, E. A., Mohamed, A. Z. (2015). Efeito da terapia combinada entre óleo de tomilho e ciprofloxacina na forma de úlcera *Shigella flexneri*. O Jornal de Infecção em Países em Desenvolvimento, 9.05: 486-495. <https://doi.org/10.3855/jidc.6302>.

[25] Lv, F. et al. Efeitos antimicrobianos in vitro e mecanismo de ação de combinações de óleos essenciais de plantas selecionadas contra quatro microrganismos relacionados a alimentos. Food Research International, 44.9 (2011): 3057-3064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>.

[26] Bassolé, I. H. N., Juliani, H. R. (2012). Óleos essenciais em combinação e suas propriedades antimicrobianas. Moléculas, 17.4: 3989-4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>.

[27] Gallucci, M., N et al. (2009). Ação antimicrobiana combinada de terpenos contra os microrganismos de origem alimentar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Flavour and Fragrance Journal, 24.6: 348-354. <https://doi.org/10.1002/ffj.1948>.

[28] Iseppi, R.; Cerbo, A. D.; Aloisi, P.; Manelli, M.; Pallesi, V.; Provenzano, C.; Camellini, S.; Messi, P.; Sabia, C. (2020). In vitro activity of essential oils against planktonic and biofilm cells of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)/carbapenamase-producing gram-negative bacteria involved in human nosocomial infections. Antibiotics (Basel). May; 9(5): 272. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050272>.

[29] Kozics, K.; Bučková, M.; Puškárová, A.; Kalászová, V.; Cabicarová, T.; Pangallo, D. (2019). The Effect of Ten Essential Oils on Various Drug-Resistant Skin Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. Molecules. Dec; 24(24): 4570. <https://doi.org/10.3390/molecules24244570>.

[30] Mohsenipour Z, Hassanshahian M. (2015). The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. Avicenna J Phytomed. Jul-Aug;5(4):309-18. PMID: 26442753; PMCID: PMC4587606.

[31] Sakkas, H.; Gousia, P.; Economou, V.; Sakkas, V.; Petsios, S.; Papadopoulou, C. (2016) Atividade antimicrobiana in vitro de cinco óleos essenciais em isolados clínicos Gram-negativos multirresistentes. Jun-Aug; 5(3): 212–218. <http://doi:10.5455/jice.20160331064446>.

[32] Qian, W.; Sun, Z.; Wang, T.; Yang, M.; Liu, M.; Zhang, J.; Li, Y. (2020), Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. Microb Pathog. Feb. <https://doi:10.1016/j.micpath.2019.103924>.

[33] Souza, R.C.; Junqueira, J.C.; Rossoni, R.D.; Pereira, C.A.; Munin, E.; Jorge, A. O. (2010). Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. Lasers in Medical Science, v.25, p.385-9.

[34] Fournomiti, M.; Kimbaris, A.; Mantzourani, I.; Plessas, S.; Theodoridou, I.; Papaemmanouil, I.; Kapsiotis, I.; Panopoulou, M.; Stavropoulou, E.; Bezirtzoglou, E. E.; Alexopoulos, A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. Microb Ecol Health Dis, 26, 23289. <https://doi:10.3402/mehd.v26.23289>.

[35] Behlau, I.; Gilmore, M. (2008). Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. Archives Ophthalmology, v.126, n.11, p.1572-1581.

[36] Binning, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. (1986). Atomic force microscopy. Physical Review Letters, v.56, p.930–933.

[37] Verbelen, C.; Dupres, V.; Menozzi, F.D.; Raze, D.; Baulard, A. R.; Hols, P.; Dufrêne, Y.F. (2006). Ethambutol-induced alterations in Mycobacterium bovis BCG imaged by atomic force microscopy, FEMS Microbiology, v.264, p. 192–197.

[38] Donsi, F.; Annunziata, M.; Sessa, M.; Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT - Food Science and Technology, v. 44, p.1908–1410.

[39] Liang, R.; Xu, S.; Shoemaker, C. F.; LI, Y.; Zhong, F.; Huang, Q. (2012). Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.60, p.7548–55.

[40] Ziani, K.; Chang, Y.; Mclandborough, L.; Mcclements, D. J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, p.6247–55.

[41] Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Graü, M. A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. Food Control, v.37, p. 292–710.

[42] Giongo, J. L.; Vaucher, R. A.; Ourique, A. F.; Steffler, M. C. R.; Frizzo, C. O.; Henneimann, B.; Santos, R. C. V.; Lopes, L. Q. S.; Rech, V. C.; Nishihira, V. S. K.; Raffin, R. R. P.; Gomes, P. Steppe, M. (2016). Development of nanoemulsion containing pelargonium graveolens oil: characterization and stability study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 12, p. 271-276. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i12.15108>.

[43] Price-Whelan, A.; Dietrich, L. E.; Newman, D.K. (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *The Journal of Bacteriology*, v.189. p. 6372-6381.

[44] Hassani, H. H.; Hasan, H. M.; Al-Saadi, A.; Ali, A. M.; Muhammad, M. H. (2011). A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Experiment Biol*. v. 2, n. 5, p. 1389-1394, 2011.

List tables

Table 1 – Composition of palmarosa oil and thyme oil.

Compounds	IR ^{to}	RI ^b	<i>Cymbopogon</i>	<i>Thymus</i>
			<i>Martini</i> (OP)	<i>vulgaris</i> (OT)
			(%)	(%)
α - thujene	932	931		0.75
α - pinene	937	939		1.62
α -camphene	953	953		1.23
β -pinene	980	980		0.57
β -Myrcene	991	989	1.71	0.34
α - terpinene	1018	1019		1.27
p - Cimene	1026	1027	5.82	20.18
1.8 cineole	1037	1033		0.95
γ - terpinene	1062	1061		1.45
linalool	1098	1099	2.09	1.11
Camphenol	1109	1112	0.65	
camphor	1142	1143		0.18
Borneol	1161	1166		0.71
terpin-4-ol	1179	1177		1.09
α -terpineol	1185	1189		2.43
nerol	1228	1228	1.83	
neral	1240	1141	09.13	
Geraniol	1255	1253	35.27	
thymol	1291	1292		49.27
carvacrol	1298	1296	0.45	11.86
E- Citral	1341	1341	3.17	
thymol acetate	1356	1355		0.09
Geranyl acetate	1383	1380	9.68	
β - Elemene	1391	1388	4.35	
β - Caryophyllene	1418	1419	5.92	2.57
α - humelene	1451	1454		0.39
neryl propanate	1454	1459	1.69	
aromandrene	1461	1460	0.81	
Geranyl propionate	1476	1475		0.08
germacrene D	1483	1480		0.25

valencene	1491	1489	0.36	
(Z)- Nerolidol	1534	1533	1.57	
α -cadidene	1540	1538		0.17
Elemol	1549	1550	0.29	
Geranyl butyrate	1562	1561	1.63	
caryophyllene oxide	1581	1580	2.79	0.41
globulin	1583	1585	0.91	
viridiflorol	1590	1593	1.13	
(E, E)- Farnesol	1722	1725	4.52	
Total identified (%)			99.73	99.97

Table 2: Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thyme and palmarosa oils $\mu\text{g/mL}$.

Microorganisms	Thyme		Palmarosa	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>P. aeruginosa</i> (PA01)	29.01	29.01	22.06	22.06
<i>K. pneumoniae</i> (strain 31)	104.1	104.1	16.0	16.0
<i>K. pneumoniae</i> (strain 36)	349.0	349.0	11.20	11.20

Table 3: Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thymol, eugenol and geraniol oils $\mu\text{g/mL}$.

Majority Constituents						
Microorganisms	Thymol		Eugenol		Geraniol	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>P. aeruginosa</i> (PA01)	29.01	29.01	27.7	27.7	25.3	25.3
<i>K. pneumoniae</i> (strain 31)	104.1	104.1	5.74	5.74	16.5	16.5

<i>K. pneumoniae</i> (strain 36)	349.0	349.0	9.37	9.37	11.60	11.60
----------------------------------	-------	-------	------	------	-------	-------

Table 4- In vitro combinations of essential oils against *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strain 31) and *K. pneumoniae* (strain 36).

Strains	Thyme / Palmarosa	
	CIM	FICI (X)
<i>P. aeruginosa</i> (PA01)	29.01/22.06	0.8 (S)
<i>K. pneumoniae</i> (strain 31)	104.1/16.0	0.7 (S)
<i>K. pneumoniae</i> (strain 36)	349.0/11.20	3.49 (A)

Thyme; Palmarosa; minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ mL}^{-1}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifferent; Ah, antagonism.

Table 5- In vitro combinations of major constituents against *P. aeruginosa* (PA01), *K. pneumoniae* (strain 31) and *K. pneumoniae* (strain 36).

Combinations						
Strains	Thymol / Eugenol		Thymol / Geraniol		Eugenol / Geraniol	
	CIM	FICI (X)	CIM	FICI (X)	CIM	FICI (X)
<i>P. aeruginosa</i> (PA01)	29.01/27.7	0.9 (S)	29.01/25.3	0.9 (S)	27.7/25.3	0.8 (S)
<i>K. pneumoniae</i> (strain 31)	104.1/5.74	0.9 (S)	104.1/16.5	0.8 (S)	5.74/16.5	0.6 (S)

Combinations						
Strains	Thymol / Eugenol		Thymol / Geraniol		Eugenol / Geraniol	
	CIM	FICI (X)	CIM	FICI (X)	CIM	FICI (X)
<i>K. pneumoniae</i> (strain 36)	349.0/8.62	5.0 (A)	349.0/11.20	4.29 (A)	8.62/11.20	0.7 (S)

Thymol; Eugenol ; Geraniol ; minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ mL}^{-1}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifferent; Ah, antagonism.

List Figures

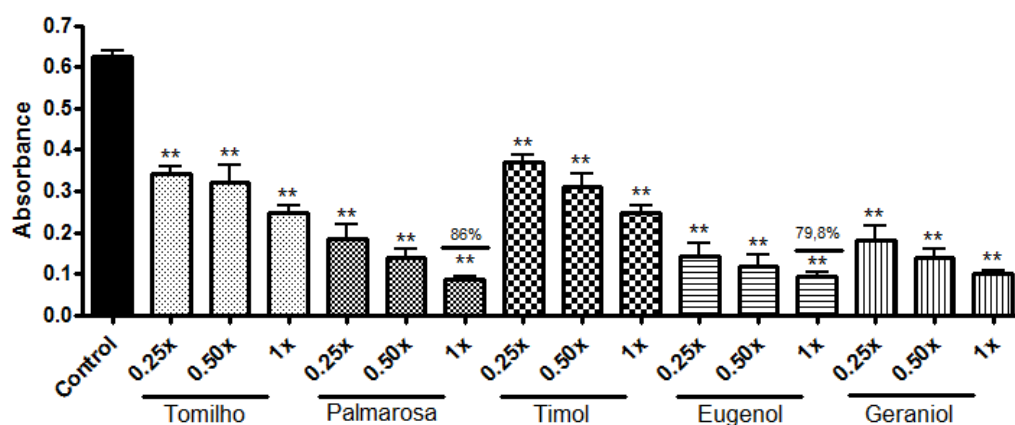


Figure 1: *Klebsiella pneumoniae* (strain 31) biofilm formation indices, after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

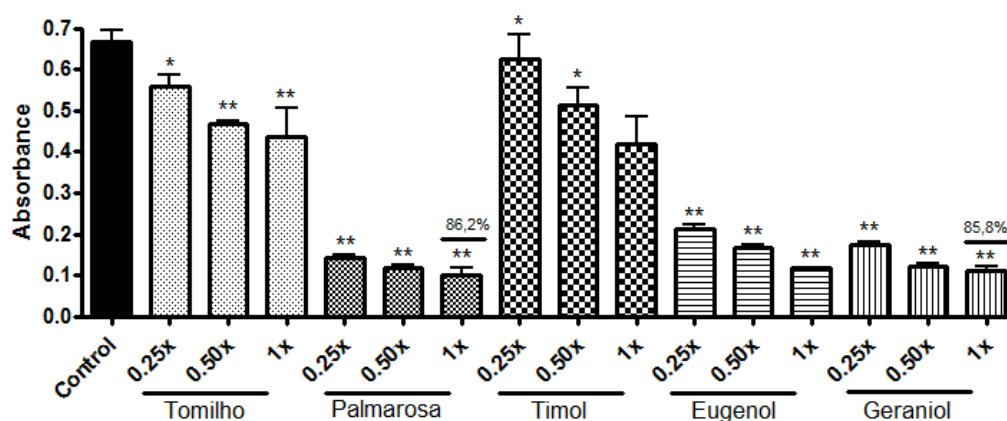


Figure 2: *Klebsiella pneumoniae* (strain 36) biofilm formation indices, after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

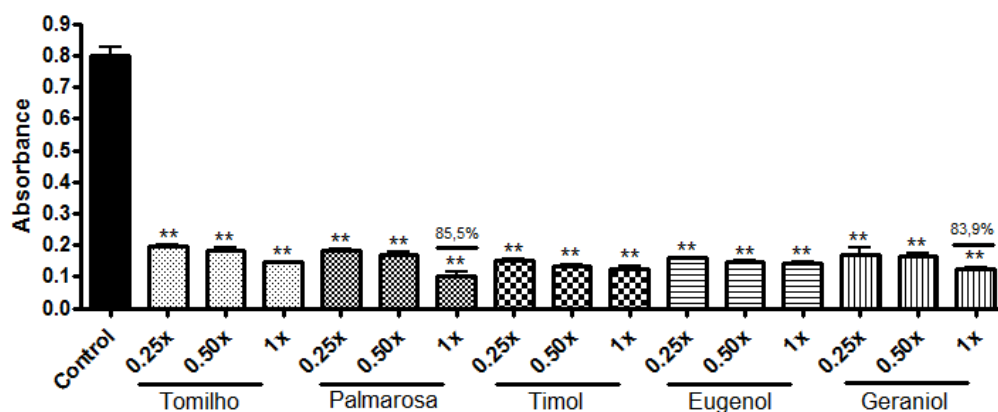


Figure 3: *Pseudomonas aeruginosa* (strain PA01) biofilm formation indices, after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

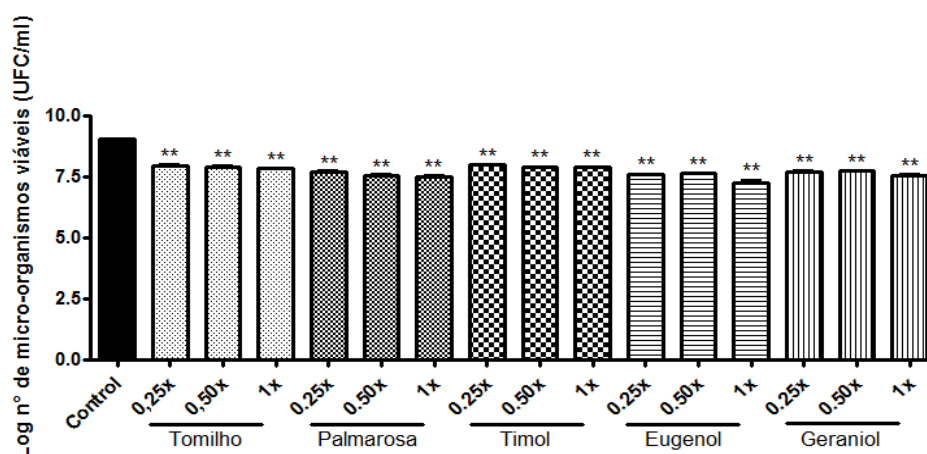


Figure 4: Growth inhibition in *K. pneumoniae* (strain 31) tested against essential oils (thyme and palmarosa) and their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

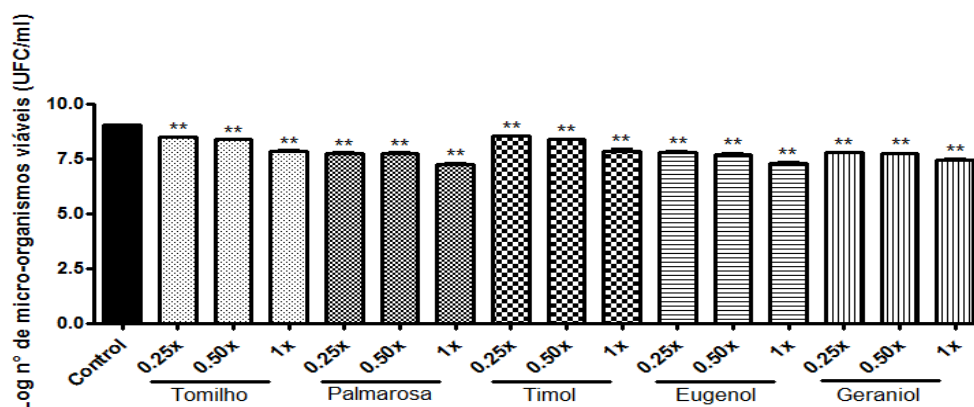


Figure 5: Growth inhibition in *K. pneumoniae* (strain 36) tested against essential oils (thyme and palmarosa) and their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

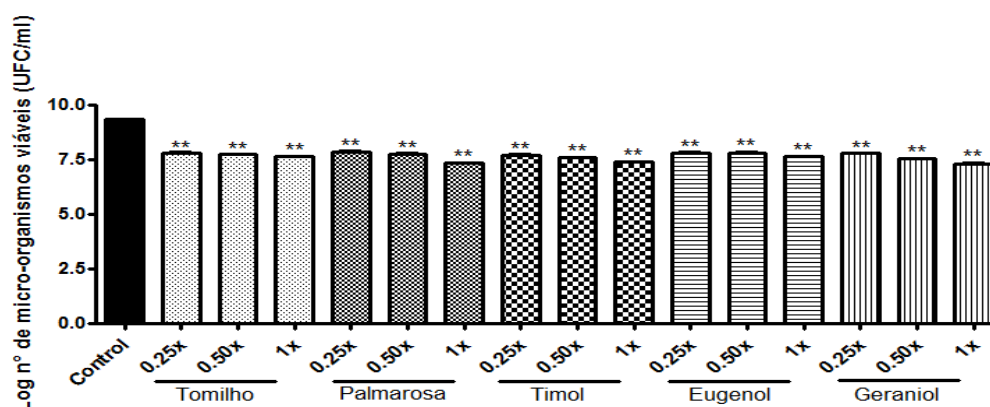


Figure 6: Growth inhibition in *P. aeruginosa* (PA01) tested against essential oils (thyme and palmarosa) and their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

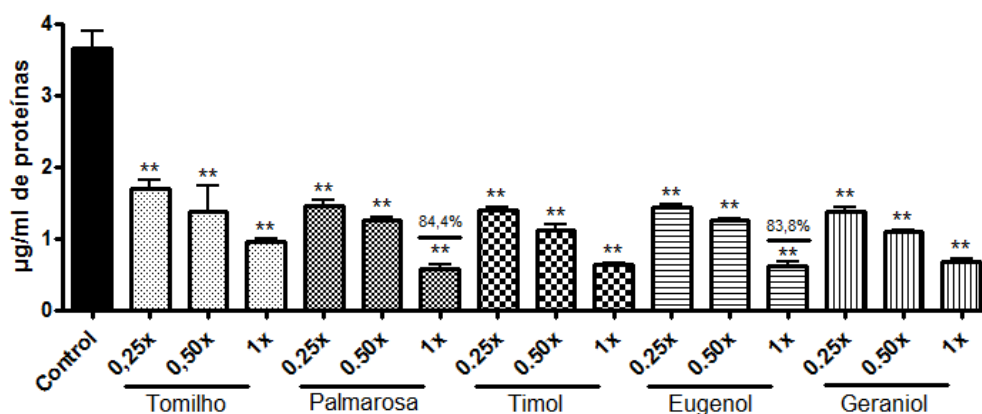


Figure 7: Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford, (1976) in biofilms formed from *K. pneumoniae* (strain 31) after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$. Results are expressed in $\mu\text{g} / \text{mL}$ of protein.

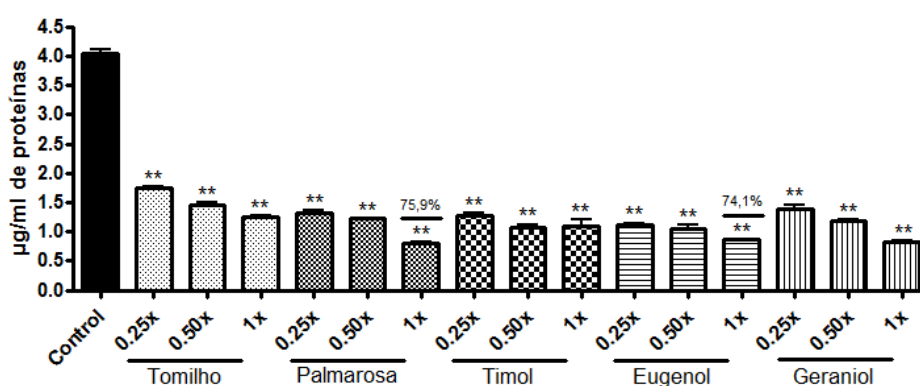


Figure 8: Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford, (1976) in biofilms formed from *K. pneumoniae* (strain 36) after treatment with thyme, palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$. Results are expressed in $\mu\text{g} / \text{mL}$ of protein.

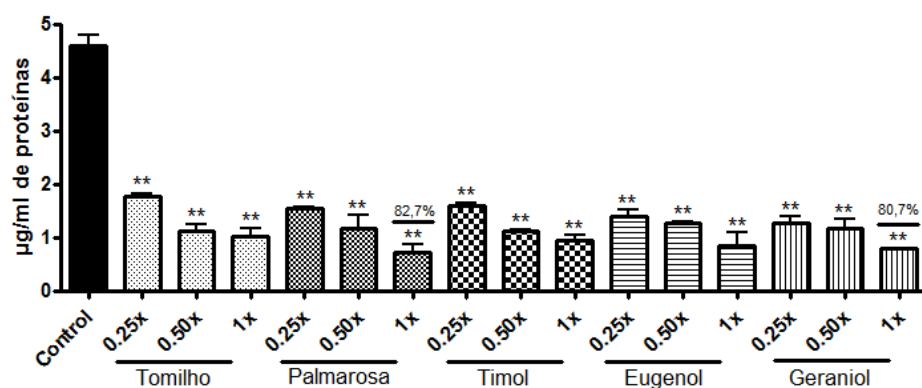


Figure 9: Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford (1976) in biofilms formed from *P. aeruginosa* (PA01) after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$. Results are expressed in $\mu\text{g} / \text{mL}$ of protein.

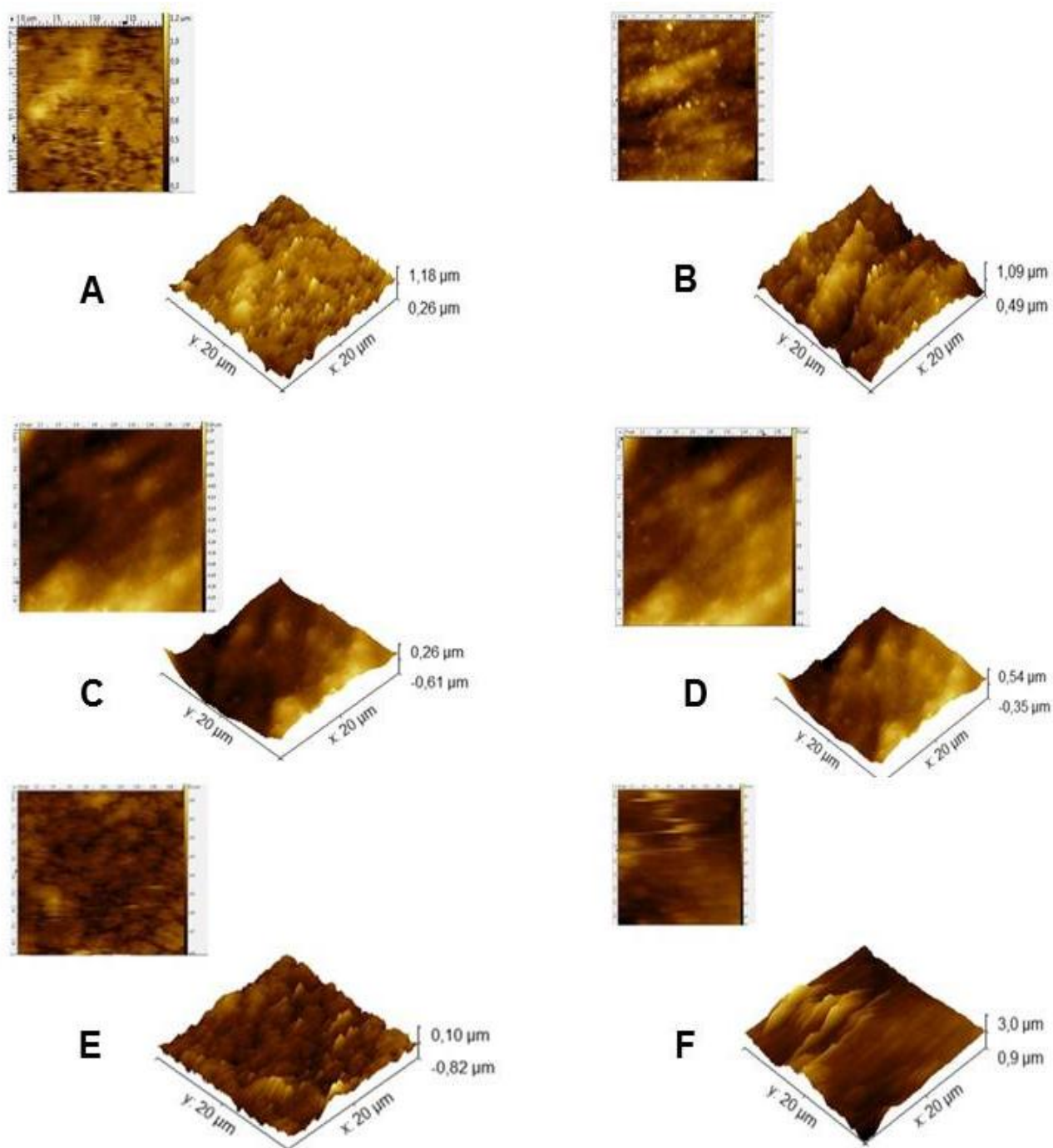


Figure 10: Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by *K. pneumoniae* (strain 31) after treatment with essential oils and major constituents at a concentration of 1x CIM. (A) thyme, (B) thymol, (C) palmarosa, (D) geraniol, (E) eugenol and (F) control.

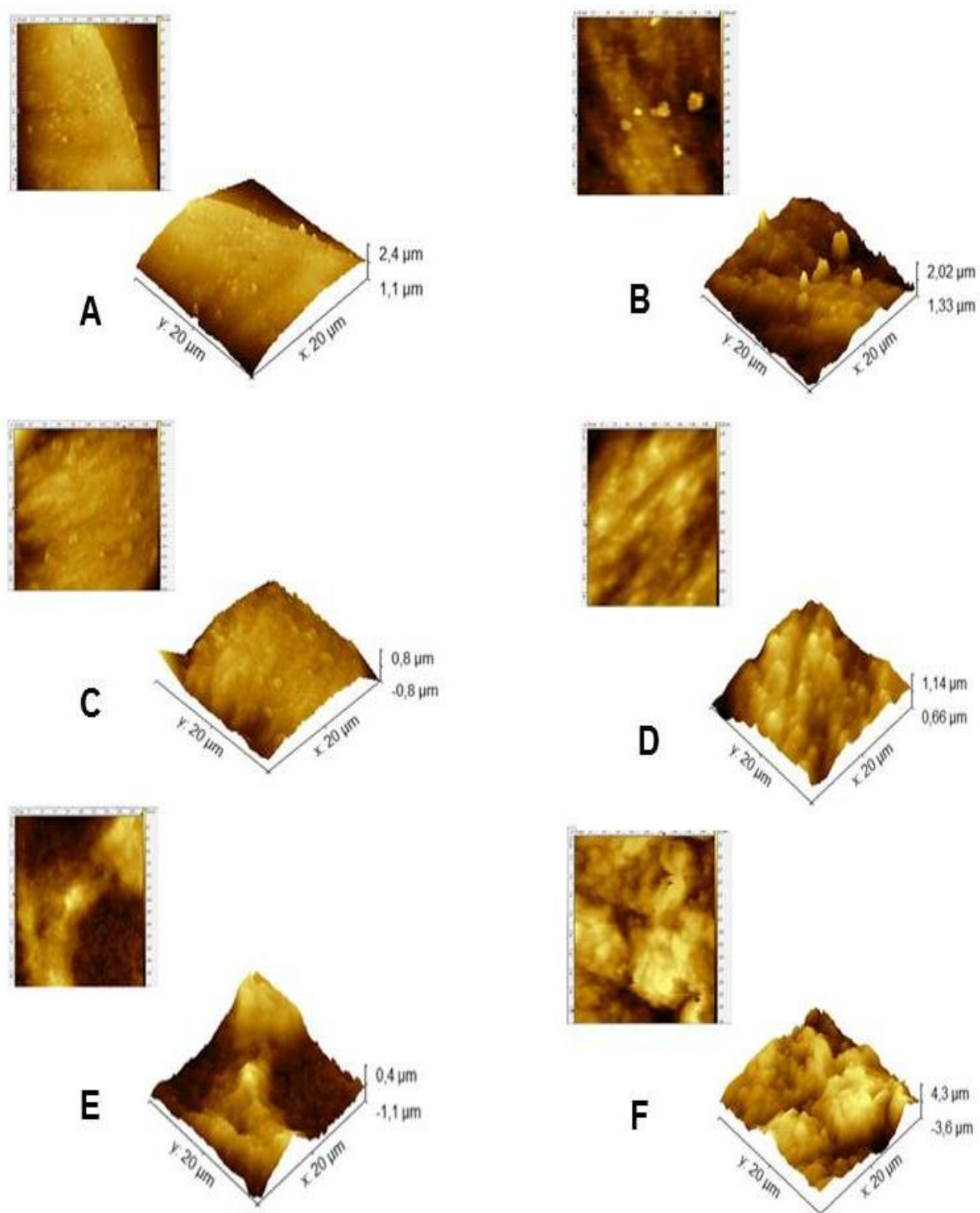


Figure 11: Image obtained through AFA demonstrating the presence of the biofilm formed by *K. pneumoniae* (strain 36) after treatment with essential oils and major constituents at a concentration of 1x CIM. (A) thyme, (B) thymol, (C) palmarosa (D) geraniol, (E) eugenol and (F) control.

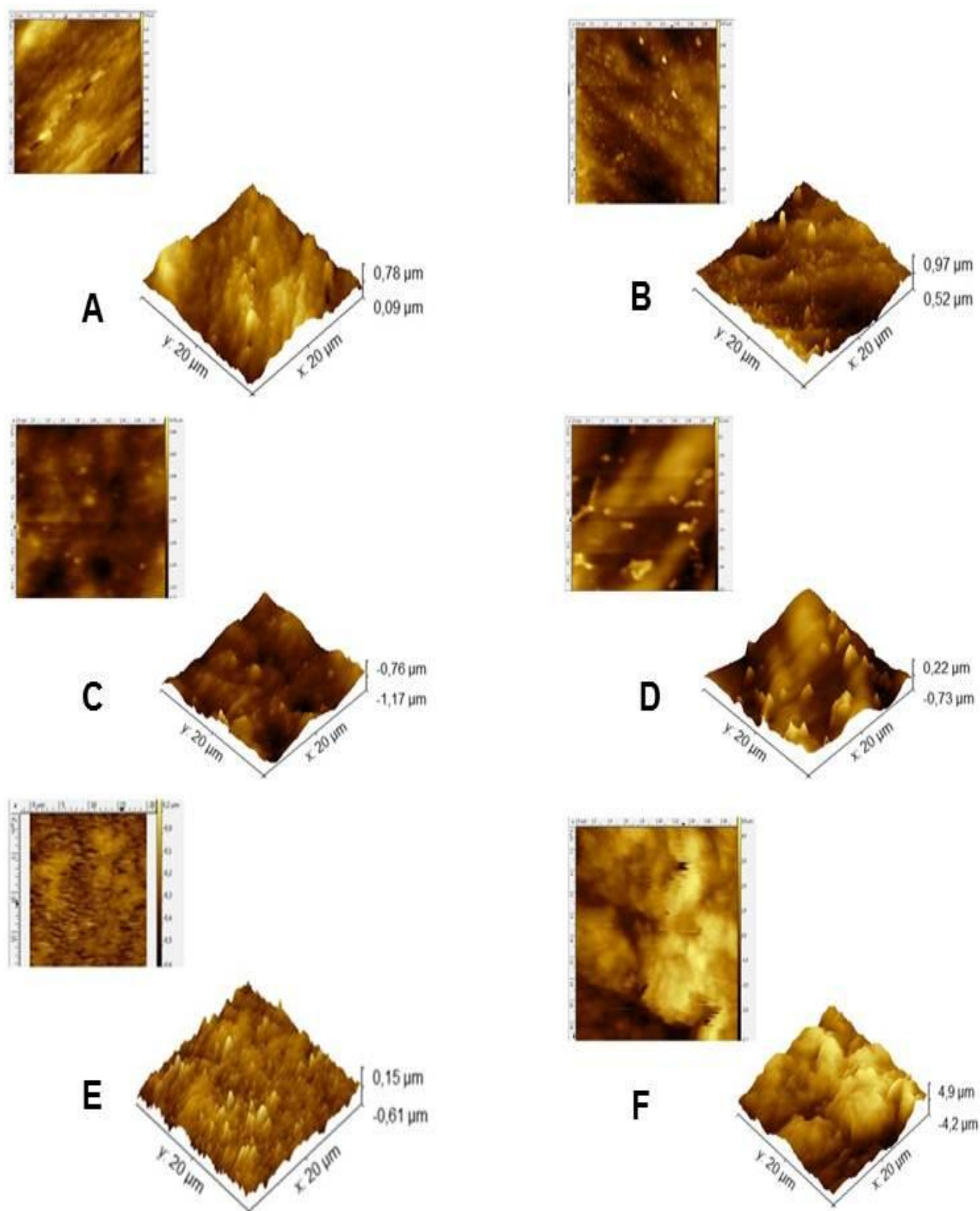


Figure 12: Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by *P. aeruginosa* (PA01) after treatment with essential oils and major constituents at a concentration of 1x CIM. (A) thyme, (B) thymol, (C) palmarosa, (D) geraniol, (E) eugenol and (F) control.

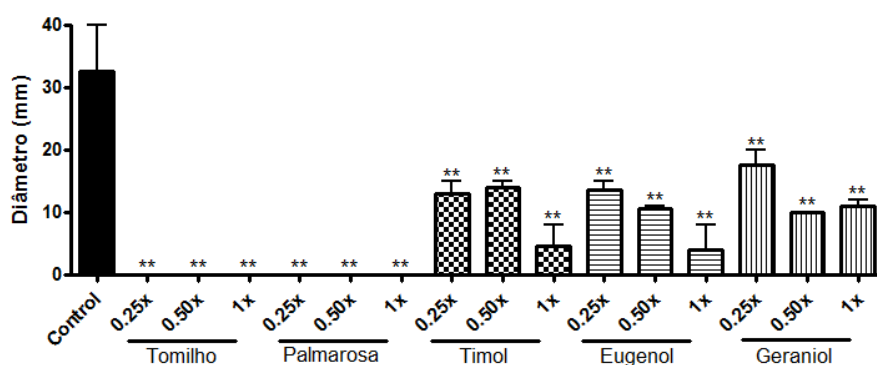


Figure 13: Activity of thyme and palmarosa essential oils and their major constituents thymol eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM in Swimming of *P. aeruginosa* (PA01). Colony diameter in mm. The 5% significance level. ** P < 0.01.

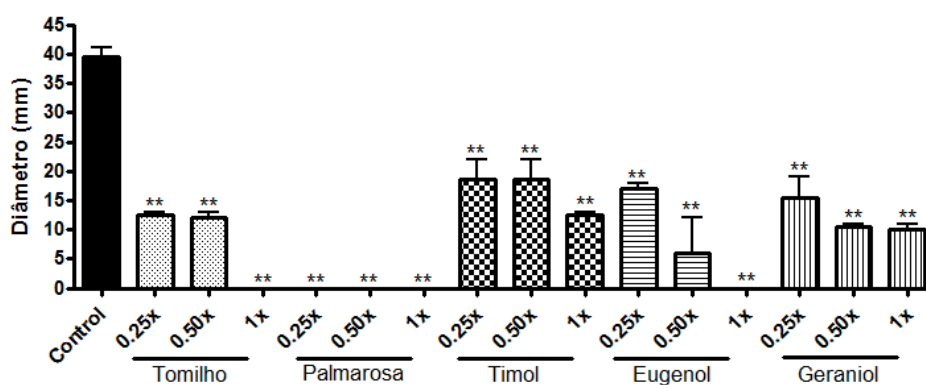


Figure 14: Activity of thyme and palmarosa essential oils and their major constituents thymol eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM in *P. aeruginosa* (PA01) Swarming. Colony diameter in mm. The 5% significance level. ** P < 0.01.

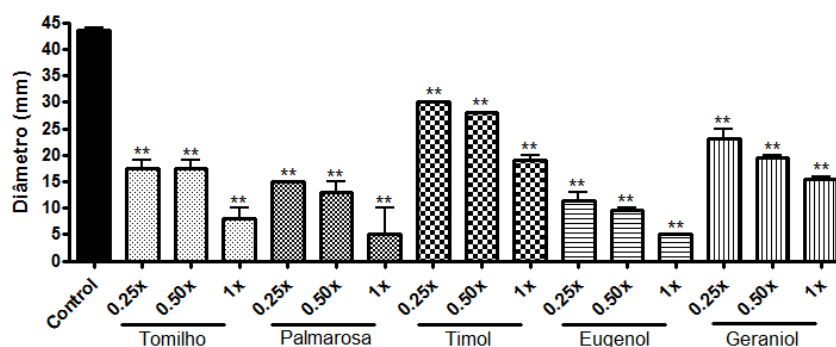


Figure 15: Activity of thyme and palmarosa essential oils and their major constituents thymol eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM in *P. aeruginosa* (PA01) Twitching. Colony diameter in mm. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

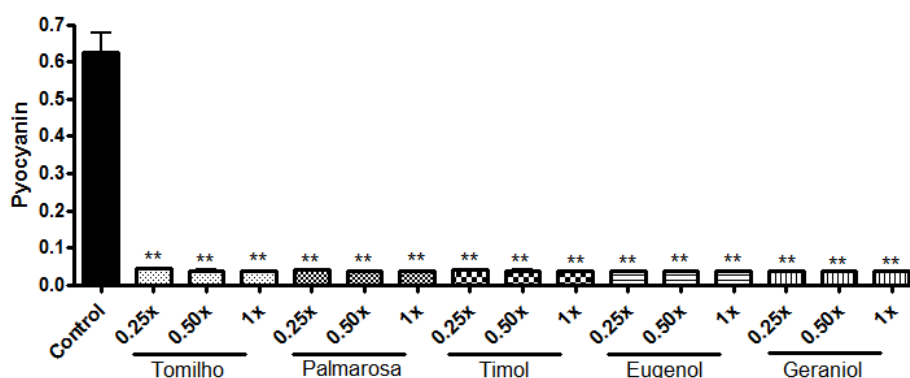


Figure 16: Pyocyanin levels measured in *P. aeruginosa* (PA01) cultures after treatment with thyme and palmarosa essential oils and their major constituents thymol eugenol and geraniol, at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

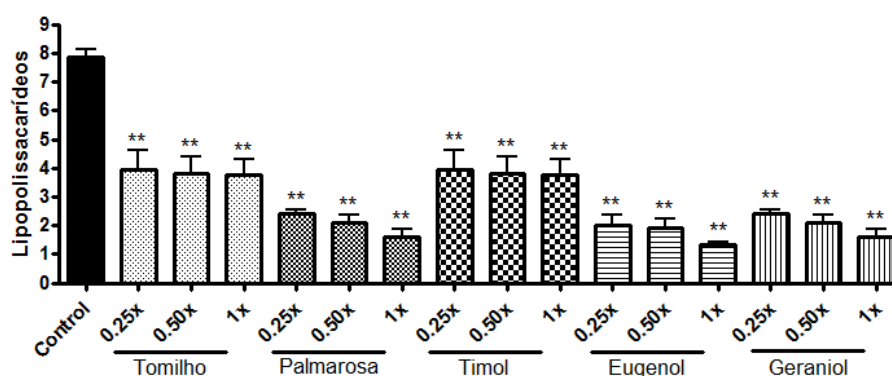


Figure 17: Amount of exopolysaccharide in the *K. pneumoniae* biofilm (strain 31) after treatment with thyme and palmarosa essential oils and their major

constituents thymol eugenol and geraniol, at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

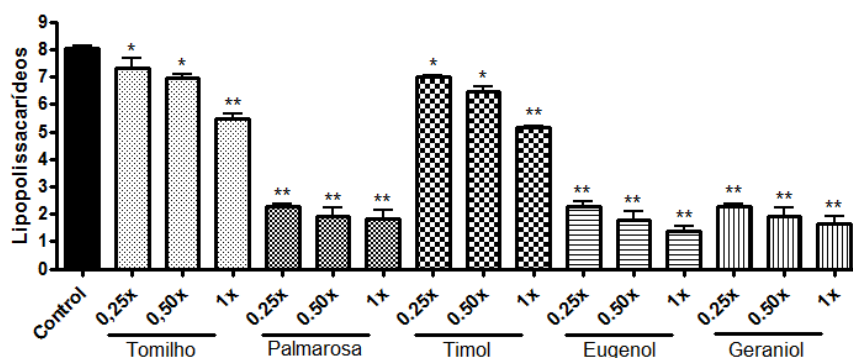


Figure 18: Amount of exopolysaccharide in the *K. pneumoniae* biofilm (strain 36) after treatment with thyme and palmarosa essential oils and their major constituents thymol eugenol and geraniol, at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

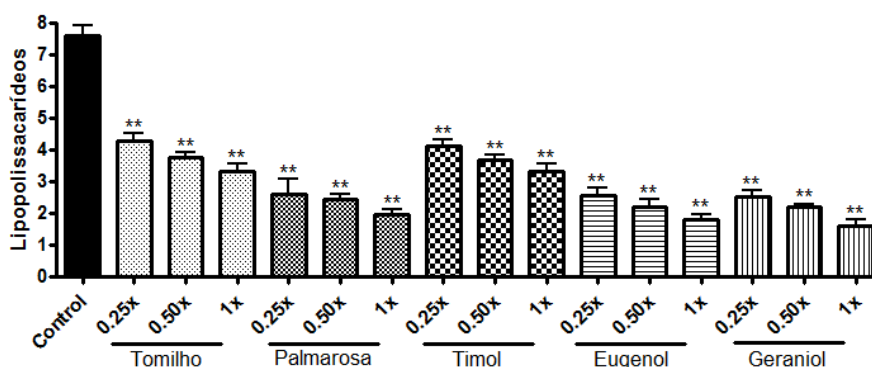


Figure 19: Amount of exopolysaccharide in the *P. aeruginosa* (PA01) biofilm after treatment with thyme and palmarosa essential oils and their major constituents thymol eugenol and geraniol, at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

Capítulo 3

6.1- Manuscrito 2

Antifungal activity of essential oils and major constituents against biofilm formed in hospital medical material

Cristiane Telles Baptista, Vitor Pereira Klein, Andressa de Oliveira Blanke, Rowena Moreira Silveira, Eduarda Braga Fernandes, Tais Poletti, Claudio Martin Pereira de Pereira, Janice Luehring Giongo, Rodrigo de Almeida Vaucher

Artigo que será submetido a Revista Brazilian Journal of Microbiology

Abstract

Biofilm formed by the genus *Candida* is the most frequent cause of catheter-associated infections, possessing a proven resistance to antifungal agents. The use of essential oils has proven to be very effective in controlling biofilm and resistant microorganisms. The objective of this work was to test the antifungal activity of thyme and palmarosa oils and their majority constituents eugenol, thymol, and geraniol against biofilm formed in hospital medical material. The CIM and CIM were evaluated by the microdilution plaque method using strains of *C. albicans*, and *C. glabrata*. The antibiofilm activity after treatment with EO and CMs was evaluated by crystal violet assay, total protein determination, synergism, growth curve, atomic force microscopy, inhibition of germ tube and pseudohyphae formation, and calcofluor staining. From the results of the present study, it was evidenced in all tests that there was a significant decrease in biofilm formation and that EOs and their CMs are promising in controlling biofilm formation.

1. Introduction

The genus *Candida* comprises a group of commensal and opportunistic fungi that can be found in the microbiota of the skin and mucosa of humans. These microorganisms are responsible for a large proportion of opportunistic infections, especially in immunosuppressed individuals. The mortality rate in these situations can reach up to 40% of affected people, with a high influence on human health and the economy (NOBILE; JOHNSON, 2015). Among the factors involved in the pathogenicity of the genus, the high capacity of biofilm formation deserves to be highlighted (MATHÉ; DIJCK, 2013).

Biofilms are life forms composed of sessile populations surrounded by an extracellular polymeric matrix and exhibit characteristics distinct from free-living planktonic growth. Microorganisms associated with biofilm formation exhibit high resistance to antimicrobial agents and host defenses. Strictly speaking, this ability increases up to 1000 times the resistance of microorganisms when compared to their survival in planktonic configuration (COSTERTON et al., 1995).

Biofilm formed by fungi, especially by microorganisms belonging to the genus *Candida*, is the cause of infections associated with medical devices such as probes and catheters. These pathogens are considered the main cause of hospital-acquired infections, and removal of the colonized catheter or catheter is almost always necessary. The biofilm formed under these conditions may lead to the dissemination of pathogens in the bloodstream, which implies in high morbidity and mortality of hospitalized patients (MUKHERJEE et al, 2005).

The increasing number of immunocompromised patients, especially transplanted, raises the level of attention to infections caused by opportunistic pathogenic yeasts. Most of these pathogens are from the genus *Candida* spp. Data indicate that 60% of the yeast species isolated from patients with fungal infections are from the species *C. albicans*, which makes the infection by this microorganism the most prevalent among fungi (FREYDIERE et al., 2001). These infections are particularly serious because the cells organized in biofilm are resistant to antifungal drugs (KUHN et al., 2002; MUKHERJEE et al, 2005; BLANKENSHIP et al., 2006). Antifungal resistance is acquired early in biofilm formation and is controlled by different mechanisms in new and mature biofilms. (MUKHERJEE et al, 2005).

It has been reported that microbial resistance is an increasingly worrisome threat to global public health, necessitating the search for new antimicrobial agents (SILVA et al., 2020). The WHO encourages the use of medicinal plants in traditional medical systems, and research on these plants has increased in the last decade to find possible solutions to combat infectious diseases. (MICKYMARAY et al., 2016).

Over the years, the search for therapeutic alternatives from medicinal plants has been gradually increasing and, therefore, several studies using essential oils extracted from aromatic and medicinal plants have shown their antimicrobial activities, such as the essential oils of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and palmarosa (*Cymbopogon martini*) (SANCHEZ et al., 2010; SCHELZ et al, 2010).

Considering antimicrobial resistance as a problem of great impact on public health, especially in hospitals, a study is necessary to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils and their major constituents, since the therapeutic option for multidrug-resistant strains is quite restricted.

With this, this study aimed to evaluate the antifungal and synergistic activity of thyme and palmarosa essential oils and their major constituents, and their antibiofilm activity on hospital medical material.

2. Materials and Methods

2.1 Sample Collection, Culture, and Fungal Identification

C. albicans and *C. glabrata* samples are ATCC and belong to the mycoteca of the Research Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Federal University of Pelotas (UFPel).

From these samples, the fungal isolates were obtained through cultivation in blood agar and MacConkey culture media and incubated in a microbiological oven at 37⁰ C for 24 hours. After the growth of the colonies, they were introduced into identification as well as antibiogram panels at a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL, standardized by McFarland's turbidity scale and introduced into the BD Phoenix 100 Automated Microbiology equipment for microorganism identification (ID) and antimicrobial susceptibility profile (TSA).

2.2 Characterization of essential oils

The essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martini*) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) were purchased commercially from FERQUIMA Ltda. The major constituents geraniol, eugenol, and thymol were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil). The characterization of the essential oils was carried out at the Federal University of Pelotas (UFPel), in the Chemistry course. The compounds were prepared and analyzed by GC, Varian 3800 Gas Chromatograph equipped with a closed capillary tube silica column (25m × 0.25mm) coated with SE-54. For the analysis the following media were used: He (1mL/min) was used as carrier gas, in the column injector at 200°C, FID 250°C, and column temperature from 60°C to 325°C with 4°C/min. The analyses were performed on an HP 5973-6890, GC/MSD operating system in EI mode at 70 eV, equipped with an HP-5 (30m X 0.25mm) cross-linked capillary column. The column and injector temperatures were the same as for GC.

Identification of the constituents of the essential oils of palmarosa and thyme was based on the retention index (RI), determined regarding the homologous series of n-alkanes, C7-C30, under similar experimental conditions, by comparison with the similar mass from the mass spectra with NBS Library (MASADA, 1976) and by that described by Adams (1995). The relative amounts of the individual components were calculated based on the GC peak area (FID response).

2.3 Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicidal Concentration

The determination of the MIC was performed using the microdilution technique, according to CLSI method M44-A2 (2008). The compounds were prepared at a 1:2 dilution in DMSO 50% in a sterile tube, so that the concentrations of the stock solutions of thymol, eugenol, geraniol, thyme, and palmarosa were 150µg/mL, 533,500µg/mL, 439.00µg/mL,

473.00 μ g/mL and 437,500 μ g/mL, respectively. The compounds were stored at 4°C to minimize volatilization. The assays were performed in 96-well plates, in which 100 μ L of Mueller Hinton broth with 100 μ L of the compounds were added to the first well. From the first well, serial dilution followed until the tenth well of the plate. After serial microdilution, 10 μ L of the 0.5 McFarland scale inoculum (1.5×10^8 CFU/mL) was added to all wells and incubated for 24 hours at 37°C. A negative control containing only the culture medium and a positive control for fungal growth containing the culture medium and 10 μ L of the inoculum were performed. The CIM was defined as the lowest concentration of the compound that inhibited microbial growth and was observed by the turbidity of the culture medium in the wells of the plate. This test was performed in duplicate and the MIC was determined after seeding 1 μ L of the contents of the wells corresponding to 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM on Sabouraud agar and incubated for 24 hours at 37°C for subsequent quantification of the fungal colonies.

2.4 Synergism

The determination of synergism was performed using the microdilution technique in 96-well plates, with one plate for each fungus. The two essential oils and the three major compounds were cross-linked by serial dilution up to 1:256. 100 μ L of Mueller Hinton broth was added to all wells of the plate, with 100 μ L of compound A in the first well, following serial dilution to 1:256. Next, 100 μ L of compound B was added, and cross-linking of the different concentrations of the compounds was performed. Finally, 10 μ L of the fungal inoculum on the 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL) was added to all wells of the plate and incubated for 24 hours at 37°C. A negative control containing only the culture medium and a positive control for bacterial growth containing the culture medium and 10 μ L of the inoculum, was performed. The CIM was defined as the lowest concentration of the compound that inhibited fungal growth and was observed by turbidity of the culture medium in the wells of the plate. This test was performed in duplicate in two independent experiments.

The following mathematical formula was used to analyze the results: Σ FIC (sum of inhibitory concentration fraction) = $FIC_A + FIC_B$, where, FIC_A (fraction of inhibitory concentration of compound A) = CIM_A (combined with compound B) / CIM_A (alone) and FIC_B (fraction of inhibitory concentration of compound B) = CIM_B (combined with compound A) / CIM_B (alone). Considering synergistic effect when Σ FIC $\leq$ 0.5; additive

when $\Sigma\text{FIC} > 5$ and ≤ 1 ; indifferent if $\Sigma\text{FIC} > 1$ and < 2 and antagonism if $\Sigma\text{FIC} > 2$ (RONDEVALDOVA et al., 2015).

2.5 Preparation of hospital medical material

The most commonly used materials in the composition of the probes are polytetrafluoroethylene (PTFE), polyurethane, silicone, polyamide, and polyester, and the most flexible and kink-resistant catheters are the least associated with infectious events. For the experimental trials, hospital urethral catheters were used. This material was cut into a length of two centimeters and arranged two per test tube with a screw cap. This material was sterilized for later use.

2.6 Antibiofilm testing on medical hospital supplies

C. albicans and *C. glabrata* strain from the mycoteca of the Research Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Federal University of Pelotas (UFPel) were used. The samples were inoculated on Sabouraud agar without glucose (0%) and incubated at 37°C for 24 hours and transferred to BHI broth. Then, aliquots of the cultures were added to the BHI broth with the same glucose concentration until reaching MacFarland's 0.5 scales. Subsequently, 3 mL of BHI broth was added to each everything containing the hospital medical material, along with 150µL of inoculum of each microorganism suspension, and the majority of oils and/or constituents were added at concentrations corresponding to 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM, to test their effectiveness in inhibiting biofilm formation. The negative controls were tubes with uninoculated BHI broth. The positive controls, on the other hand, contained only inoculum and BHI broth. The tubes were incubated at 37°C for 48 hours (SANDBERG et al., 2008 with adaptations).

2.7 Quantification of biofilm formation through crystal violet staining

After the time had elapsed, the microorganism suspension was aspirated and a probe was removed from each tube, which was reserved for later protein quantification and colony counting. The probe that remained in the tube was washed 3 times with 2mL of sterile 0.9% saline solution and then transferred to another sterile tube. The biofilm was then fixed in an oven at 60°C for 60 minutes. The tubes were stained with 2mL of 1% Hucker's crystal violet solution for 15 minutes, washed 5 times with sterile 0.9% saline solution, and then 2mL of 95% ethanol was added for 10 minutes. Then 200µL of each

tube was transferred in triplicate to 96-well plates and the absorbance was read in a microplate reader (Rosys Anthos 2010) at a wavelength of 492nm (TOMARAS et al., 2003 with adaptations).

2.8 Counting viable colonies in the biofilm

These assays were performed from the antibiofilm technique (2.6). After the incubation time (48 hours) at 37°C, the tubes containing two probes were removed from the incubator and one probe of each was washed 3 times with 2mL of sterile 0.9% saline solution. Then, with the help of a needle with a syringe containing 1 mL of saline solution the probes were scraped. With the help of a 1µL calibrated loop, this liquid was sowed with the scraped in Sabouraud agar and incubated for 24 hours at 37°C for colony quantification. For the validation of the assay, a negative control (culture medium only) and a positive control (culture medium and microorganism) were used (BALOUIRI, SADIKI, and IBNSOUDA, 2016).

After incubation, the colonies were counted manually and the numbers obtained were multiplied by 1,000,000 to find the number of CFU/mL. These values were transformed into a logarithmic scale for the creation of time-to-death graphs. A reduction in the number of CFU from the initial count by $\geq 3 \log_{10}$ was defined as a fungicidal effect.

2.9 Determination of biofilm proteins

The protein concentration of the samples was determined using the method first described by Bradford (1976) with an adaptation of the technique (ZOR and SELINGER, 1996). For this assay, the commercially purchased Bradford reagent was used and a standard curve with bovine albumin (BSA) (Sigma) was performed at concentrations from zero to 74µg/mL. All samples were analyzed by COBAS. The concentration of the samples was determined by comparison with the BSA standard curve, plotted and analyzed by linear regression in a GraphPad Prism Version 6.0 curve analysis program.

2.10 Atomic force microscopy

Atomic force microscopy (AFM) was performed at the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Bagé campus, under the supervision of Professor Dr. André Gündel. For visualization of the biofilm by AFM, the substrates were fixed with absolute methanol for 1 minute. Images were obtained using an Agilent Technologies 5500 microscope (CHATTERJEE et al., 2014).

2.11 Calcofluor white assay

This technique was performed according to Chandra and collaborators (2001), with modifications. After the biofilm inhibition test, the probes were washed 3 times with 2mL of sterile 0.9% saline solution and then immersed in calcofluor for 30 minutes. After this time, using a syringe with a needle, the probes were scraped and washed with 500µL of sterile 0.9% saline solution. This material was transferred in duplicate to a white 96-well luminescence plate to be read in an inflorescence reader with excitation and emission wavelengths of 360/440nm, respectively.

2.12 Inhibition of germ tubes and pseudohyphae

The germ tube test is currently accepted as reliable for the identification of *Candida albicans*. It is a test that quickly and presumptively characterizes yeasts of the genus *Candida*. The presence of the germ tube in two or even three hours is important for the identification of the species *albicans*, and the other species can also form, but after this period of time. The germ tube should not be confused with pseudohyphae, because the tubes do not form constriction at the point of attachment to the daughter cell, while pseudohyphae can be septate and have constriction.

The technique was performed using a platinum loop, seeding a small amount of fresh, pure culture of the yeast in an eppendorf with 0.5mL of human serum and incubating at 37°C for a maximum of 3 hours. After 2 hours, 10µL of the serum was collected and analyzed under a microscope between the slide and coverslip. *Candida albicans* are able to form the germ tube within 3 hours. To test the inhibitory activity of the majority of oils and constituents on germ tube and pseudohyphae formation, concentrations equivalent to 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM of each compound were added to the serum. Positive control was performed using only serum to visualize these structures (TASCHDJIAN et al., 1959).

2.13 Statistical Analysis

For the trials the analyses were performed by 1-way ANOVA, followed by Dunnett's test. The significance level was set at 5%. The graphs were performed in GraphPad Prism software (Graphpad Software, INC).

3 Results and discussion

3.1 Characterization of essential oils

The results of the chemical analyzes of PO and TO are presented in **(Table 1)**. The following major compounds for palmarosa were identified: geraniol (35.27%), neral (13.09%) and geranyl acetate (9.68%). Thyme presented as major compounds: thymol (49.27%), p- cyme (20.18%) and carvacrol (11.86%).

3.2 Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration

The CIM of the essential oils as well as their major constituents are shown in Tables 2 and 3. The CIMs of thyme and palmarosa oils against *C. albicans* and *C. glabrata* were 25.7 µg/mL and 39.8 µg/mL, respectively **(Table 2)**.

The CIM of the major constituents thymol, eugenol, and geraniol against *C. albicans* was 27.1 µg/mL, 34.4 µg/mL, and 41.2 µg/mL. For *C. glabrata* it was 25.7 µg/mL, 34.4 µg/mL and 41.2 µg/mL **(Table 3)**.

3.3 Synergism

The checkboard results for thyme and palmarosa essential oils are described in **Table 4**, and it is evident that there was synergism in all tested combinations against *C. albicans* and *C. glabrata*.

The *checkboard* results for the major constituents described in **(Table 5)** show that there was synergism in all combinations tested against *C. albicans* and *C. glabrata*.

The study of the interaction of essential oils and their major constituents isolated or associated with each other or with antimicrobial drugs has been studied by several researchers, presenting many satisfactory results.

Antibiotics have been studied by several researchers and have a number of satisfactory Results. In a study conducted by Silva et al. (2011) showed that A combination of coriander essential oils, of which geraniol is one of its constituents, Shows strong synergy with amphotericin B against two strains of *C. albicans* (ATCC 90028 and ATCC 24433) with Fractional Inhibitory Concentration Index (FVI) are equal to 0.375 and 0.185, respectively. Considering that amphotericin B is very Nephrotoxic, and some *Candida* species have shown resistance to this antifungal, These results show the importance of using associations, because combining Possibly reducing the concentration of amphotericin B inhibits both growths *Candida albicans* strains.

Pyun & Shin (2006) combined Allium essential oil with ketoconazole against *Trichophyton* species and found strong synergistic activity against *Trichophyton rubrum*, *T. erinacei*, *T. soudanense* species with ICIF equal to 0.12, 0.09, 0.09, respectively. When combined with intravenous amphotericin B, geranium essential oil showed synergistic activity against *Candida* (ROSATO et al., 2008).

Sade et al. (2010) reported synergistic activity when *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils were combined with amphotericin B and fluconazole against *C. albicans* strains.

In another study demonstrating synergistic activity between the combined substances, Amber et al. (2010) found a synergistic effect when basil 37 essential oil was associated with fluconazole and ketoconazole against strains of different *Candida* species.

3.2 Quantification of biofilm formation by crystal violet staining

The anti-biofilm activity for the different species tested showed that all were sensitive to the compounds used at their concentrations (0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM).

For *Candida albicans* (**Figure 1**), all oils, as well as their majority constituents, showed a reduction in biofilm formation at all concentrations. However, the ones with the best results were palmarosa and eugenol, both at 1x CIM concentrations (39.8µg/mL and 34.4µg/mL) and resulted in a reduction of 84.6% and 85.2% respectively.

For *Candida glabrata* (**Figure 2**), all oils, as well as their majority constituents, also showed a reduction in biofilm formation at all concentrations. However, the ones with the best results were palmarosa and eugenol, both at 1x CIM concentrations (39.8µg/mL and 34.4µg/mL) and resulted in a reduction of 85% and 84.6% respectively.

Previous studies by Kozics and colleagues (2019), demonstrated the antimicrobial activity of ten essential oils - oregano, thyme, clove, arborvitae, cassia, lemongrass, melaleuca, eucalyptus, lavender, and sage - against resistant microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, and *Klebsiella pneumoniae*) and two resistant yeasts (*Candida albicans* and *Candida parapsilosis*). The results showed that these essential oils are effective in preventing the growth of resistant microorganisms. And it emphasizes that thyme oil showed good results for all strains tested, including *C. albicans*.

Mohsenipour et al., (2015), also tested the effect of thyme extracts on the planktonic form and biofilm structures of *Candida albicans*. The results found by the authors suggest that thyme extracts can be applied as antimicrobial agents against the fungus, particularly on the biofilms formed.

With this, in the present study, we obtained results that corroborate the findings of Kozics and colleagues (2019) and Mohsenipour et al., (2015). However, although thyme oil showed a very good antibiofilm effect, the oil that showed the best reduction in biofilm was palmarosa oil, followed by the majority constituent eugenol.

3.3 Count of viable colonies in the biofilm

In the growth curve assays, we evaluated the antimicrobial activity of the oils and their majority constituents against the growth of the microorganisms tested at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM for *C. albicans* and *C. glabrata* for 48 hours, and once again the decrease in the number of viable colonies after the treatments is evident (**Figure 3 and 4**).

3.4 Determination of biofilm proteins

The present study determined the number of proteins present in the biofilm after exposure to different concentrations (0.25x CIM, 0.50x CIM, 1x CIM) of the oils and major constituents. As can be seen in **Figures 5 and 6** the number of proteins was reduced in the presence of the oils and the major constituents at the concentrations tested. For *C. albicans* the oil that stood out was palmarosa followed by its major constituent geraniol, with a reduction of 61.7% and 60.4% respectively. For *C. glabrata*, palmarosa oil and geraniol were also the compounds that stood out with 79.0% and 71.3% reduction, respectively.

This was an expected result because through the crystal violet technique it was already possible to visualize a decrease in the amplitude of the biofilm, as well as in the count of viable colonies.

3.5 Atomic Force Microscopy (AFM)

In the present study, a highly sensitive technique was used to visualize the reduction of biofilms of *Candida* species after treatment with the essential oils and their major constituents as shown in **Figures 7 and 8**.

The substrates were submitted to Atomic Force Microscopy, which is one of the most effective tools to analyze the structures and properties present in biological samples, being one of the few techniques that allow the observation of these samples in aqueous solutions with a nanometric resolution (BINNING; QUATE; GERBER, 1986; VERBELEN et al., 2006).

Figures 7 and 8 show the presence of the biofilm formed by *C. albicans* and *C. glabrata*, as well as the activity of the essential oils and their major constituents. When comparing the positive control with the other groups, an evident decrease in the biofilm can be observed, corroborating once again the efficacy of the oils and the majority of constituents tested.

With the AFM technique, it was possible to more truly evaluate the antibiofilm activity of the different groups tested, confirming the essential oils and their major constituents have activity for both *C. albicans* and *C. glabrata*. Several works evidence the activity of essential oils using AFM (DONSI et al., 2011; LIANG et al., 2012; ZIANI et al., 2011; SALVIA-TRUJILLO et al., 2014; GIONGO et al., 2016).

3.6 Staining by calcofluor

Calcofluor is a substance that fluoresces the extracellular matrix with a polysaccharide component. To perform the absorbance quantification an inflorescence reader was used with excitation and emission wavelengths of 360/440 nm respectively. This dye is used as an adjuvant to crystal violet dyeing. From this staining, **Figures 9 and 10** were generated. These figures corroborate the results obtained by quantifying the biofilm formed by the crystal violet technique, where the reduction of biofilm formation in the presence of essential oils (thyme and palmarosa) and their major constituents (thymol, eugenol, and geraniol) at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM are demonstrated.

Using this technique, we can observe biofilm formation in the controls for both *Candida* species. We observed a reduction of these biofilms when treated with the essential oils and major constituents compared to the control, confirming the antibiofilm activity. Kuhn et al. in (2002) used this same staining technique with calcofluor white to visualize biofilms of different *Candida* species, but with blue staining. The results obtained in this study showed dense biofilms, similar to what we observed in our work, and confirmed that *C. albicans* produced more biofilms compared to other species such as *C. glabrata* and *C. tropicalis*.

3.7 Inhibition of the germ tube and pseudohyphae

The results of the action of essential oils and majority constituents in the formation of germ tubes and pseudohyphae of *C. albicans* are shown in **Figures 11 and 12**, respectively. As can be observed, the essential oils and majority constituents showed significant inhibition in the formation of germ tubes and pseudohyphae at the tested concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM, and 1x CIM.

The results showed that as the concentration of AMB increased, it was possible to observe a reduction in the formation of the germ tube, as well as the pseudohyphae.

Many studies have been conducted to evaluate the inhibition of germ tube formation. Bernardes et al. (2011) demonstrated that the 10% crude extract (equivalent to 100,000 µg/mL) of *Aloe vera* leaves reduces the formation of germ tube *C. albicans* cells by about 95%. On the other hand, Gauch et al. (2014) show that with 4% (equivalent to 40,000 µg/mL) of *R. officinalis* essential oil, germ tube formation was entirely inhibited. HSU and colleagues (2013) investigated the effects of linalool on germ tube formation of *C. albicans*, which was inhibited by at least 50% compared to the control at a concentration of 1/8 of the CIM and the inhibitory effect was dose-dependent. Antifungal agents that target the yeast cell wall are of great importance in the treatment of candidiasis because they have reduced toxicity to the host (NAICKER; PATEL, 2013).

4 Conclusion

The inhibition of biofilm formation after treatments using thyme and palmarosa essential oils, as well as their major constituents thymol, eugenol, and geraniol was significantly evidenced in all tests performed. These results suggest that the tested oils and their main constituents have the potential as promising antifungal agents.

Competing Interests

The authors declare no competing financial interests.

Funding

Current research was funded by Foundation of Amparo Research of Rio Grande do Sul (FAPERGS) [17/2551-0001078-7].

Acknowledgments

Thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Federal University of Pelotas for supporting the scholarships to students.

References

NOBILE, CLARISSA J.; JOHNSON, ALEXANDER D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol.**; 69:71-92, 2015. Doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.

MATHÉ, LOTTE, DIJCK, PATRICK VAN. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Curr Genet.** Nov;59(4):251-64, 2013. Doi: 10.1007/s00294-013-0400-3. Epub 2013 Aug 25.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H M. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol.** 49:711-45, 1995. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

MUKHERJEE, PRANAB K.; ZHOU GUANGYIN; MUNYON RYAN; GHANNOUM MAHMOUD A. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. **Med Mycol.** May;43(3):191-208, 2005. doi: 10.1080/13693780500107554.

FREYDIERE AM, GUINET R, BOIRON P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Med Mycol.** Feb; 39(1):9-33, 2001. doi: 10.1080/mmy.39.1.9.33. PMID: 11270413.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S.; JEROEN, C.; EDITH LENCHES, CHRISTOPHER T JONES, SUCHETANA MUKHOPADHYAY, PAUL R CHIPMAN, ELLEN G STRAUSS, TIMOTHY S BAKER, JAMES H STRAUSS. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization,

maturation, and fusion. **Cell**. Mar 8;108(5):717-25, 2002. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00660-8.

BLANKENSHIP J.T.; BACKOVIC S.; SANNY J.S.P.; WEITZ O.; ZALLEN J.A. Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. **Dev. Cell**. 2006; 11: 459-470

SILVA, R. A. DA, OLIVEIRA, B. N. L. DE, SILVA, L. P. A. DA, OLIVEIRA, M. A., & CHAVES, G. C. Resistência a Antimicrobianos: A formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, 44(126), 607–623, 2020.

MICKYMARAY, S.; ABOODY, M. S.; RATH, P. K.; ANNAMALAI, P.; NOORUDDIN, T. Screening and antibacterial efficacy of selected Indian medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Volume 6, Issue 3, Pages 185-191, March 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.005>

SÁNCHEZ, A.A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.585-590, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x/abstract>>. Acesso em: 20 set. 2022. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x

SCHELZ, Z. M. J., HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. **Phytotherapy**. 77, 279-285, 2010.

MASADA, Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. New York (N.Y.) : Wiley, 1976.

ADAMS, J. The Precautionary Principle. First published: December 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0270.1995.tb00504.x>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

RONDEVALDOVA, J.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Efeito antimicrobiano combinatório in vitro de plumbagina com oxacilina e tetraciclina contra *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa em fitoterapia**, 29.1, 2015: 144-147. <https://doi.org/10.1002/ptr.5237>

SANDBERG, M.; MAATTANEN, A.; PELTONEN, J.; VUORELA, P. M.; FALLARERO, A. Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilm: an approach to careening of natural antimicrobial compounds. **Int. J. Antimicrob. Agentes**. V. 32, 2008.

TOMARAS, A. P.; DORSEY, C. W.; EDELMANN, R. E.; ATIS, L. A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**. Dec, 149, p. 3473-84, pt. 12, 2003.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, p.71–79, 2016.

BRADFORD, M. M.; Anal. **Biochem.**, v.72, p.248, 1976.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. **Analytical Biochemistry**. v.236, n.171, p.302-308, 1996.

CHATTERJEE, S.; BISWAS, N.; DATTA, A.; DEY, R.; MAITI, P. Atomic force microscopy in biofilm study. **Microscopy**, v. 63, p. 269 – 278, 2014

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5385–5394, 2001.

TASCHDJIAN, C. L.; KOZINN, P. J.; TONI, E. F. Opportunistic yeast infections, with special reference to candidiasis. Ann NY Acad Sci 174: 606-622, 1970

KOZICS, K.; BUČKOVÁ, M.; PUŠKÁROVÁ, A.; KALÁSZOVÁ, V.; CABICAROVÁ, T.; PANGALLO, D. The Effect of Ten Essential Oils on Various Drug-Resistant Skin Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. **Molecules**. Dec; 24(24): 4570, 2019. <https://doi:10.3390/molecules24244570>.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24179 cases from a prospective nation wide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v.3, p.309–317, 2004.

MORRELL, M.; FRASER, J.; KOLLEF, M. H. Delaying the Empiric Treatment of Candida Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. **Antimicrob Agents Chemother.** v.9, p.3640–3645, 2005.

FLEVARI, A.; THEODORAKOPOULOU, M.; VELEGRAKI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v.8, p.1199–1208, 2013.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Clinical Therapeutics and Risk Management**, v.10, p.95–105, 2014.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiol.** 2011 May;19(5):241-7. doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003. Epub 2011 Mar 15. PMID: 21411325.

ROSATO, A.; VITALI, C.; DE LAURENTIS, N.; ARMENISE, D.; ANTONIETTA MILILLO, M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine.** Nov;14(11):727-32, 2007. doi: 10.1016/j.phymed.2007.01.005. Epub 2007 Feb 15. PMID: 17303397.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALENZANO, L. and MALLAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, vol. 15, no. 8, pp. 635-638, 2008. PMID:18579358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2008.05.001>.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N. E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine.** 2010 Nov;17(13):1057-60. doi: 10.1016/j.phymed.2010.03.020. PMID: 20554185.

AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHA, T. M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine.** Oct;17(12):921-5, 2010. doi: 10.1016/j.phymed.2010.02.012. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20378320.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L. Study of the interference of essential oils on the activity of some antibiotic used clinically. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(1):77-82, March 2006.

MOHSENIPOUR Z, HASSANSHAHIAN M. The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. **Avicenna J Phytomed**. Jul-Aug;5(4):309-18, 2015. PMID: 26442753; PMCID: PMC4587606.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L.M.; BARRETT, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, E.H. Adesão de estafilococos coagulase-negativo em placas de cultura de tecidos de plástico: Um modelo quantitativo para a adesão dos estafilococos aos dispositivos médicos. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, p. 996-1006, 1985.

PANTANELLA, F.; VALENTI, P.; NATALIZI, T.; PASSERI, D.; BERLUTTI, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Ann Ig**. v. 25, p.31-42, 2013.

UPPULURI P, PIERCE CG, THOMAS DP, BUBECK SS, SAVILLE SP, LOPEZ-RIBOT JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. **Eukaryot Cell**. 9:1531–1537, 2009.

SOUZA, R.C.; JUNQUEIRA, J.C.; ROSSONI, R.D.; PEREIRA, C.A.; MUNIN, E.; JORGE, A.O. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v.25, p.385-9, 2010.

FOURNOMITI, M.; KIMBARIS, A.; MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; THEODORIDOU, I.; PAPAEMMANOUIL, I.; KAPSIOTIS, I.; PANOPOULOU, M.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. E.; ALEXOPOULOS, A. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. **Microb Ecol Health Dis**, 26, 23289, 2015. <https://doi:10.3402/mehd.v26.23289>.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Arch Ophthalmol**. Nov;126(11):1572-81, 2008. doi: 10.1001/archophth.126.11.1572. PMID: 19001227.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. **Anal Biochem**. May 1;236(2):302-8, 1996. doi: 10.1006/abio.1996.0171. PMID: 8660509.

BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscopy. **Physical Review Letters**, v.56, p.930–933, 1986.

VERBELEN, C.; DUPRES, V.; MENOZZI, F.D.; RAZE, D.; BAULARD, A. R.; HOLS, P.; DUFRÊNE, Y.F. Ethambutol-induced alterations in *Mycobacterium bovis* BCG imaged by atomic force microscopy, **FEMS Microbiology**, v.264, p. 192–197, 2006.

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p.1908–1410, 2011.

LIANG, R.; XU, S.; SHOEMAKER, C. F.; LI, Y.; ZHONG, F.; HUANG, Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.7548–55, 2012.

ZIANI, K.; CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.6247–55, 2011.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. **Food Control**, v.37, p. 292–710, 2014.

KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1773–1780, 2002.

BERNARDES, I.; FELIPE RODRIGUES, M. P.; BACELLI, G. K.; MUNIN, E.; ALVES, L. P.; COSTA, M. S. *Aloe vera* extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*. **Mycoses**. 2012 May;55(3):257-61. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02079.x. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21914003.

GAUCH, L. M. R.; PEDROSA, S. S.; ESTEVES, R. A.; SILVEIRA-GOMES, F.; GURGEL, S. C.; ARRUDA, A. C.; DA SILVA, S. H. M. The effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation in *Candida dubliniensis* recovered from denture users. **Rev Pan-Amaz Saude**. vol.4 no.4 Ananindeua Dec. 2013.

<http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000400005>

HSU, C. C.; LAI, W. L.; CHUANG, K. C.; LEE, M. H.; TSAI, Y. C. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. **Med Mycol**. 2013 Jul;51(5):473-82. doi: 10.3109/13693786.2012.743051. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23210679.

NAICKER, S. D.; PATEL, M. *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* Inhibits Germ Tube and Biofilm Formation by *C. albicans*. **Evid Based Complement Alternat Med.**;2013:261978, 2013. doi: 10.1155/2013/261978. Epub 2013 Oct 9. PMID: 24223612; PMCID: PMC3809598.

SCORZONI, L.; DE PAULA, E SILVA, A. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO P. A.; DE MELO, W. C.; DE OLIVEIRA, H. C.; COSTA-OR LANDI, C. B.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. 2017 Jan 23;8:36. doi: 10.3389/fmicb.2017.00036. PMID: 28167935; PMCID: PMC5253656.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R & GUIGUEMDÉ RT. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: **A review. J Mycol Med** 27: 1-19, 2016.

MAFOJANE, T.; SHANGASE, S.I.; PATEL, M. The effect of subinhibitory concentrations of gentian violet on the germ tube formation 117 by *Candida albicans* and its adherence to oral epithelial cells. **Archives of Oral Biology**, [s.l.], v. 82, p.1-5, 2017.

SADOWSKA, B.; BUDZYN, A.; STOCHMAL, A.; ZUCHOWSKI, J.; PROF, B.R. Novel properties of *Hippophae rhamnoides* L. twig and leaf extracts - anti-virulence action and synergy with antifungals studied in vitro on *Candida* spp. model. *Microbial Pathogenesis*, [s.l.], v. 107, p. 372-379, 2017.

LU, Y.; SU, C.; LIU, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 22, n. 12, p.707-714, 2014.

GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; OURIQUE, A. F.; STEFFLER, M. C. R.; FRIZZO, C. O.; HENNEMMAN, B.; SANTOS, R. C. V.; LOPES, L. Q. S.; RECH, V. C.; NISHIHARA, V. S. K.; RAFFIN, R. R. P.; GOMES, P. STEPPE, M. Development of nanoemulsion containing pelargonium graveolens oil: characterization and stability study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 12, p. 271-276, 2016. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i12.15108>.

List tables

Table 1 – Composition of palmarosa oil and thyme oil.

Compounds	IR ^{to}	RI ^b	<i>Cymbopogon Martini (OP)</i>	<i>Thymus vulgaris (OT)</i>
			(%)	(%)
α - thujene	932	931		0.75
α - pinene	937	939		1.62
α -camphene	953	953		1.23
β -pinene	980	980		0.57
β -Myrcene	991	989	1.71	0.34
α - terpinene	1018	1019		1.27
p - Cimene	1026	1027	5.82	20.18
1.8 cineole	1037	1033		0.95
γ - terpinene	1062	1061		1.45
linalool	1098	1099	2.09	1.11
Camphenol	1109	1112	0.65	
camphor	1142	1143		0.18
Borneol	1161	1166		0.71
terpin-4-ol	1179	1177		1.09
α -terpineol	1185	1189		2.43
nerol	1228	1228	1.83	
neral	1240	1141	09.13	
Geraniol	1255	1253	35.27	
thymol	1291	1292		49.27
carvacrol	1298	1296	0.45	11.86
E- Citral	1341	1341	3.17	
thymol acetate	1356	1355		0.09
Geranyl acetate	1383	1380	9.68	
β - Elemene	1391	1388	4.35	
β - Caryophyllene	1418	1419	5.92	2.57
α - humelene	1451	1454		0.39
neryl propanate	1454	1459	1.69	
aromandrene	1461	1460	0.81	

Geranyl propionate	1476	1475		0.08
germacrene D	1483	1480		0.25
valencene	1491	1489	0.36	
(Z)- Nerolidol	1534	1533	1.57	
α -cadidene	1540	1538		0.17
Elemol	1549	1550	0.29	
Geranyl butyrate	1562	1561	1.63	
caryophyllene oxide	1581	1580	2.79	0.41
globulin	1583	1585	0.91	
viridiflorol	1590	1593	1.13	
(E, E)- Farnesol	1722	1725	4.52	
Total identified (%)			99.73	99.97

Table 2: Minimum inhibitory concentration and Minimum fungicidal concentration of thyme and palmarosa oils $\mu\text{g/mL}$.

Fungus	Thyme		Palmarosa	
	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CFM ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CFM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C. albicans</i>	25.7	25.7	39.8	39.8
<i>C. glabrata</i>	25.7	25.7	39.8	39.8

Table 3: Minimum inhibitory concentration and Minimum fungicidal concentration of the major constituents thymol, eugenol and geraniol $\mu\text{g /mL}$.

Majority Constituents						
Fungus	Thymol		Eugenol		Geraniol	
	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CFM ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CFM ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CFM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C. albicans</i>	27.1	27.1	34.4	34.4	41.2	41.2
<i>C. glabrata</i>	25.7	25.7	34.4	34.4	41.2,	41.2

Table 4 - In vitro combinations of essential oils against *Candida albicans* and *Candida glabrata*.

Fungi	Thyme / Palmarosa	
	CIM	FICI (X)
<i>C. albicans</i>	25.7/39.8	0.5 (S)
<i>C. glabrata</i>	25.7/39.8	0.6 (S)

Thyme; Palmarosa ; minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ mL}^{-1}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifferent; A, antagonism.

Table 5 - In vitro combinations of the major constituents against *Candida albicans* and *Candida glabrata*.

Combinations						
Fungi	Thymol / Eugenol		Thymol / Geraniol		Eugenol / Geraniol	
	CIM	FICI (X)	CIM	FICI (X)	CIM	FICI (X)
<i>C. albicans</i>	27.1/34.4	0.9 (S)	27.1/41.2	0.7 (S)	27.1/41.2	0.6 (S)
<i>C. glabrata</i>	25.7/34.4	0.9 (S)	25.7/41.2	0.7 (S)	34.4/41.2	0.6 (S)

Thymol; Eugenol ; Geraniol ; minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ mL}^{-1}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifferent; A, antagonism.

List Figures

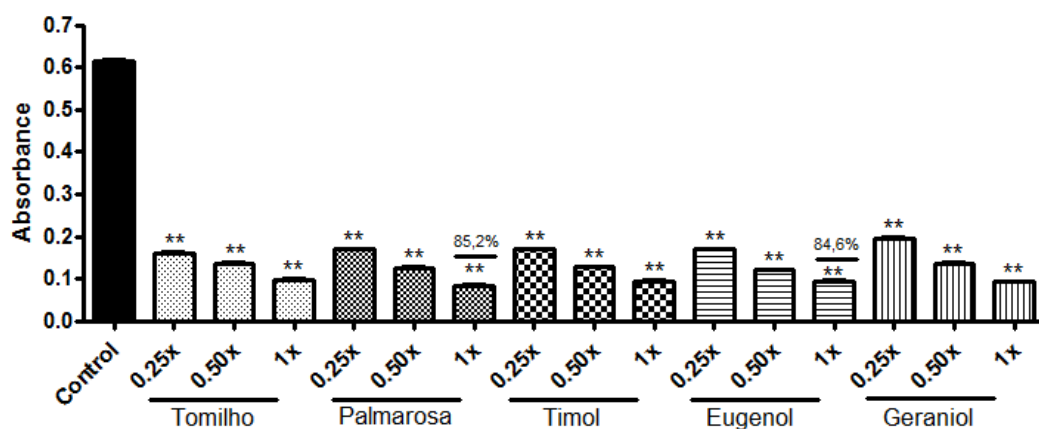


Figure 1: *Candida albicans* biofilm formation indices, after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

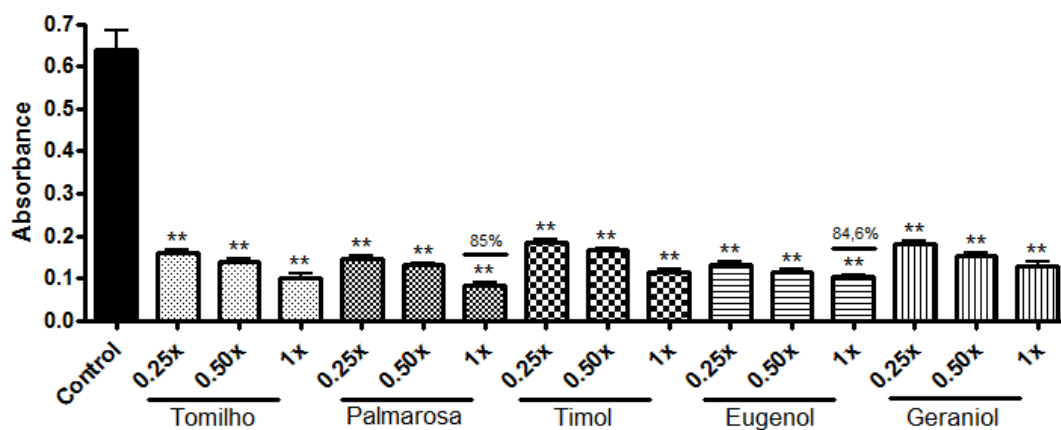


Figure 2: *Candida glabrata* biofilm formation indices, after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

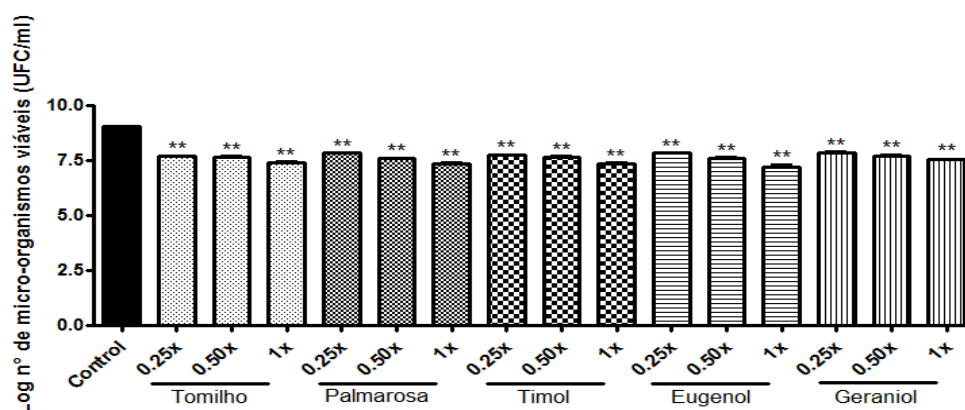


Figure 3: Growth inhibition in *C. albicans* tested against essential oils (thyme and palmarosa) and their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

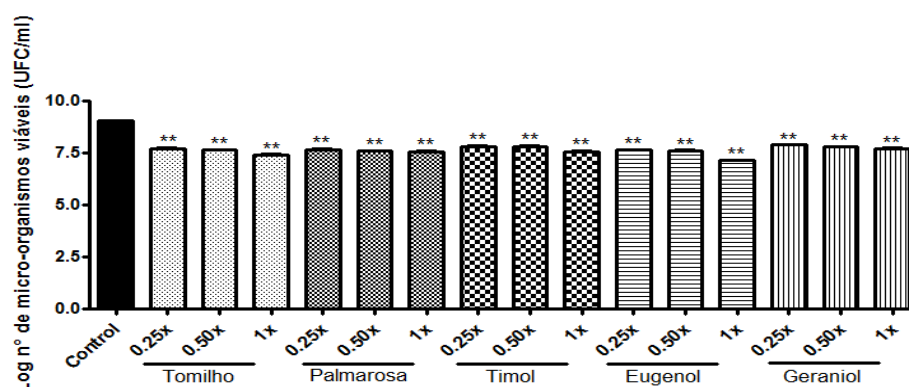


Figure 4: Growth inhibition in *C. glabrata* tested against essential oils (thyme and palmarosa) and their major constituents (thymol, eugenol and geraniol) at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01.

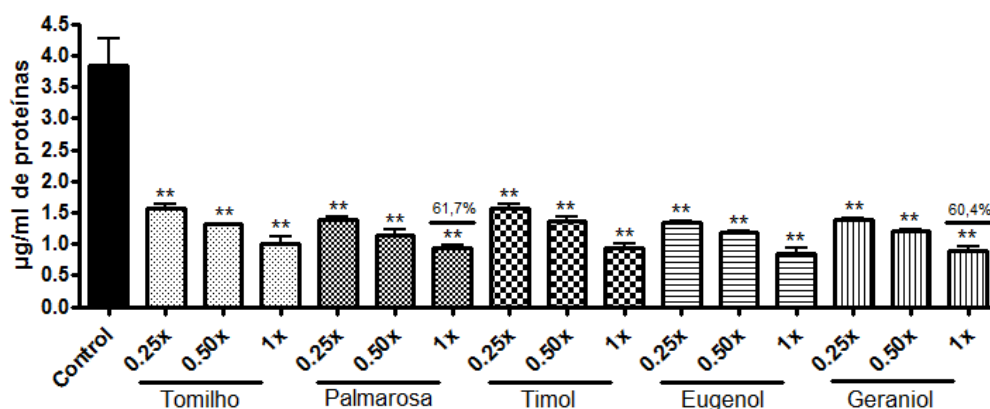


Figure 5: Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford (1976) in biofilms formed from *C. albicans* after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol , eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01. Results are expressed in µg / mL of protein.

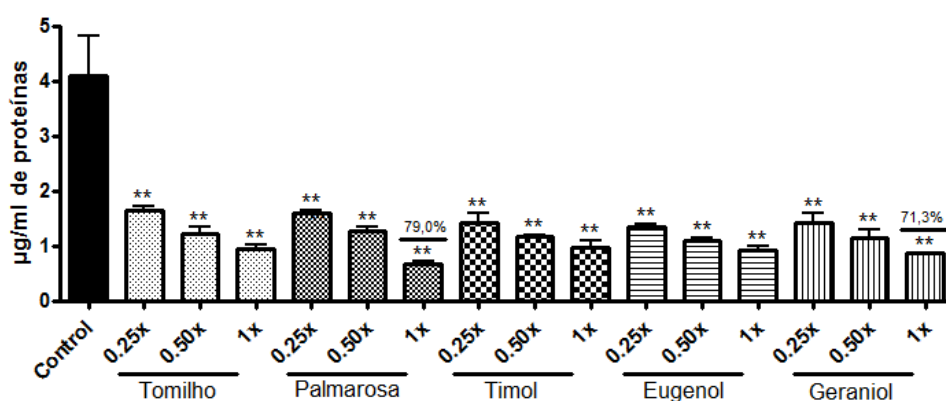


Figure 6: Protein quantification was determined using the technique proposed by Bradford (1976) in biofilms formed from *C. glabrata* after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol , eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** P < 0.01. Results are expressed in µg / mL of protein.

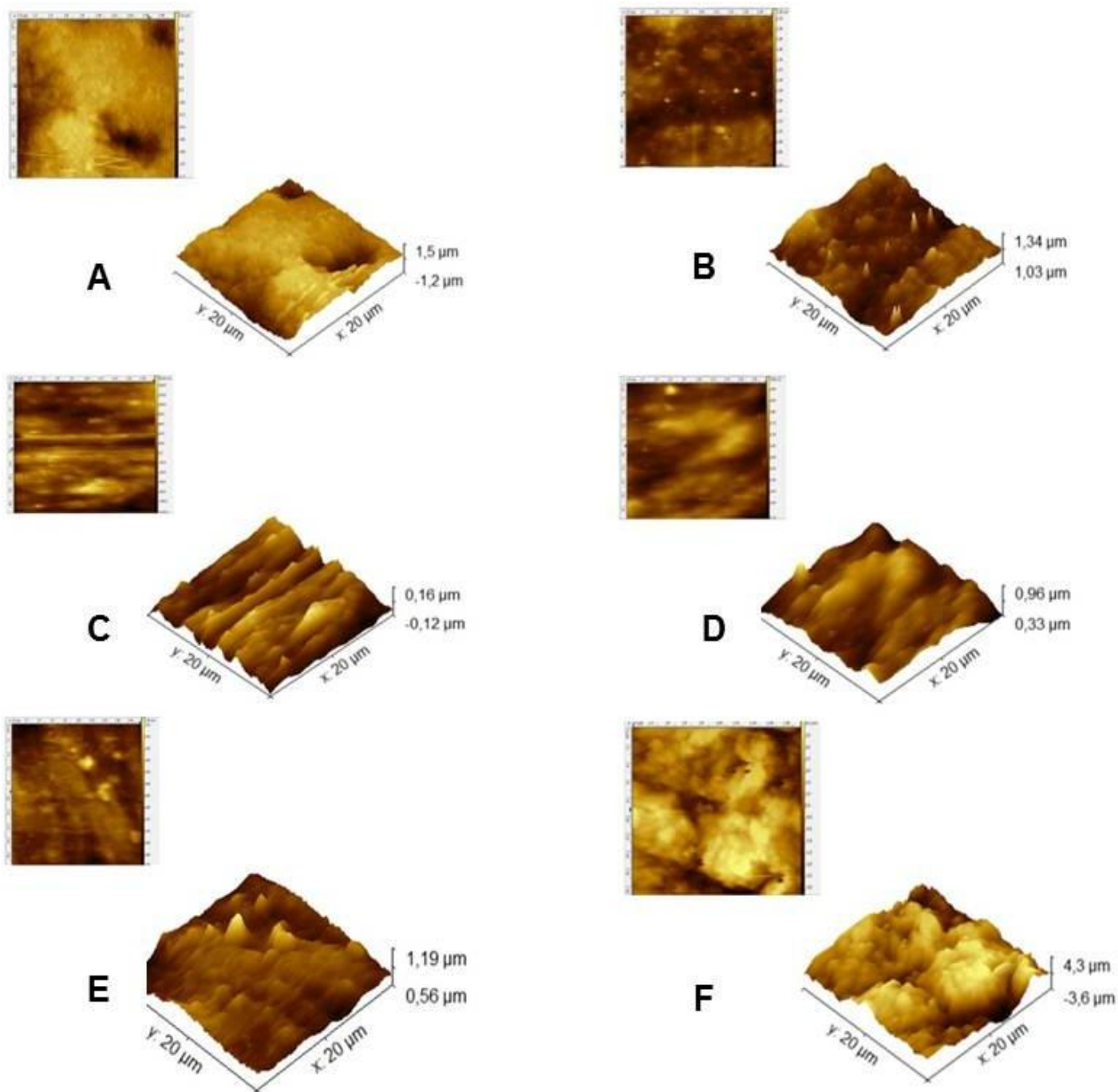


Figure 7: Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by *C. albicans* after treatment with essential oils and major constituents at a concentration of 1x CIM. (A) thyme, (B) thymol, (C) palmarosa, (D) geraniol, (E) eugenol and (F) control.

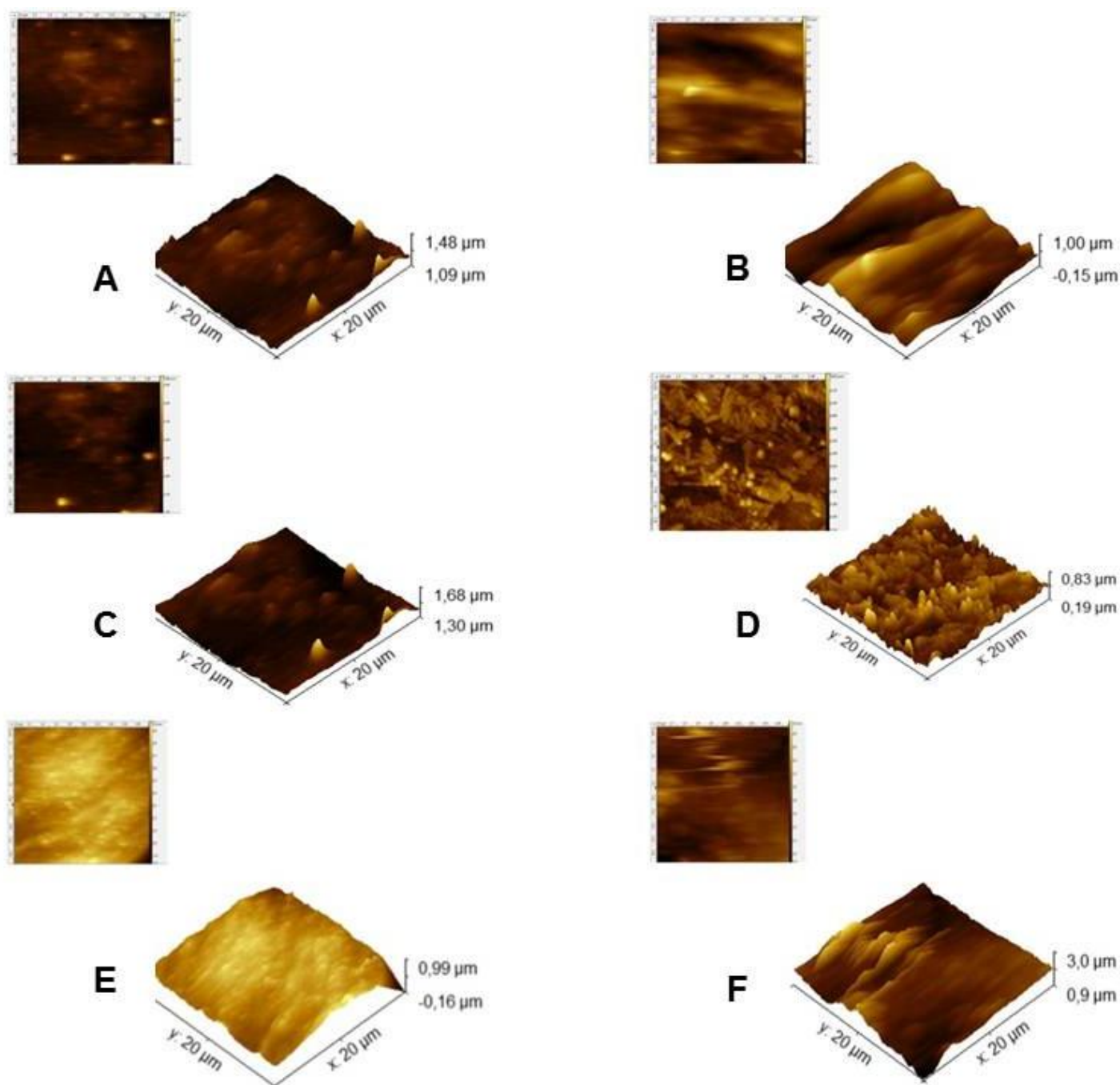


Figure 8- Image obtained through AFM demonstrating the presence of the biofilm formed by *C. glabrata* after treatment with essential oils and major constituents at a concentration of 1x CIM. (A) thyme, (B) thymol, (C) palmarosa, (D) geraniol, (E) eugenol and (F) control.

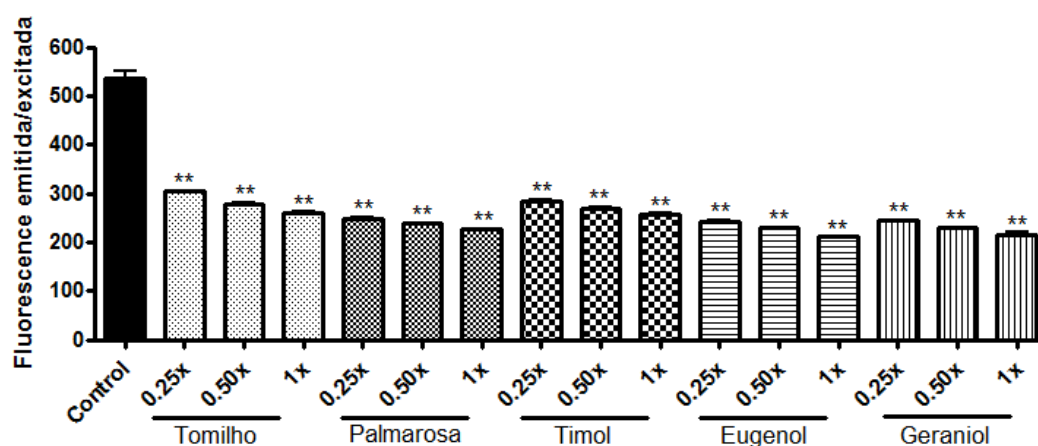


Figure 9: Analysis of the Biofilm of *C. albicans* formed by the Calcofluor technique after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

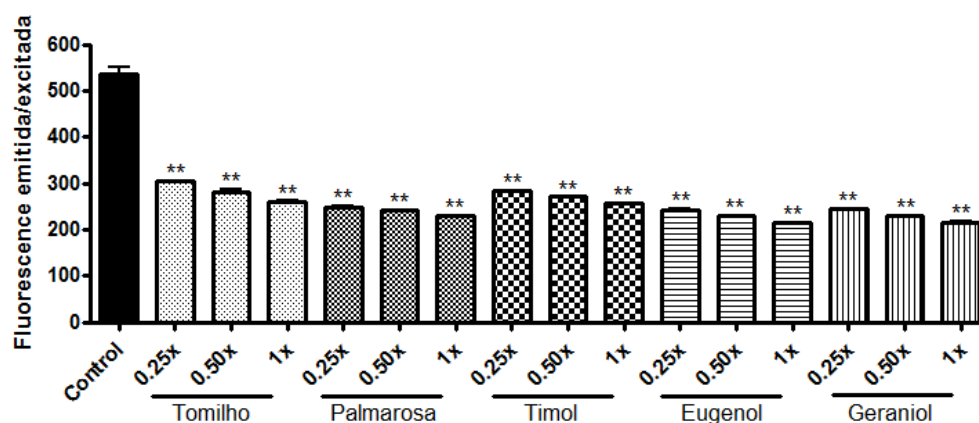


Figure 10 : Analysis of the Biofilm of *C. glabrata* formed using the Calcofluor technique after treatment with thyme and palmarosa oils and their constituents thymol, eugenol and geraniol at concentrations of 0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

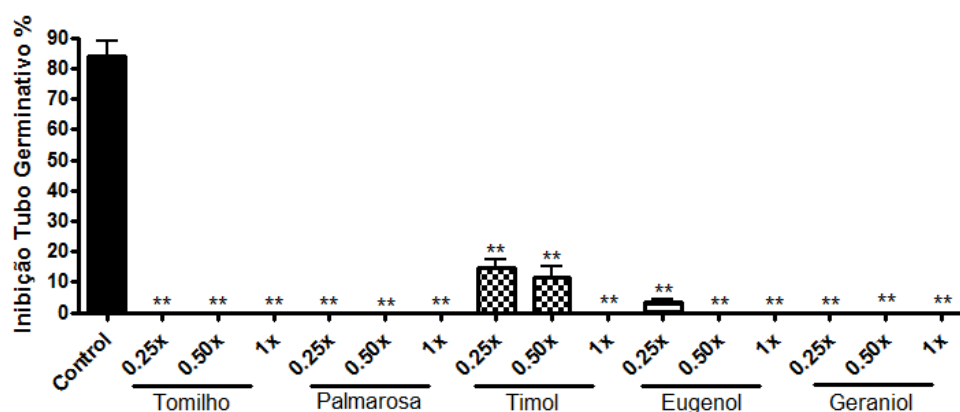


Figure 11: Effect of different concentrations (0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM) of thyme and palmarosa, as well as thymol, eugenol and geraniol on *C. albicans* germ tube formation. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

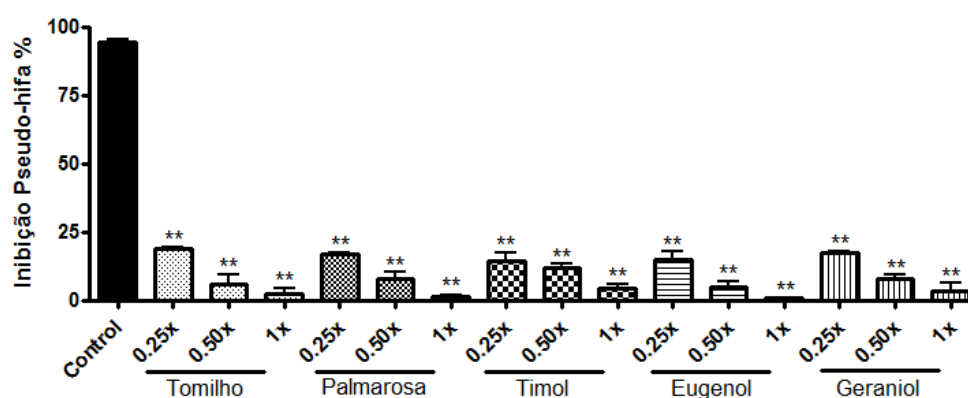


Figure 12: Effect of different concentrations (0.25x CIM, 0.50x CIM and 1x CIM) of thyme and palmarosa, as well as thymol, eugenol and geraniol on *C. albicans* pseudohyphae formation. The 5% significance level. ** $P < 0.01$.

Conclusões finais

A capacidade dos micro-organismos em formar biofilmes em sondas uretrais é um preocupante problema de saúde pública, pois as bactérias assim como os fungos do gênero *Candida* na forma séssil tornaram-se muito mais resistentes aos fármacos. Com isso ocorre o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes acometidos por esse tipo de infecção. Além disso, muitos micro-organismos desenvolvem fatores de patogenicidade que torna ainda mais difícil o tratamento de pacientes acometidos por esses micro-organismos. Por esta razão, torna-se de extrema importância a busca por novas alternativas efetivas de tratamento.

Para a revisão de literatura realizada, podemos concluir que a formação de biofilme em cateteres e sondas hospitalares constitui um grave problema de saúde pública mundial. Além disso, a utilização de óleos essenciais vem ganhando espaço pois podem ser usadas como alternativas. Desse modo, estudos de revisão que direcionem e façam a compilação de resultados de estudos se fazem necessário.

Tendo em vista que a utilização de óleos essenciais bem como seus constituintes majoritários estão sendo amplamente difundidos na tentativa de minimizar os efeitos dessa problemática.

Para os ensaios de coloração com cristal violeta, os melhores resultados foram do óleo de palmarosa e o constituinte majoritário geraniol, que apresentaram até 86% de redução na formação de biofilme para as bactérias na concentração de 1x CIM. Já para *Candida* a palmarosa e o eugenol apresentaram redução de 85% na concentração de 1x CIM. Na determinação das proteínas o óleo que mais se destacou também foi a palmarosa e o eugenol com redução de 84,4% na concentração de 1x CIM para bactérias. Já para *Candida* a palmarosa e o geraniol que apresentaram maiores reduções chegando a 79% na concentração de 1x CIM.

Para *P. aeruginosa* PA01, nos testes de motilidade os óleos que melhor se destacaram foram palmarosa e o tomilho que chegaram a apresentar 100% de redução de motilidade.

Os testes de inibição da formação de tubo germinativo em *Candida albicans*, os melhores resultados foram tomilho, palmarosa e geraniol que apresentaram 100% de inibição em todas as concentrações testadas. Para inibição da formação de pseudohifas todos os compostos apresentaram redução significativa na formação de pseudohifas.

Considerando-se os resultados encontrados no presente estudos, evidenciou-se que em todos os testes aqui realizados os óleos essenciais assim como seus constituintes majoritários demonstraram eficientes frente aos micro-organismos e os biofilmes formados pelos mesmos. Com isso, podemos perceber que os achados no presente trabalho vão de encontro com outros autores que também utilizaram os óleos essenciais e/ou constituintes majoritários frente aos mesmos micro-organismos e encontraram resultados semelhantes aos nossos.

Sendo assim, podemos concluir que os óleos de tomilho e palmarosa bem como os constituintes majoritários timol, geraniol e eugenol são potenciais antimicrobianos e foram eficientes frente a *P. aeruginosa* (PA01), *Klebsiella pneumoniae* (cepas 31 e 36), *Candida albicans* e *Candida glabrata* pois ficou evidenciado a atividade antibiofilme em material médico hospitalar, mostrando-se excelentes promissores no controle da formação de biofilme e como alternativa terapêutica eficaz contra resistência microbiana.

Referências

- AAZZA S, LYOUSSI B, MEGÍAS C, CORTÉS-GIRALDO I, VIOQUE J, FIGUEIREDO AC, et al. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. **Natural Product Communications**. 9:587-94, 2014.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.D.; NURIT, K.; COELHO, V.P; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.3, p.323-330, 2007.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. v.78, n.2, p.455-9, 2002.
- AL LAHAM SA, AL FADEL FM. Antibacterial activity of various plants extracts against antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila*. Jundishapur **Journal of Microbiology**; 7:e11370, 2014.
- AL-MENHALI A, AL-RUMAIHI A, AL-MOHAMMED H, AL-MAZROOEY H, ALSHAMLAN M, ALJASSIM M, et al. *Thymus vulgaris* (Thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. **Journal of Medicinal Food**; 18:54-9, 2015.
- ALAMGEER, AKHTAR MS, JABEEN Q, KHAN HU, MAHEEN S, HAROON-URRASH, et al. Pharmacological evaluation of antihypertensive effect of aerial parts of *Thymus linearis* benth. **Acta Poloniae Pharmaceutica**; 71:677-82, 2014.
- ALASIL SAAD MUSBAH, RAHMAT OMAR, SALMAH SMAIL, MOHD YASIM YUSOF. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by culture extract from novel bacterial species of *Paenibacillus* using a rat Model of Chronic Lung Infection. **International Journal of Bacteriology**. Vol. 15. 2015.
- ALLEN, R. C. et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 300, 2014.
- ALTOÉ, T. F. Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na produção e qualidade de óleo essencial. 2012. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- ALVES MJ, BARREIRA JCM, CARVALHO I, TRINTA L, PERREIRA L, FERREIRA ICFR et al. Propensity for biofilm formation by clinical isolates from urinary tract infections: developing a multifactorial predictive model to improve antibiotherapy. **J Med Microbiol**. 2014;63(3):471-7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.071746-0>
- ANVISA. Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde, 2011. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f72c20804863a1d88cc88d2bd5b3ccf0/BOLETIM+I.PDF?MOD=AJPERES>> Acesso em: 06 de maio de 2021.

APARNA, M.S.D.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6. p. 526-530, 2008.

ARAI HIROYUKI. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Microbiol.** 2: 103. 2011.

ARAÚJO, V.L et al. Biossurfactantes: propriedade anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quím. Nova**, v.36, n.6, p.848- 858, 2010.

ARNOW, P. M.; FLAHERTY, J. P. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: C. Glenn Mayhall (ed). Hospital Epidemiology and Infetion Control, 1st ed. Williams & Wilkins. **Galvestone**, p. 366-387, 1996.

AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Enhancing safety and aroma appealing of freshcut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 7, p. R84-R91, Sept. 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 446-475, 2008.

BANSODE, TANAJI N. Green Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Eugenol Derivatives. **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, Thane, v. 4, n. 4, p.145-147, 2017.

BARA MTF, VANETTI MCD. Estudo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Rev Bras. Farmacogn.** 7-8(1), 1998.

BARAN, IRMAK; AKSU, NERIMAN. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

BARANKIN, BENJAMIM. Answer: Can you identify this condition? **Can Fam Physician.** Oct; 58(10): 1104, 2012.

BARNARD, D.R., XUE, R. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera:culicidae). **Journal of Medical. Entomology.** v.41, p. 726–730, 2004.

BARNETT J. A; A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. **Yeast.** v. 25, p. 385-417, 2008.

BARROS, S.K.S.A.; KERBAUY, G.; DESSUNIT, E.M. Infecção do trato urinário relacionada ao cateter: perfil de sensibilidade antimicrobiana. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v.14, n.4, p.1005-1013, 2013.

BASMA, R.; BARADA, G.; OJAIMI, N.; KHALAF, R. A: "Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates" **Mycos.**, v.52, p.141–148, 2009.

BECK-SAGUÉ C, JARVIS WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections

Surveillance System. **J Infect Dis.** 1993 May;167(5):1247-51. doi: 10.1093/infdis/167.5.1247. PMID: 8486965.

BEYDA ND, JOHN J, KILIC A, ALAM MJ, LASCO TM, GAREY KW. . FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. **Clin Infect Dis** 59:819–825, 2014. [http:// doi: 10.1093/cid/ciu407](http://doi:10.1093/cid/ciu407).

BELATO, KELY KARINA; DE OLIVEIRA, JONATAS RAFAEL; DE OLIVEIRA, FERNANDA SARAIVA; DE OLIVEIRA, LUCIANE DIAS; CAMARGO, SAMIRA ESTEVES AFONSO. Cytotoxicity and genotoxicity of thymol verified in murine macrophages (RAW 264 . 7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans* , *Staphylococcus aureus* , and *Streptococcus mutans*. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. November 2017, p. 455–460, 2018.

BIASI-GARBIN, RENATA PERUGINI; OTAGUIRI, ELIANE SAORI; MOREY, ALEXANDRE TADACHI; SILVA, MAYARA FERNANDES DA; MORGUETTE, ANA ELISA BELOTO; LANCHEROS, CESAR ARMANDO CONTRERAS; KIAN, DANIELLE; PERUGINI, MARCIA REGINA ECHES; NAKAZATO, GERSON; DURÁN, NELSON; NAKAMURA, CELSO VATARU; YAMAUCHI, LUCY MEGUMI; YAMADA-OGATTA, SUELI FUMIE. Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume, 8 p, 2015.

BONFILL X.; RIGAU D.; ESTEBAN-FUERTES M.; BARRERA-CHACÓN J.M.; JÁUREGUI-ABRISQUETA M.L.; SALVADOR S et al. Efficacy and safety of urinary catheters with silver alloy coating in patients with spinal cord injury: a multicentric pragmatic randomized controlled trial. The ESCALE trial. **Spine J**, v.17, n.1, p.1650–7, 2017.

BURDOCK, G.A. FENAROLI'S Handbook of Flavor Ingredients. CRC Press, pp. p. 733– 734, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. **Annual review of microbiology**, v. 66, p. 493-520, 2012.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894-896, 2011.

BHATT P., RANPARIYA V., SANANDIA et al. Anticonvulsant activity of essential oil of *Cymbopogon martinii*. 12th International Congress of Ethnopharmacology (ISE), 2012.

BLANKENSHIP, J.R. AND A.P. MITCHELL, How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol.** 9(6): p. 588-94, 2006.

BRAGA, PC; RICCI D. Thymol-induced alterations in *Candida albicans* imaged by atomic force microscopy. **Methods Mol Biol** 736:401-10. 2011.

BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The genus *klebsiella*: taxonomic History and Structure. **Springer New York**. v. 6, p. 159-196, 2006.

BROBERG, C.A.; PALACIOS, M.; MILLER V.L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Reports*; 6:64, 2014.
<http://doi:10.12703/P6-64>.

BROOMFIELD RJ, MORGAN SD, KHAN A, STICKLER DJ. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. **J Med Microbiol**. 2009;58(Pt 10):1367-75.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.012419-0>.

BROOKS, GEO. F.; CARROLL, KAREN C.; BUTEL, JANET S.; MORSE, STEPHEN A.; MIETZNER, TIMOTHY A. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26ªed. **AMGH**, Porto Alegre. 2014.

CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. 2008.86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CANDAN, ESRA DENIZ; AKSÖZ, NILUFER. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Biochimica Polonica**. v. 62, n. 4, p. 867-874, 2015.

CARDOSO, I.C.B.; CARDOSO, T.M.F.; FERREIRA, F.F.P.B. Prevenção da infecção do trato urinário associada ao cateter urinário: tolerância zero. **Revista investigação em enfermagem**, v.1, n.2, p. 29-38, 2015.

CARRARO-EDUARDO, J.C.; ALVES, D.S.; HINDEN, I. E.; TOLEDANO, I.P.; FREITAS, S.G.; MONDINO, P.J.J. Urinary tract infection and indwelling urinary catheters: prospective study in gynecological surgery with antibiotic prophylaxis. **Sao Paulo Med. J**, v. 133, n.6, p.517-20, 2015.

COSTA JGM, RODRIGUES FFG, ANGELICO EC, CARLA K. B. PEREIRA, SOUZA EO, CALDAS GFR et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Rev Bras de Farmacog**; 18(4):583-6, 2008.

COSTERNON, el al. "The Bacterial Glycocalix in Nature and Disease". **Annu Rev. Microbiol.**, v.35, p.299-304, jan. 1981.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435-64, 1987.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COTRIM, E. R.; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. F. R. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC em Enterobacteriaceae: o desafio das bactérias

multirresistentes. Pós em revista do centro universitário **Newton Paiva**. v. 1, n. 5, p. 268- 275, 2012.

CHAO, S. C.; YOUNG, D.G.; Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essential Oils Research**, v.2, p. 630, 2000.

CHAUHAN AK, KANG S. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser. Typhimurium* in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Res Microbiol**;165(7):559-565, 2014.

CHEN YAN-JUN W. F.: Study on pathogens causing lower respiratory tract infections and their drug resistance. *Zhong Guo Bing Yuan Sheng Wu Xue Za Zhi*, v.8, p.561-563, 2013.

CHEN, LING; MATHEMA, BARUM; CHAVDA, KALYAN D.; DELEO, R. FRANK; BONOMO, ROBERT A.; KREISWIRTH, BARRY N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 686-696, 2014.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

CLEVELAND, A.A.; FARLEY, M.M; HARRISON, L.H.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; LOCKHART, S. R.; MAGILL, S. S.; DERADO, G.; PARK, B.J.; CHILLER, T.M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population- based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008– 2011. **Clinical Infectious Diseases**, v.55, p.1352–61, 2012.

CLEVELAND, A.A.; HARRISON, L.H.; FARLEY, M.M.; HOLLICK, R.; STEIN,B.; CHILLER, T.M.; LOCKHART, S.R.; PARK, B.J. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PloS One**. v.10, 2015.

CRISTINA, A.G.; COSTERTON, J. W. Bacteria –laden biofilms – a hazard to orthopedic prostheses. **Infect Surg**, v.3, p. 655-662, 1984.

DADDAOUA, ABDELALI, TINO KRELL, and Juan-Luis Ramos. Regulation of Glucose Metabolism in *Pseudomonas*: The phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. **J Biol Chem**. 7; 284 (32) : 21360-8. 2009.

DASGUPTA, M.K; COSTERTON, J.W. Significance of biofilm adherent bacterial microcolonies on Tenckhoff catheters in CAPD patients, **Blood Purif**, v. 7, p. 144-155, 1989.

DAVEY, M. E.;O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 847-867, 2000.

DAVIES, J. DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2010.

DE LAS MERCEDES OM, CAREZZANO ME, GIULIANO M, DAGHERO J, ZYGADLO J, BOGINO P, et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus*

vulgaris and *Oreganum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. **Plant Biology** (Stuttgart, Germany); 17:758-65, 2015.

DENG, X. et al. Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable mild stress mice model. **Physiology & behavior**, v. 152, p. 264 – 271, 2015.

DERETIC, V.; SCHURR, M. J.; BOUCHER, J. C.; MARTIN, D. W. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoid in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. **J Bacteriol**, v. 176, p. 2273-2780, 1994.

DEVAKI, T. Geraniol, a component of plant essential oils: a review of its pharmacological activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 67 – 70, 2015.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745–2749, 2006.

DONLAN, R. M.; et al. Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 39, p. 750-753, feb. 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DOHNT K, SAUER M, MÜLLER M, ATALLAH K, WEIDEMANN M, GRONEMEYER, P, et al. An in vitro urinary tract catheter system to investigate biofilm development in catheter-associated urinary tract infections. **J Microbiol Methods**. 2011;87(1):302-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.09.002>.

DORING, G.; DALHOFF, A.; VOGEL, O.; BRUNNER, H.; DROGE, V. E.; BOTZENHART, K. In vivo activity of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model. **J Infect Dis**, v. 149, p. 532-537, 1984.

DUBEY, V.S., MALLAVARAPU, G.R., LUTHRA, R. Changes in the essential oil content and its composition during palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia) inflorescence development. **Flavour Fragrance Journal**, v. 15, p.309–314, 2000. Farmacopéia Brasileira, 2012. Acesso em abril de 2022.

DUDECK, M.A.; HORAN, T.C.; PETERSON, K.D.; ALLEN, B.K.; MORRELL, G.; POLLOCK, D.A et al. National Healthcare Safety Network report, data summary for 2011, device-associated module. **Am J Infect Control**, v.41, n.4, p.286-300, 2013.

DJERIBI R, BOUCHLOUKH W, JOUENNE T, MENAA B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **Am J Infect Control**.40(9):854-9, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.10.009>

DRAKE, D.; MONTIE, T. C. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 43-52, 1988.

ELLEPOLA A.N.; SAMARANAYAKE L.P. Antimycotic agents in oral candidosis: an overview: 1. Clinical variants. **Dent Update**. v.27, p.111–112 2000.

ESMAEILI-MAHANI S, FALAHI F, YAGHOUBI MM. Proapoptotic and antiproliferative effects of *Thymus caramanicus* on human breast cancer cell line (MCF-7) and its interaction with anticancer drug vincristine. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**; 2014:893247, 2014.

FALAGAS, MATTHEW E.; TANSARLI, GIANNOULA.S.; KARAGEORGOPOULOS, DROSOS.E.; VARDAKAS, KONSTANTINOS Z. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1 -6, 2014.

FARMAKIOTIS, D.; TARRAND, J.J.; KONTOYIANNIS, D.P. Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients. **Emerging Infectious Disease**, v.20, p.1833–40, 2014.

FICK, R. B.; BALTIMORE, R. S.; SQUIRE, S. V.; REYNOLDS, H. Y. IgG proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v. 151, p. 589-598, 1985.

FIGUEIRAL, M. H.; AZUL, A.; PINTO, E.; FONSECA, P. A.; BRANCO, F. M.; SCULLY, C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.34, p. 448–55, 2007.

FUJITANI S, SUN HY, YU VL, Weingarten JA. Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: **Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Source**. *Chest*; 139(4): 909-919, 2011.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623, 2010.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant: description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 81-97, 1997.

FREIRE, N. B.; PIRES, L. C. S. R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Aeromonas* spp. isolated from aquatic organisms. *Animais de produção, Pesq. Vet. Bras.* 38 (02), Fev 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4805>.

FREYDIERE, A.M., R. GUINET, AND P. BOIRON, Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Med Mycol.** 39(1): p. 9-33, 2001.

GALIÈ, S., GARCÍA G. C., MIGUÉLEZ, E. M., VILLAR, C. J., LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 898, 2018. Disponível em: DOI: 10.3389/fmicb.2018.00898.

GIARRATANA F, MUSCOLINO D, BENINATI C, GIUFFRIDA A, PANEBIANCO A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. **Experimental Parasitology**;142:7-10, 2014.

GOULD, C.V.; UMSCHIED, C.A.; AGARWAL, R.K.; KUNTZ, G.; PEGUES, D.A. Centers for Disease Control and Prevention-CDC. **Guideline for Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infections**. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). v.31, n.4, p.1-67, 2009.

GUIBAUD, G. et al. Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. **Colloids and Surfaces**, Washington, v. 63, p. 48-54, May 2008.

GUH, ALICE Y.; BULENS, SANDRA N.; MU, YI; JACOB, JESSE T.; RENO, JESSICA; SCOTT, JANINE; WILSON, LUCI E.; VAETH, ELISABETH; LYNFIELD, RUTH; SHAW, KRISTIN M.; VAGNONE, PAULA M. SNIPPES; BAMBERG, WENDY M.; JANELLE, SARAH J.; DUMYATI, GHINWA; CONCANNON, CATHLEEN; BELDAVS, ZINTARS; CUNNINGHAM, MARGARET CASSIDY MAUREEN; PHIPPS, ERIN C.; KENSLOW, NICOLE; TRAVIS, TATIANA; LONSWAY, DAVID; RASHEED, KAMILE; LIMBAGO, BRANDI M.; KALLEN, ALEXANDER J. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. **Journal of American Medical Association**, v. 314, n. 14, p. 1479-1487, 2015.

GRIGORE A, PARASCHIV INA, COLCERY-MIHUL S, BUBUEANU C, DRAGHICI E, ICHIM M. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. **Rom. Biotech. Lett.** 15, 5436-5443, 2010.

GROSSMAN, L. Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde. São Paulo: Optonline, p.300, 2005.

HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. **Nat. Rev. Microbiol.** 2 (2), 95–108, 2004. [Http://doi:10.1038/nrmicro821](http://doi:10.1038/nrmicro821).

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). Lipids and essential oils as antimicrobial agents. **West Sussex: J. Wiley**, p. 255-306, 2011.

HECK, L. W.; MORIHARA, K.; McRAE, W. B.; MILLER, E. J. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infect Immun**, v. 51, p. 115-118, 1986.

HYLDGAARD M, MYGIND T, MEYER RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol.** 2012 Jan 25;3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012. PMID: 22291693; PMCID: PMC3265747.

HOIBY, N. Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases. **APMIS**, v. 83, p. 549-552, 1975.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Sciences**, India, v. 3, n. 3, p. 55-65, April, 2011.

HOL, F. J. H. et al. Density-dependent adaptive resistance allows swimming bacteria to colonize an antibiotic gradient. **The ISME journal**, v. 10, n. 1, p. 30, 2016.

IMELOUANE, B.; HASSAN, A.; HOCEIMA, A. L.; WATHELET, J. P.; ANKIT, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. **International Journal of Agriculture and Biology**, 11(2), January 2009.

IRVIN, R. T.; DORIN, P.; LEE, K. K.; SASTRY, P. A.; PRANCHYCH, W.; TODD, T.; HODGES, R.S. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesion: confirmation that the pili structural proteins subunit contains a human epithelial cell-binding domain. **Infect Immun**, v. 57, p. 3720-3766, 1989.

ISHIMOTO, K. S.; LORY, S. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative σ -factor (RpoN) of RNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 86, p. 1954-1957, 1989.

ISMAILI H, MILELLA L, FKI-H-TETOUBANI S, ILIDRISSI A, Camporese A, Sosa S, et al. In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**; 91:31-6, 2004.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 924-929, 1995.

JAFARI, Abbas; RASMI, Yousef; HAJAGHAZADEH, Mohammad; KARIMIPOUR, Mojtaba. Hepatoprotective effect of thymol against subchronic toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Biochemical and histological evidences. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 29–36, 2017.

JAMALI CA, EL BOUZIDI L, BEKKOUCHE K, LAHCEN H, MARKOUK M, WOHLMUTH H, et al. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. **Chemistry & Biodiversity**; 9:1188-97, 2012.

JÄRVENSIVU A.; HIETANEN J.; RAUTEMAA R.; SORSA T.; RICHARDSON M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. **Oral Dis**. v.10, n.2, p.106-12, 2004.

JAWETZ E, MELNIK JL, ADELBERG EA. Microbiologia Médica 21ª ed, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2010.

JAYACHANDRAN, M.; CHANDRASEKARAN, B.; NAMASIVAYAM, N. Geraniol attenuates fibrosis and exerts anti-inflammatory effects on diet induced atherogenesis by NF- κ B signaling pathway. **European journal of pharmacology**, v. 762, p. 102 – 111, 2015.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K. K. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 4344–4348, 2003.

- JOHNSON, L. R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 251, n. 1, p. 24-34, Jan. 2007.
- JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, C. M.; VALENTE, V. M. M. Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 404-408, 2005.
- JAHN, P.; BEUTNER, K.; LANGER, G. Types of indwelling urinary catheters for long-term bladder drainage in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, n.3, 2012.
- KAGAN, S.; ICKOWICZ, D.; SHMUEL, M.; ALTSCHULER, Y.; SIONOV, E.; PITUSI, M.; WEISS, A.; FARBER, S.; DOMB, A. & POLACHECKA I. Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 56, 5303-5611, 2012.
- KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.120–8, 2008.
- KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 6, p. 1055-1085, 2015.
- KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.
- KELLY, N. M.; KLUFTINGER, J. L.; PALOSKE, B. L.; PARANCHYCH, W.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa* pili as ligands for nonopsonic phagocytosis by fibronectin-stimulated macrophages. **Infect Immun**, v. 57, p. 3841-3845, 1989.
- KENNEDY, D. A.; READ, A. F. Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1851, p. 20162562, 2017.
- KEREKES, E. B.; VIDACS, A.; TOKÓ, M.; PETKOVITS, T. Anti-Biofilm Effect of Selected Essential Oils and Main Components on Mono- and Polymicrobial Bacterial Cultures. **Microorganisms**. September, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7090345.
- KIM, W. et al. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3111-3117, 2003.
- KIM J, SUDBERY P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **J Microbiol**. 2011 Apr;49(2):171-7. doi: 10.1007/s12275-011-1064-7. Epub 2011 May 3. PMID: 21538235.
- KONG X, LIU X, LI J, YANG Y. Advances in pharmacological research of eugenol. **Curr Opin Complem Alternat Med**.;1(1):8-11, 2014.
- KOWALESWSKA-GROCHOWSKA, K. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. **Chest**, v.100, p. 1090-1095, 1991.

- KÖHLER, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 5990-5996, 2000.
- KOHIYAMA CY, YAMAMOTO RIBEIRO MM, MOSSINI SA, BANDO E, BOMFIM Nda S, et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**; 173:1006-10, 2015.
- KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. "Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces," **Annual Review of Microbiology**, v.59, p.113–133, 2005.
- KUMAR, R., SRIVASTAVA, M., DUBEY, N.K. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. **Journal of Food Protection**, v.70, p. 172–178, 2007.
- KUMARAN, A.M.; SOUZA, P.; AGARWAL, A.; BAKKOLLA, R.M.; BALASUBRAMIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 957, 2003.
- KUHN, D.M., et al., Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun**. 70(2): p. 878-88, 2002.
- KLAUSEN, M. et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Molecular microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1511-1524, 2003.
- KHAN, S. T. et al. Thymol and carvacrol induce autolysis , stress , growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **AMB Express**, 2017.
- KHALEDI N, TAHERI P, TARIGHI S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. **Journal of Applied Microbiology**; 118:704-17, 2015.
- LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 2, p. 164-172, 2011.
- LAI, S.; TREMBLAY, J.; DÉZIEL, E. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 1, p. 126-136, 2009.
- LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on geraniol. Toxicologic and Dermatologic Assessment of Cyclic and Non-Cyclic Terpene Alcohols, v. 46, n. 11, Supplement, p. S160 – S170, 2008.
- LEAL-CARDOSO, J.H., COELHO de SOUZA, A.N., SOUZA, I.T., FIGUEIREDO, I.M., Effects of eugenol on excitation – contraction coupling in skeletal muscle. **Arch. Int. Pharmacodyn.** Ther. 327, 113 – 124, 1994.
- LEAW, S. N. et al: Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.693– 699, 2006.

- LEECH, ANDREW J.; MATTICK, John S. Effect of site-specific mutations in different phosphotransfer domains of the chemosensory protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* motility. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8479-8486, 2006.
- LEUCK, A.M.; WRIGHT, D.; ELLINGSON, L.; KRAEMER, L.; KUSKOWSKI, M.A.; JOHNSON, J.R. Complications of Foley Catheters—Is Infection the Greatest Risk? **J Urol**.v.187, n.5, p.1662-6, 2012.
- LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. Handbook of Experimental Pharmacology. **Journal bacteriology**, New York, v. 211, p. 121-133, Jan. /Dez. 2012.
- LEWIS, K. New approaches to antimicrobial discovery. **Biochemical Pharmacology**. [S.l.;s.n.], 2017.
- LI L.; REDDING S.; DONGARI-BAGTZOGLOU A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **J Dent Res**. v.86 n.3 p.204-15, 2007.
- LIMA, MARCOS RESENDE SOUSA; SOARES, NATHAYANA DE SOUSA; MASCARENHAS, MÁRCIO DÊNIS MEDEIROS; AMARAL, ELAN JOELANE LOPES DA SILVA do. et al. Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. **Epidemiologia e Serviços da Saúde**, v. 23, n. 1, p. 177-182, 2014.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 2, n. 2, p. 1-11, fev. 2010.
- MADDULA, V. S. R. K. et al. Quorum sensing and phenazine are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30-84. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 2, p. 289-301, Aug. 2006.
- MAH, T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, Inglaterra, v. 9, n. 24, p. 1061- 1072, set. 2012.
- MAI, G. T.; SCOW, W. K.; PIER, G. B.; McCORMACK, J. G.; THONG, Y. H. Suppression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. **Infect Immun**, v. 61, p. 559-564, 1993.
- MAISSA BJ, WALID H. Antifungal activity of chemically different essential oils from wild Tunisian Thymus spp. **Natural Product Research**; 29:869-73, 2015.
- MALLAVARAPU, G.R.; RAO, B.R.R.; KAUL; P.N.; RAMESH, S.; BHATTACHARYA, A.K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and herb of palmarosa 122 (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk.). **Flavour Fragrance Journal**, v. 13, p.167–169, 1998.
- MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, n. 1, p. 402 – 414, 2016.

MARRIE, T. J.; SUNG, J. Y.; COSTERTON, J. W. Bacterial biofilm formation on nasogastric tubes. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 503-506, 1990.

MARMITT, D. J. et al. Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.

MARTINS, M. et al. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **The Open Microbiology Journal**, [S.l: s.n.], 2013.

MASÁK, J., ČEJKOVÁ, A., SCHREIBEROVÁ, O., ŘEZANKA, T. Pseudomonas biofilms: possibilities of their control. **FEMS microbiology ecology**, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2014. Disponível em: DOI: 10.1111/1574-69 41.12344.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A. J.; CHOMPREEEDA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 180-185, 2006. PMID:16266767. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.007>.

MATHER, A. E. et al. Bacillary dysentery from World War 1 and NCTC1, the first bacterial isolate in the National Collection. **The Lancet**, v. 384, n. 9955, p. 1720, 2014

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. **Food Chem Toxicol**. 2006 Feb; 44(2):198-206. doi: 10.1016/j.fct.2005.06.013. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16087283.

MAUKONEN, J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, n. 6, p. 327-356, 2003.

MENEZES, E.A.; GUERRA, A.C.P.; RODRIGUES, R.C.B; PEIXOTO, M.L.V.; LIMA, L.S.; CUNHA, F.A. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. **J Bras Patol Med Lab**. v. 40, n.5, p. 299-305, 2004.

MENOITA E, SANTOS V, TESTAS C, GOMES C, SANTOS A. Biofilms: knowing the entity. **Journal of aging & innovation**. 1(2): 23-32, 2012.

MEYER, GABRIELA; PICOLI, SIMONE, ULRICH. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratório**. v. 47, n. 1, p. 24-31, 2011.

MICHALSKA-SIONKOWSKA, MARTA; WALCZAK, MACIEJ; SIONKOWSKA, ALINA. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. **Polymer Testing**, v. 63, p. 360–366, 2017.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B.; CHAABOUNI, Y.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A.; CHAIEB, K. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, 104, 56 – 63, 2017.

MIMICA, M. J.; MENDES, Caio M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399–406, 2007.

MIRON, D. et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660 – 667, 2014.

MORAES, M.N., et al. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais, **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 23, n. 3, p. 99-10, Belo Horizonte, jan. 2013.

MOREIRA, M.R.; GUIMARÃES, M.P.; RODRIGUES, A. A. A.; GONTIJO-FILHO, P. P. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 39-44, 2013.

MUKHERJEE, P.K., et al., *Candida biofilm*: a well-designed protected environment. **Med Mycol**, 2005. 43(3): p. 191-208.

MULCAHY, L. R.; VINCENT, I.M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014. Disponível em: DOI: 10.1007/s 00248 -013-0297-x.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 6 E^a. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 7^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NAZZARO, F.; et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p.1451-1474, 2013.

NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK (NHSN). **Patient Safety Component Protocol**. Centers for Disease Control and Prevention. Jan.2016.

NEIDELL, M.J. et al. Costs of healthcare and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 55, p. 807-815, Set. 2012.

NICOLLE, L.E. Urinary catheter associated infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n.13, p.28, 2012.

NICOLLE, L.E. Catheter associated urinary tract infections. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.3, n.23. p.1-8, 2014. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-23>

NICKEL, J.C.; DOWNEY, J. A.; COSTERTON, J. W. Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. **Urology**, 34(5):284-291, 1989.

NIVEDITHA S, PRAMODHINI S, UMADEVI S, KUMAR S, STEPHEN S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated Urinary Tract Infections (UTIs). **J Clin Diagn Res**. 6(9):1478-82, 2012.

<https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4367.2537>

- NORDMANN, Patrice. Carbapenemase- producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 44, p. 51–56, 2014.
- NGUEFACK, A. J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 377-383, 2012.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I.; OMS-OLIU G. and MARTÍN-BELLOSO O. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. *Frontiers in Nutrition*, dec-2014.
- OLIVEIRA, A.C. Infecções hospitalares: Epidemiologia, prevenção e controle. **Meds**, 2005.
- OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.
- O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. December, p. 1–16, 2014.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. **HM Government and Wellcome Trust: UK**, 2016.
- OMS, Organização Mundial de Saúde, 2005. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>. Acesso em 22 jun 2022.
- OKUDA, J; HAYASHI, N; OKAMOTO, M; SAWADA, S; MINAGAWA, S; YANO, Y. Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the Intestinal Tract Is Mediated by the Binding of ExoS to an Na,K-ATPase Regulator, FXYD3. *Infect.Immun* 78, 4511-4522. 2010.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.
- OZEN ASLI I. & DAVID W. Ussery Setting the *Pseudomonas* Genre: Where do we draw the line Azotobacter? **Ecol Microb** 63 (2): 239-248. 2013.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and molecular biology reviews**: MMBR, v. 80, n. 3, 2016.
- PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D.K.; CALANDRA, T.F.; EDWARDS, J. E.; JR., FILLER, S.G.; FISHER, J.F.; KULLBERG, B.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.503–35, 2009.

PAPOFF, P, CECCARELLI, G., D'ETTORRE, G., CERASARO, C., CARESTA, E., MIDULLA, F. GUT Microbial Translocation in Critically Children and Effects of Supplementation with Pre- and Pro Biotics. **International Journal of Microbiology**. 2012.

PARMELY, M.; GALE, A.; CLABAUGH, M.; HORVAT, R.; ZHON, W. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun**, v. 58, p. 3009-3014, 1990.

PERCIVAL, S. L. et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 647-657, 2012.

PEREIRA, F. de O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228 – 234, 2015.

PEREZ LEANDRO REUS RODRIGUES; ANA LÚCIA PEIXOTO DE FREITAS; AFONSO LUÍS BARTH. Nutritional requirement among *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from respiratory clinical specimens at a tertiary hospital from South of Brazil. **Braz J Microbiol** 42 (3): 1061-1064. 2011.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 6, p. a025197, 2016.

PICKARD, R.; LAM, T.; MACLENNAN, G.; STARR, K.; KILONZO, M.; MCPHERSON, G et al. Types of urethral catheter for reducing symptomatic urinary tract infections in hospitalised adults requiring short-term catheterisation: multicentre randomised controlled trial and economic evaluation of antimicrobial- and antiseptic-impregnated urethral catheters (the CATHETER trial). **Health Technol Assess**, v.16, n.47, 2012. <https://doi.org/10.3310/hta16470>.

PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet infectious diseases**, v. 12, n. 3, p. 249-253, 2012.

PIGRAU, C. Infecciones del tracto urinario nosocomiales. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.31, n.9, p.614–24, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>

POMARICO L.; CERQUEIRA D.F.; SOARES R.M.A.; SOUZA I.P.R.; CASTRO G.F.B.A.; SOCRANSKY S.; et al. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV – infected children. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v.108 n.2 p.203-10, 2009.

POLLACK, M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease on immunity. **Rev Infect Dis**, v. 5, p. 979-984, 1983.

POZZO, D. M, SANTURIO DF, ROSSATTO L, VARGAS AC, ALVES SH, LORETO ES, VIEGAS J. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus spp*. Isolated from bovine mastitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 63, 1229-1232, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000500026>.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.133–163, 2007.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; KROEGER, J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.150–6, 2008.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **Am J Med** 125: S3–S13, 2012.

PFALLER, M.A.; ANDES, D.R.; DIEKEMA, D.J.; DAVID, L.; HORN, D.L.; ANNETTE, C.; REBOLI, A.C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N.E. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004–2008. **PLoS One**, v.9, 2014.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v.63, n.5, p.569-75, 2003.

RAMANATHAN, R.; DUANE, M. Urinary Tract Infections in Surgical Patients. **Surg Clin North Am**, v.94, n.6, p.1351-68, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.08.007>.

RAO, E.V.S.P., SINGH, M., RAO, R.S.G., RAO, B.R.R. Effect of plant spacing and application of nitrogen fertilizer on herb and essential oil yields of palmarosa (*Cymbopogon martinii* Stapf var. *motia*). **Journal of Agriculture Science**, v. 104, p. 67–70, 1985.

REX CONSORTIUM et al. Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 2, p. 110-118, 2013.

RIBEIRO, VANESSA. BLEY. Detecção de Resistência aos Carbapenêmicos e Avaliação da Produção de *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) em Isolados Clínicos da Família Enterobacteriaceae. Porto Alegre, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

RIBEIRO, S. M., FELICIO, M. R., BOAS, E. V., GONCALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., FRANCO, O. L. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 160, p. 133-144, 2016. Disponível em: DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.02.006.

RUTHERFORD, S.T.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, **New York**, v. 2, n. 2, p. 1-26, Nov. 2012.

SALDANHA, J.T.; Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Set. 2013.

SÁNCHEZ, A.A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.585-590, 2010. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x.

SÁNCHEZ G, AZNAR R. Evaluation of natural compounds of plant origin for inactivation of enteric viruses. **Food and Environmental Virology**; PMID: 25636749, 2015.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, P. 403-434, 2004.

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 de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Produção Animal, Cienc. Rural** 37 (3), Jun 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300031>.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; YEUNG, K.W. Evaluation of polyene-azole antagonism in liquid cultures of *Candida albicans* using an automated turbidometric method. **Chemotherapy**, 47(4):279-291, 2001.

SARTO, M.P.M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade microbiana de óleos essenciais. Revista Uningá, Vol.20,n.1,pp.98-102, Out – Dez, 2014.

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v. 4, n. 2, p. 138-158, 2001.

SIKKEMA, J; BONT;J. A. M., POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev**, 59, 201-222. 1995.

SILVA, R. A.; OLIVEIRA, B. N. L.; SILVA, L. P. A.; OLIVEIRA, M. A.; CHAVES, G. C. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde debate** 44 (126), Jul-Sep. 2020. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWSKI, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb). **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rev. Ceres** 57 (5), Out, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500004>.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 475 p, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1104 p, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, n.4, p. 573-583, 2010.

- SINHA, S.; JOTHIRAMAJAYAM, M.; GHOSH, M. AND MUKHERJEE, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology** 1:71-77, 2014
- SINGH, R. P.; DHANIA, G.; SHARMA, A.; JAIWAL, P. K. Biotechnological approaches to improve phytoremediation efficiency for environment contaminants. In: **Environmental bioremediation technologies**, Singh, S. N.; Tripahti, R. D. (Eds) Springer, 223-258, 2007.
- SOLOMAKOS, N. et al. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 120-127, 2008.
- SOUZA, E. L. de et al. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 387-393, 2009.
- SUBRAMANIAN P, SHANMUGAM N, SIVARAMAN U, KUMAR S, SELVARAJ S. Antibiotic resistance pattern of biofilm forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **Australas Med J** 5(7):344-8, 2012. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2012.1193>.
- SHAPIRA RONI; EFRAT MIMRAN. Isolation and Characterization of *Escherichia coli* Mutants Exhibiting Altered Response to Thymol. **Microbial Drug Resistance** 13(3): 157-165. 2007.
- SCHELZ, Z. M. J., HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Phytotherapy**. 77, 279-285, 2010.
- SMITH, G. R.; RANA, V. S. Variations in essential oil yield, geraniol and geranyl acetate contents in palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. Wats. var. motia) influenced by inflorescence development. **Industrial Crops & Products**, v. 66, p. 150–160, 2015.
- SPERANZA, B., CORBO, M. R. The impact of biofilms on food spoilage. In: The Microbiological Quality of Food. **Woodhead Publishing**. p. 259-282, 2017.
- STARADUMSKYTE DAIVA , ALGIMANTAS PAULAUSKAS. Non-Fermentative Gram-Negative Bacteria in Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection** Vol.6 No.2, 2014.
- STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International **Journal of Medical Microbiology**, Inglaterra, v. 292, n. 2, p. 107-113, jul. 2002.
- STICKLER DJ. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. **J Intern Med**. 276(2):120-9, 2014. <https://doi.org/10.1111/joim.12220>.
- STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, n. 3, p. 187-209, Jan. 2002.
- STRATEVA TANYA ; DANIEL YORDANOV. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Med Microbiol**. vol. 58 no. 9 1133-114. 2009.

SWEET, S. P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral Diseases**. v. 3, p. S88-S95, 1997.

TAIZ L; ZEIGER E. Fisiologia vegetal. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed. 720 p, 2004.

TENKE, P., KÖVES, B.; NAGY, K.; HULTGREN, S.J.; MENDLING, W.; WULLT, B. Update on biofilm infections in the urinary tract. **World J Urol**, v.30, n.1, p.51-7, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00345-011-0689-9>.

TENNYSON, S.; SAMRAJ, D.A.; JEYASUNDAR, D.; CHALIEU, K.. Larvicidal efficacy of plant oils against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). Middle-East **Journal Science and Research**, v.13, p. 64–68, 2013.

TERNAVASIO-DE LA VEGA HG, VENTURA AB, CASTAÑO-ROMERO F, SAUCHELLI FD, ACOSTA AP, RODRÍGUEZ ALCÁZAR FJ et al. Assessment of a multi-modal intervention for the prevention of catheter-associated urinary tract infections. **J Hosp Infect.**; 94(2):175-81;2016. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.07.011>

TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. theae. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 193-196, 2007.

TOSCANO, A. A. P. Avaliação farmacoeconômica de medicamentos antimicrobianos no complexo hospitalar Clementino Fraga. 2014. 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.

TOUTAIN, C. M.; ZEGANS, M. E.; O'TOOLE, G. A. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 771-777, 2005.

THAKKER, M. R.; PARIKH, J. K.; DESAI, M. A. Microwave assisted extraction of essential oil from the leaves of Palmarosa: multi-response optimization and predictive modelling. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 311-319, 2016.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TRENTI D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO A.J.; Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. Programa de Pós graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p.24, set, 2013.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

VAHR, S.; GENG V.; COBUSSEN-BOEKHORST h.; FARRELL J.; GEA-SÁNCHEZ M.; PEARCE I.; et al. Evidence-based Guidelines for Best Practice in Urological

Health Care. Catheterisation: Indwelling catheters in adults Urethral and Suprapubic. **European Association of Urology Nurses (EAUN)**, 2012.

VERMA, A.V.; BHANI, D.; TOMAR, V.; BACHHIWAL, R.; YADAV, S. Differences in bacterial colonization and biofilm formation property of uropathogens between the two most commonly used indwelling urinary catheters. **J Clin Diagn Res**, v.10, n.6, p.01-03, 2016. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20486.7939>.

WANG, S. et al. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharides production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 01237-14, 2014.

WANG, XUAN; CHEN, GONGXIANG; WU, XIAOYAN; WANG, LIANGPING; CAI, JIACHANG; CHAN, EDUARD W.; CHEN, SHENG; ZHANG, RONG. Increased prevalence of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in hospital setting due to cross-species transmission of the blaNDM-1 element and clonal spread of progenitor resistant strains. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. 595, 2015.

WATNICK, P.; KOLTER, R. MINIREVIEW – Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WEBB, J. S.; GIVSKOVY, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 578-585, Dec. 2003.

WEINEL DB, RENNER LD. Physicochemical regulation of biofilm formation. *Mrs bull.* 36(5): 347-355, 2011.

WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C. S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n.3, p.272-276, 2007.

WITTIG, C. et al. Geraniol suppresses angiogenesis by downregulating vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR-2 signaling. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. 1 –19, 2015.

YANG, A. et al. Influence of physical effects on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biophysical journal**, v. 112, n. 7, p. 1462-1471, 2017.

XAVIER, J. B., C. PICIOREANU AND M. C. M. VAN LOOSDRECHT. “Assessment of three-dimensional biofilm models through direct comparison with confocal microscopy imaging.” *Wat Sci Technol* (Accepted for publication), 2003.

XAVIER, J.B., et al., Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, 2005.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 39-56, 1943.

ZHAO, K. et al. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 497, n. 7449, p. 388, 2013.

ZHU, PEIPEI; CHEN, YANXIN; FANG, JING; WANG, ZELIN; XIE, CHUAG; HOU, BAOHONG; CHEN, WEI; XU, FENGXIA. Solubility and solution thermodynamics of thymol in six pure organic solvents. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 92, p. 198–206, 2015.

Artigo aceito

Fator de impacto 1.25

Current Research in Complementary & Alternative Medicine

Baptista CT, et al. Curr Res Complement Altern Med 6: 162.

www.doi.org/10.29011/2577-2201.100062

www.gavinpublishers.com

OPEN ACCESS



GAVIN PUBLISHERS

Review Article

A Systematic Review of Essential Oils' Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Klebsiella pneumoniae*

Cristiane Telles Baptista¹, Milena Mattes Cerveira¹, Victor Barboza dos Santos¹, Edila Maria Kickhofel Ferrer¹, Roger Giusti Miller¹, Thobias Toniolo de Souza¹, Patrícia Daiane Zank¹, Andressa de Oliveira Blanke¹, Vitor Pereira Klein¹, Rafaely Piccioni Rosado¹, Rowena Moreira Silveira¹, Luíze Garcia de Melo¹, Claudio Martin Pereira de Pereira², Leonardo Quintana Lopes³, Janice Luehring Giongo^{1*}, Rodrigo de Almeida Vaucher^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry Research and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBiOM), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

²Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

³Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding Authors:** Janice Luehring Giongo and Rodrigo de Almeida Vaucher, Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Citation: Baptista CT, Cerveira MM, Santos VB, Ferrer EMK, Miller RG, et al. (2022) A Systematic Review of Essential Oils' Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Klebsiella pneumoniae*. Curr Res Compl Alt Med 6: 162. DOI: 10.29011/2577-2201.100062

Received Date: 23 September 2022; **Accepted Date:** 29 September 2022; **Published Date:** 3 October 2022

Manuscrito submetido

Fator de impacto 2.86



Dear Rodrigo de Almeida Vaucher,

Thank you for your submission.

Submission ID **224131015**

Manuscript Title **Essential oils and major constituents activity
against biofilm formed by multidrug-resistant
bacteria in hospital medical material**

Journal **Natural Product Research**

You can check the progress of your submission, and make any requested revisions, on the [Author Portal](#).

Thank you for submitting your work to our journal.
If you have any queries, please get in touch with GNPL-
peerreview@journals.tandf.co.uk.

Kind Regards,
Natural Product Research Editorial Office