

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Grazielle Guidolin Rossi

**ATIVIDADE DO ÓLEO DE *Cymbopogon flexuosus* LIVRE E  
NANOESTRUTURADO FRENTE A MICOBACTÉRIAS DE  
CRESCIMENTO RÁPIDO**

Santa Maria, RS  
2018

**Grazielle Guidolin Rossi**

**ATIVIDADE DO ÓLEO DE *Cymbopogon flexuosus* LIVRE E NANOESTRUTURADO  
FRENTE A MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos  
Coorientador: Prof Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS, Brasil  
2018

Rossi, Grazielle Guidolin Rossi  
ATIVIDADE DO ÓLEO DE *Cymbopogon flexuosus* LIVRE E  
NANOESTRUTURADO FRENTE A MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO  
RÁPIDO / Grazielle Guidolin Rossi Rossi.- 2018.  
61 p.; 30 cm

Orientadora: Marli Matiko Anraku de Campos  
Coorientador: Roberto Christ Vianna Santos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. MCR 2. Resistência 3. Biofilmes 4. Capim-limão 5.  
Nanoemulsão I. Anraku de Campos, Marli Matiko II. Christ  
Vianna Santos, Roberto III. Título.

**Grazielle Guidolin Rossi**

**ATIVIDADE DO ÓLEO DE *Cymbopogon flexuosus* LIVRE E NANOESTRUTURADO  
FRENTE A MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovada em 28 de fevereiro de 2018:**

---

**Marli Matiko Anraku de Campos, Dra. (UFSM)**  
Presidente/Orientador

---

**Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)**  
Coorientador

---

**Paulo Edelvar Correa Peres, Dr. (UFSM)**

---

**Alencar Kolinski Machado, Dr. (UNIFRA)**

Santa Maria, RS  
2018

## RESUMO

### ATIVIDADE DO ÓLEO DE *Cymbopogon flexuosus* LIVRE E NANOESTRUTURADO FRENTE A MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

AUTORA: Grazielle Guidolin Rossi  
ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku de Campos  
COORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) são patógenos emergentes responsáveis por diversas infecções em humanos, embora muitas vezes sejam considerados apenas como contaminantes ou colonizadores. A formação de biofilmes por esses micro-organismos causa grande preocupação para a saúde pública, devido sua maior patogenicidade em humanos e a resistência aos antimicrobianos. As células microbianas dentro do biofilme são protegidas por uma matriz polimérica autoproduzida que retarda a difusão dos antimicrobianos, impedindo que o fármaco penetre nas camadas mais profundas e tenha sua ação efetiva. Deste modo, torna-se importante buscar alternativas eficazes contra a formação de biofilmes. Neste sentido, o uso de produtos biológicos, bem como a utilização de nanoestruturas vêm sendo estudados para o controle de formação e desenvolvimento de biofilmes. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a ação do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon flexuosus* livre e em nanoemulsão sobre cepas de MCR, na forma planctônica e séssil. O OE foi caracterizado quimicamente. A nanoemulsão obtida pelo método de homogeneização sob alta agitação foi caracterizada quanto a sua estabilidade, carga de superfície e tamanho de partícula. Os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de curva de morte foram determinadas contra as cepas padrão de MCR *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) e *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898). A capacidade do óleo e da nanoemulsão em inibir a formação do biofilme e destruí-lo foi avaliada por macrotécnica semi-quantitativa. No ensaio de suscetibilidade dos micro-organismos na forma planctônica, a nanoemulsão apresentou maior atividade microbiana, com valores da CIM inferiores aos apresentados pelo OE livre. No entanto, o OE livre teve ação bactericida, enquanto a nanoestrutura teve somente ação bacteriostática. Na avaliação da atividade contra biofilmes de MCR, ambos foram eficientes na destruição do biofilme já formado, enquanto somente o óleo livre inibiu da formação de biofilme micobacteriano. Os resultados desta dissertação impactam sobre a descoberta de uma nova formulação farmacêutica, capaz de potencializar os efeitos do OE e prejudicar a formação de biofilmes. Ademais, este trabalho estimula o aprofundamento em metodologias que visam esclarecer a influência exercida pelo OE e a nanoemulsão sobre os fatores genéticos e fisiológicos associados à formação de biofilmes.

**Palavras-chave:** MCR. Biofilmes. Capim-limão. Nanoemulsão.

## ABSTRACT

### **OIL ACTIVITY OF FREE AND NANOESTRUCTURED *Cymbopogon flexuosus* IN FRONT OF RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIA**

AUTHOR: GRAZIELLE GUIDOLIN ROSSI  
ADVISER: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS  
CO-ADVISER: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS

Rapidly Growing Mycobacteria (RGM) are emerging pathogens responsible for various human infections, although they are often considered only as contaminants or colonizers. The formation of biofilms by these microorganisms causes great concern for public health, due to its greater pathogenicity in humans and antimicrobial resistance. Microbial cells within the biofilm are protected by an autoproducted polymer matrix that delays the diffusion of antimicrobials, preventing the drug from penetrating the deeper layers and having its effective action. Thus, it is important to seek effective alternatives against the formation of biofilms. In this sense, the use of biological products as well as the use of nanostructures have been studied for the control of formation and development of biofilms. This work had as main objective to evaluate the action of the essential oil (EO) of *Cymbopogon flexuosus* free and in nanoemulsion on strains of RGM, in planktonic and sessile forms. EO was chemically characterized. The nanoemulsion obtained by the homogenization method under high stirring was characterized for its stability, surface charge and particle size. The assays of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and time-kill curve were determined against standard strains of RGM *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898). The ability of the oil and nanoemulsion to inhibit biofilm formation and to destroy it was evaluated by semi-quantitative macro technique. In the susceptibility test of the microorganisms in planktonic form, the nanoemulsion presented higher microbial activity, with MIC values lower than those presented by free EO. However, the free EO had bactericidal action, while the nanostructure had only bacteriostatic action. In the activity evaluation against RGM biofilms, both were efficient in the destruction of the biofilm already formed, while only the free oil inhibited the formation of mycobacterial biofilm. The results of this dissertation impact on the discovery of a new pharmacological formulation, capable of enhancing the effects of EO and impairing the formation of biofilms. In addition, this work stimulates the research in methodologies that aim to clarify the influence exerted by the EO and the nanoemulsion on the genetic and physiological factors associated with the biofilms formation.

**Keywords:** RGM. Biofilms. Lemongrass. Nanoemulsion.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Modelo da disposição do envelope celular micobacteriano .....	15
Figura 2 - Estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano .....	17
Figura 3 - Possíveis locais de ação dos componentes dos OEs na célula bacteriana .....	24
Figura 4 - Estrutura química do Citral.....	25

### ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 - Nanoemulsion containing 5% of lemongrass essential oil in TEM.....	47
Figure 2 - Time-kill curve on <i>M. massiliense</i> (A), <i>M. abscessus</i> (B) and <i>M. fortuitum</i> (C) exposed to several concentrations (based on MIC) of LGNE and free OE. ....	48
Figure 3 - The action of free OE (A, B and C) and LGNE (D, E and F) on biofilm formation by <i>M. massiliense</i> , <i>M. abscessus</i> and <i>M. fortuitum</i> .....	49
Figure 4 - Biofilm destruction of <i>M. massiliense</i> , <i>M. abscessus</i> and <i>M. fortuitum</i> by free EO (A, B and C) and LGNE (D, E and F). ....	50

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon .....	11
--	----

### ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 - Physicochemical characteristics of LGNE and BNE .....	47
---	----

Table 2 - Values of MIC for free EO, LGNE and BNE tested against RGM .....	47
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAR	Álcool-ácido Resistente
AG	Arabinogalactano
Ag85	Antígeno 85
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATP	Adenosina Trifosfato
BAAR	Bacilos Álcool-ácido Resistentes
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMIB	Concentração Mínima de Inibição do Biofilme
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DMT	Dimicolatos de Trealose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GPL	Glicopeptidolipídio
IACS	Infecções Associadas aos Cuidados De Saúde
LAM	Lipoarabinomanana
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MM	Micomembrana
MMT	Monomicolatos de Trealose
MNT	Micobactérias não Tuberculosas
MPI	Manosídeo Fosfatidil-mio-inositol
OE	Óleo Essencial
PG	Peptidoglicano
PL	Fosfolipídios
QS	<i>Quorum sensing</i>
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
TAG	Triacilglicerol
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	9
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 MICOBACTÉRIAS .....	10
1.1.1 Micobactérias de crescimento rápido .....	12
1.1.2 Estrutura celular micobacteriana .....	14
1.2 BIOFILMES .....	15
1.2.1 Fatores que influenciam na formação do biofilme .....	17
1.2.2 Resistência de biofilmes e impacto na área clínica .....	19
1.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DAS MICOBACTERIOSES .....	21
1.3.1 Novos agentes antibacterianos .....	22
1.3.1.1 Óleo Essencial de Capim-limão .....	24
1.3.1.2 Nanotecnologia.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	30
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	30
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

## APRESENTAÇÃO

A seção **INTRODUÇÃO** inclui uma apresentação sobre o assunto investigado e sua relevância, bem como, uma revisão bibliográfica sobre os temas discutidos nesta Dissertação. Os resultados encontram-se no tópico **ARTIGO CIENTÍFICO**, que engloba as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, representando a íntegra deste estudo. O artigo está formatado de acordo com o periódico ao qual foi publicado.

O tópico **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais acerca do conteúdo abordado neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** remetem somente às citações presentes no tópico **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* é constituído de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e pertence à ordem dos Actinomicetales, subordem Corynebacteriacea, família Mycobacteriaceae. Este gênero é classificado em três grupos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* que é responsável por causar a tuberculose, *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase, e as micobactérias não tuberculosas (MNT), responsáveis pelas micobacterioses (FARIA; JOÃO; JORDÃO, 2015; PORVAZNIK; SOLOVIC; MOKRY, 2016; ROBLEDO; MURILLO; ROUZAUD, 2011).

As micobactérias são bacilos aeróbicos não formadores de esporos que se destacam por possuírem uma camada cérea - formada por grande quantidade de ácidos micólicos - e uma parede celular espessa e altamente hidrofóbica, a qual lhes fornece o caráter álcool-ácido resistente (AAR) quando coradas pela fucsina fenicada na coloração de Ziehl-Neelsen. Essas características de superfície implicam na morfologia distinta das colônias, bem como na grande resistência à água, dessecação, antimicrobianos e desinfetantes químicos (BRASIL, 2008; GUGLIELMETTI et al., 2015; PORVAZNIK; SOLOVIC; MOKRY, 2016).

As micobactérias tornaram-se uma grande preocupação para a saúde pública no século 20. A tuberculose e a hanseníase tomaram proporções epidêmicas, dispersando-se em todo o mundo, já as infecções causadas por MNT foram amplamente negligenciadas. No entanto, a partir de 1950, relatos de infecções por MNT começaram a ser documentados. O maior número destas notificações ocorreu devido o controle da tuberculose, dando-se mais importância às micobacterioses, e ao aprimoramento das técnicas de cultura e identificação das MNT (GUGLIELMETTI et al., 2015; MOORE et al., 2010).

Os primeiros relatos de MNT no ambiente de imunossupressão estão associados a pacientes com câncer, em 1976. Da mesma forma, na década de 80, com o cenário da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), as micobacterioses ganharam força, principalmente causadas pelo patógeno *Mycobacterium avium*. Neste momento, a falta de terapia antirretroviral adequada juntamente com o aumento de pacientes imunocomprometidos (transplantados, com terapia imunossupressora ou quimioterapia), dificultou a supressão das micobacterioses (GUGLIELMETTI et al., 2015; HENKLE; WINTHROP, 2015).

Em contraste com a *M. tuberculosis*, não é obrigatório o relato de infecções por MNT, impedindo dados de incidência precisos. Apesar disso, MNT são reconhecidas como agentes etiológicos de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), que também é considerado um importante problema de saúde pública (SOUSA et al., 2015).

As MNT compreendem hoje, um grupo heterogêneo com mais de 150 espécies ambientais comumente isoladas de água, solo, poeira e de animais (KWON; KOH, 2016; KOH, 2017). Algumas MNT são patógenos oportunistas e o ambiente é a suposta fonte de infecção em humanos, já que essas doenças normalmente não são contagiosas (FLORES et al., 2016). As infecções causadas por esse grupo de bacilos normalmente estão associadas a fatores de riscos, podendo ser pulmonares e extrapulmonares; as infecções do trato respiratório estão entre as mais prevalentes, seguidas por linfadenite dos gânglios cêrvico em crianças, infecções disseminadas em pacientes imunodeprimidos e infecções da pele (GUGLIELMETTI et al., 2015; RINDI; GARZELLI, 2016).

Runyon, em 1959, classificou as MNT em quatro grupos distintos, com base no tempo de crescimento, morfologia da colônia, e pigmentação (Tabela 1). Os micro-organismos com tempo de crescimento semelhante ao *M. tuberculosis* (superior a uma semana) são encontrados nos grupos I, II e III, e classificados como de crescimento lento. No grupo IV encontram-se as MNT de crescimento rápido, as quais crescem bem em meios bacteriológicos de rotina em menos de sete dias (PORVAZNIK; SOLOVIC; MOKRY, 2016; TORTOLI, 2003). Os grupos de crescimento lento são ainda diferenciados de acordo com sua capacidade de produzir pigmento: as fotocromogênicas (grupo I) produzem pigmento apenas após exposição à luz; as escotocromogênicas (grupo II) produzem pigmento independentemente da exposição à luz e as não cromogênicas (grupo III) nunca produzem pigmento na obscuridade, mas podem pigmentar-se de amarelo ou rosa quando exposta à luz (TORTOLI, 2006; MOTA, 2011).

Tabela 1 - Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon

(continua)

GRUPOS	ESPÉCIES	TEMPO DE CRESCIMENTO
<b>Grupo I</b>	<i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	Lento

Tabela 1: Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon

(conclusão)

GRUPOS	ESPÉCIES	TEMPO DE CRESCIMENTO
<b>Grupo II</b>	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>	Lento
<b>Grupo III</b>	Complexo <i>M. avium</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. ulcerans</i>	Lento
<b>Grupo IV</b>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. massiliense</i>	Rápido

Fonte: Adaptado de FONTANA (2008).

### 1.1.1 Micobactérias de crescimento rápido

As espécies classificadas como micobactérias de crescimento rápido (MCR) estão reunidas em três grupos, as pertencentes ao complexo *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. houstonense*, *M. bonickei*, *M. septicum*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum* e *M. senegalense*), micobactérias do complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus* (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*), e as que compõem o complexo *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*) (PITOMBO; LUPI; DUARTE, 2009).

Este grupo de micobactérias não pigmentadas são altamente resistentes, sendo capazes de se desenvolver mesmo em ambientes hostis (pouco nutrientes, pH ácido e temperaturas extremas) (DE GROOTE; HUITT, 2006; BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002). Como apresentam certa resistência às práticas de descontaminação com desinfetantes convencionais (cloro, organomercuriais e glutaraldeídos alcalinos), a maioria dos estudos de surtos estão relacionados a procedimentos inadequados de esterilização e/ou desinfecção (DE GROOTE; HUITT, 2006; PITOMBO; LUPI; DUARTE, 2009). A frequente presença desses microorganismos na água de torneira de hospitais, a relativa resistência a agentes esterilizantes, sua habilidade em sobreviver e crescer em água destilada e dentro de amebas, bem como seu

frequente envolvimento na formação de biofilmes contribuem para que espécies de MCR causem IACS (CARDOSO, 2009; SEXTON; HARRISON, 2008).

Entre as espécies de MNT, as micobactérias não pigmentadas são as mais comumente isoladas em laboratórios clínicos, causando doenças que variam de indivíduos saudáveis à imunodeprimidos. Entre o amplo espectro de infecções causadas por esses patógenos oportunistas, encontram-se infecções em cateter, da pele e tecidos moles, respiratórias, do endocárdio, meninges ou infecção óssea e doença disseminada; onde *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium chelonae*, estão entre as espécies mais comumente identificadas (CONAGLEN et al., 2013; ESTEBAN et al., 2008; ESTEBAN; NAVAS, 2017).

Infecções pulmonares por MCR são associados a indivíduos que já apresentam doenças pulmonares estruturais (doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia, sequelas de tuberculose pulmonar prévia e fibrose cística) e entram em contato com aerossóis contendo esses bacilos. Os membros do complexo *M. chelonae-abscessus* são a fonte mais importante para esse tipo de infecção, sendo *M. abscessus* o patógeno mais comumente encontrado (45% a 65%), seguido de *Mycobacterium massiliense* (20% a 55%) e *Mycobacterium bolletii* (1% a 18%). As taxas de resposta à antibioticoterapia são diferentes para cada uma dessas subespécies (FARIA; JOÃO; JORDÃO, 2015; KOH, 2017; MELLO et al., 2013).

*M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* são as principais MCR relatadas em casos de infecções pós-cirúrgicas ou pós-traumáticas, mas novas espécies como *Mycobacterium goodii* e *M. massiliense* foram recentemente relatadas (FARIA; JOÃO; JORDÃO, 2015). Infecções da pele e tecidos moles são causadas pelo uso prolongado de cateteres intravenoso ou peritoneal, procedimentos estéticos (mamoplastia de aumento, lipoaspiração), cirurgias, injeções e colocação de *piercing* de mamilo. O aumento do uso de provedores de medicina alternativa e procedimentos realizados em centros cirúrgicos autônomos sem fiscalização adequada, associados com a utilização de água de torneira não estéril para procedimentos médicos e limpeza inadequada dos instrumentos, resultam no aumento de casos destas infecções (DE GROOTE; HUITT, 2006; FARIA; JOÃO; JORDÃO, 2015; MONEGO et al., 2011).

Infecções relacionadas às MCR foram observadas após procedimentos de tatuagem, e *M. chelonae* foi a espécie mais relatada em casos individuais de infecção e em surtos; há relatos também de casos com *M. abscessus* e *M. fortuitum*. A fonte mais frequente deste tipo de infecção é a diluição de tinta preta com água não estéril, também pode ocorrer durante o processo de fabricação da tinta, na utilização de equipamentos contaminados para aplicação

da tatuagem no estúdio, bem como durante cuidados posteriores da tatuagem pelo indivíduo (CONAGLEN et al., 2013; PHILIPS et al., 2014).

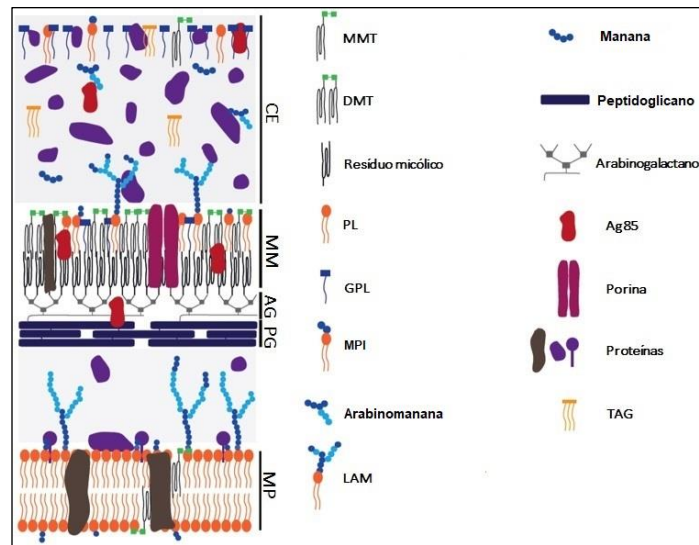
### **1.1.2 Estrutura celular micobacteriana**

As micobactérias, diferentemente das demais bactérias, possuem uma parede celular de constituição química e estrutura complexas, rica em componentes lipídicos. Este envelope incomum fornece às micobactérias notável impermeabilidade às substâncias externas, configurando um importante fator de virulência para estes organismos. Apesar disso, sua composição ainda não é totalmente esclarecida. O modelo mais atual e aceitável divide a parede celular em três partes: camada externa, parede celular e membrana plasmática convencional (CHIARADIA et al., 2017; DAFFÉ, QUÉMARD, MARRAKCHI, 2017).

A composição da camada externa é variável entre as espécies de micobactérias, nos mais patogênicos esta camada é composta de polissacarídeos, além de proteínas ligadas e uma pequena quantidade de lipídeos, que incluem os glicopeptidolipídios (GPLs) e glicolípídios fenólicos. A parede celular, nomeada de complexo tripartite gigante, é formada por três camadas: a micomembrana (MM), arabinogalactano (AG) e peptidoglicano (PG). Este complexo é composto inicialmente por uma camada de PG (ácido N-glicolilmurâmico) responsável por cobrir a membrana citoplasmática. Ligado de forma covalente a eles, estão as cadeias de AG que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos compõem o folheto interno da MM, enquanto que no folheto externo, estão presentes lipídios facilmente removíveis com solventes orgânicos, como fosfolipídios (PL), trecolos de trealose, GPLs e lipoglicanos. A Figura 1 demonstra a complexidade da parede celular das micobactérias (CHIARADIA et al., 2017; DAFFÉ, DRAPER, 1998; DAFFÉ, QUÉMARD, MARRAKCHI, 2017).



Figura 1 - Modelo da disposição do envelope celular micobacteriano



Parede celular de *M. smegmatis*, composta por três camadas: camada mais externa (CE), parede celular e membrana plasmática (MP). A parede celular é dividida em micomembrana (MM), arabinogalactano (AG) e peptidoglicano (PG).

MMT: monomicolatos de trealose; DMT: dimicolatos de trealose; PL: fosfolipídios; GPL: glicopeptidolipídio; MPI: Manosídeo fosfatidil-mio-inositol; LAM: lipoarabinomanana; TAG: triacilglicerol; Ag85: antígeno 85.

Fonte: Adaptado de CHIARADIA et al. (2017)

## 1.2 BIOFILMES

As bactérias são capazes de se adaptar a mudanças indesejáveis do ambiente, como a escassez de nutrientes, condições ambientais extremas e presença de agentes tóxicos. Neste contexto, a formação de biofilmes representa um exemplo desta adaptação (SIMÕES, 2011). Micro-organismos em biofilmes apresentam comportamento diferente em relação a sua forma planctônica (suspensos e dispersos no meio aquoso), principalmente no que diz respeito às taxas de crescimento e suscetibilidade aos tratamentos antimicrobianos (DONLAN, 2001; SIMÕES, 2011).

Biofilmes se desenvolvem quando os micro-organismos aderem irreversivelmente a uma superfície biótica ou abiótica, produzindo polímeros extracelulares que facilitam a adesão e a formação da matriz estrutural (SIMÕES, 2011). Compreendidos por comunidades microbianas, os biofilmes são compostos principalmente de água e substâncias poliméricas extracelulares (SPE) ou matriz exopolissacarídica, além da presença de outras macromoléculas essenciais como os ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, lipídeos e íons. A presença destes componentes forma uma estrutura porosa e altamente hidratada, contribuindo

para a permanência e sobrevivência dos micro-organismos em condições hostis (OLIVEIRA, 2011; VASUDEVAN, 2014).

A matriz exopolissacarídica é o material extracelular que engloba todo o biofilme, sendo, em média, 90% de sua massa seca. Composta principalmente por polissacarídeos, as SPE são as responsáveis pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes. Do mesmo modo, sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas, assim como condiciona a vasta gama de vantagens a este modo de vida (BAZAKA et al., 2012; FLEMMING; WINGENDER, 2010; GARNETT; MATTHEWS, 2013).

A matriz do biofilme confere um ambiente protetor às células microbianas, dificultando a atuação de agentes germicidas e agindo como uma barreira de filtragem, gerando uma penetração lenta ou reduzida de agentes antimicrobianos em geral, quer sejam antibióticos ou biocidas. A matriz também protege os micro-organismos contra a dessecação, oxidação, radiação ultravioleta e defesa imunitária (BONEZ et al., 2013; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

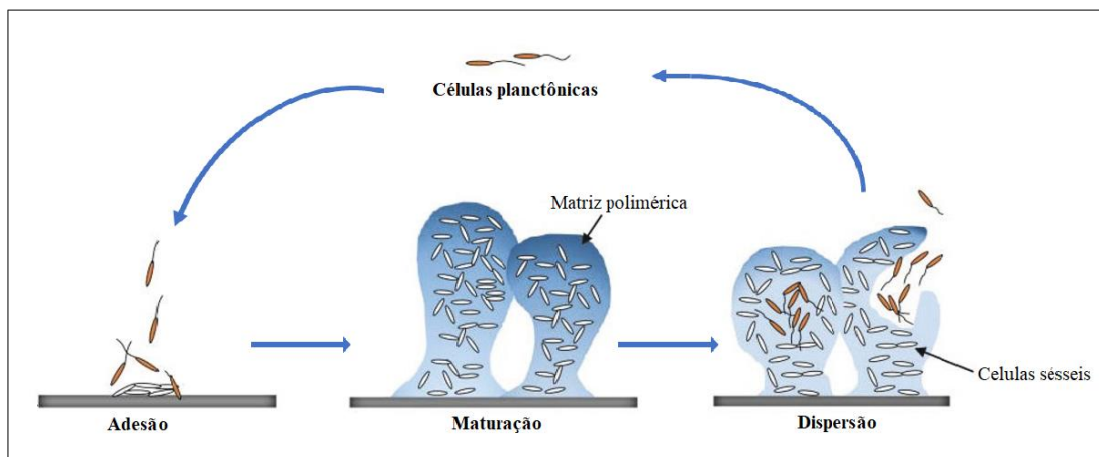
Estas comunidades biológicas de elevado grau de organização são altamente hidratadas (compostas por 98% de água) e apresentam "canais" de água que permitem o transporte de nutrientes essenciais e de oxigênio para as células em crescimento dentro do biofilme (DONLAN, 2001a; VASUDEVAN, 2014). A aproximação das células, proporcionada pelas SPE, corrobora para a troca de genes entre as bactérias, favorecendo assim sua sobrevivência e contribuindo para uma elevada frequência de mutações, responsáveis pela resistência antimicrobiana. Com estas mutações, o micro-organismo pode obter alterações no alvo do antimicrobiano, produzir bomba de efluxo e novas enzimas que conferem resistência (SIMÕES, 2011; SOUSA et al., 2015; VAN INGEN et al., 2009).

Esta coesão entre células se dá através de diferentes tipos de forças, como as ligações de hidrogênio e atração eletrostática, que permite interações intensas, incluindo a comunicação célula-célula (FLEMMING; WINGENDER, 2010; VASUDEVAN, 2014). A comunicação entre as células ocorre através da produção e detecção de moléculas químicas, conhecidas como autoindutoras. Este modo de organização é denominado de “*quorum sensing*” (QS), que permitem à interação intra e interespecies bacterianas, procurando estabelecer à coordenação das atividades dentro do biofilme em resposta a densidade celular. Entre os processos regulados por QS estão agregação, formação de biofilmes, bioluminescência e esporulação (BHARDWAJ; VINOTHKUMAR; RAJPARA, 2013; PÉREZ-VELÁZQUEZ; GÖLGELI; GARCÍA-CONTRERAS, 2016).

### 1.2.1 Fatores que influenciam na formação do biofilme

A formação do biofilme ocorre basicamente em três etapas, ligação, maturação e dispersão, que são mediadas por vários processos biológicos, químicos e físicos (Figura 2). A primeira fase envolve a aderência bacteriana a um substrato, inicialmente de forma reversível e, após a divisão dos micro-organismos e a formação de microcolônias, tornam-se associadas de forma irreversível. Na segunda etapa inicia-se o processo de maturação do biofilme. Após o contato da bactéria com a superfície, são desencadeados estímulos que conduzem a alterações na expressão de genes bacterianos implicados na formação da matriz extracelular. No terceiro passo, o biofilme atinge uma etapa de amadurecimento, e aqui ocorre a “fuga” do micro-organismo a partir da matriz, se desprendendo e colonizando novos ambientes. A dispersão do biofilme pode ser influenciada por vários fatores, incluindo alterações na disponibilidade de nutrientes, oscilação de oxigênio e outras condições indutoras de estresse (GARNETT; MATTHEWS, 2013; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Figura 2 - Estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano



Inicialmente ocorre a fase de adesão do micro-organismo a uma superfície, primeiro reversivelmente e em seguida de forma irreversível. Por meio da produção de exopolissacarídeos inicia-se o processo de maturação e estabilização do biofilme. Por fim, ocorre o estágio de destruturação do biofilme e dispersão das células que darão início a novos biofilmes em outros sítios de adesão.

Fonte: Adaptado de LI, LEE (2017).

Diversos fatores contribuem para a adesão da bactéria à superfície. Dentre eles estão as características dos micro-organismos como espécie, concentração, produção de SPE, hidrofobicidade e apêndices. A presença de apêndices, como flagelo, fimbria e pili, permite

uma adesão mais permanente da célula na superfície, fazendo com que haja a superação das forças repulsivas comuns aos materiais. As características do local de adesão, como porosidade e aspereza, também influenciam na formação do biofilme, além de elementos como pH, temperatura, pressão e oxigênio (DONLAN, 2001a; GUPTA et al., 2016; JAMAL et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Apesar de não possuir flagelos, a presença de GPLs na camada exterior do envelope celular micobacteriano, proporciona às micobactérias uma motilidade deslizante. Assim, estes micro-organismos podem colonizar superfícies, tanto do ambiente quanto do hospedeiro, e formar biofilmes (MAYA-HOYO et al., 2015; RECHT et al., 2000). A maioria dos genes associados com a formação de biofilme estão envolvidos na biossíntese de GPL. Por conseguinte, alterações na síntese de GPL podem prejudicar a aderência do micro-organismo e o estabelecimento inicial do biofilme (SCHOREY; SWEET, 2008; YAMAZAKI et al., 2006). Mutantes defeituosos para a motilidade deslizante e/ou formação de biofilmes demonstraram defeitos na biossíntese da cadeia de carboidratos do GPL (YAMAZAKI et al., 2006). Em *M. smegmatis*, a formação do biofilme é significativamente afetada pela exclusão ou alteração dos GPLs (RECHT et al., 2000; RECHT; KOLTER, 2001). Resultado semelhante também foi encontrado para *M. abscessus* (HOWARD et al., 2006).

GPLs são moléculas anfífilas relativamente importantes produzidas pela maioria das espécies de MNTs, incluindo *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. abscessus* e *M. fortuitum* (MAYA-HOYOS et al., 2015; PANG et al., 2013). Além da influência na motilidade deslizante e formação de biofilmes, os GPLs também têm relação com a morfologia das colônias, modulação imune e virulência (SCHOREY; SWEET, 2008). Verificou-se que *M. abscessus* cresce com morfologia rugosa ou lisa. A forma lisa é capaz de expressar GPL e formar biofilmes, mas não é invasiva. Já a forma rugosa apresenta quantidades mínimas de GPL e é incapaz de formar biofilmes, mas é capaz de invadir os macrófagos e causar infecção persistente em camundongos. Cepas de *M. abscessus* podem mudar bidirecionalmente a partir da morfologia rugosa para o morfotipo liso. Esta capacidade permite que *M. abscessus* possa fazer a transição de um colonizador não invasivo residente em vias respiratórias humanas a um patógeno humano capaz de invadir o pulmão e se disseminar através do organismo. Especula-se que uma variante rugosa surgiria a partir de uma estirpe lisa colonizadora das vias aéreas. Isso poderia ocorrer visto que variantes lisas formam biofilmes, mas produzem uma resposta imune inata mínima, em contraste com variantes rugosas (GREENDYKE; BYRD, 2008, HOWARD et al., 2006).

Desta forma, os componentes da parede celular micobacteriana não configuram apenas uma barreira física que protege os micro-organismos da resposta imune do paciente e da ação dos antimicrobianos, mas também estão envolvidos na formação de biofilmes (LEE et al., 2017). Além dos GPLs, que apresentam um papel importante no desenvolvimento dos biofilmes, outros lipídios da parede celular também têm sido implicados em biofilmes micobacterianos (FREEMAN, 2006). Os ácidos micólicos, mais abundantes no modo de vida em biofilme do que em células planctônicas, conferem coesão e estrutura a essas comunidades de célula, estando intimamente associado com as fases finais de maturação de biofilmes (OJHA et al., 2008). Esses ácidos graxos de cadeia longa são sintetizados pelo sistema do FAS-II que possuem os genes *inhA* e *kasB*, assim como GroEL1 envolvidos (OJHA et al., 2005; OJHA et al., 2010). Além disso, os TAG são utilizados como uma fonte de carbono intracelular durante o crescimento em biofilme, em condições de escassez de nutrientes (OJHA et al., 2008).

### **1.2.2 Resistência de biofilmes e impacto na área clínica**

A resistência bacteriana é um mecanismo adaptativo de preservação da espécie, que dificulta o tratamento de infecções em todo o mundo, especialmente quando a resistência é a nível celular e de comunidade em conjunto (CHEN et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016). Além de constituir um enorme ônus financeiro aos serviços de saúde, a resistência antimicrobiana é responsável por milhares de mortes por infecções persistentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

Dentre os distintos mecanismos de resistência atribuídos aos micro-organismos está a capacidade de formação de biofilmes. Esta estratégia de sobrevivência bem-sucedida acarreta em uma redução da eficácia de terapias com antibacterianos, sendo necessárias doses com concentrações 10 a 1000 vezes maiores que as utilizadas para as mesmas espécies em estado planctônico (DEL POZO, 2018; ESTEBAN; NAVAS, 2017; KAPLAN, 2011).

Dentre as hipóteses que tentam justificar os possíveis mecanismos de resistência das bactérias em biofilme, está a redução da difusão dos antimicrobianos sobre sua matriz. As SPE agem como uma barreira de filtragem, podendo comprometer o antimicrobiano enquanto penetra o biofilme, reduzindo assim sua ação (DONLAN, 2001a; FLEMMING; WINGENDER, 2010; GUPTA et al., 2016). Pressupõe-se, também, que as células residentes dentro da estrutura do biofilme poderiam se adaptar ao meio de proteção e poderiam se transformar em um fenótipo mais resistente (GUPTA et al., 2016).

O microambiente que rodeia as células, também tem sido sugerido como um fator intrínseco para a resistência antimicrobiana de biofilmes. Em camadas mais profundas, o ambiente se torna anaeróbico, o pH reduz devido ao acúmulo de resíduos ácidos e podem existir zonas metabolicamente inativas. Em condições de estresse osmótico, ocorre a redução de porinas na membrana, que limita o transporte de alguns antibióticos no interior da célula (GUPTA et al., 2016). Além dessas condições desfavoráveis criada pela matriz, a redução das taxas de crescimento devido à falta de nutrientes e presença de substâncias tóxicas, minimiza o percentual de agentes antimicrobianos que são levados para dentro da célula e, por conseguinte, afeta a cinética de inativação (DONLAN, 2001a; GUPTA et al., 2016; SOUSA et al., 2015).

A onipresença de biofilmes pode causar problemas significativos na saúde pública, medicina e indústria. Em ambientes clínicos, este perfil de resistência pode se desenvolver em superfícies do tecido humano e dispositivos médicos de uso interno e externo (RIBEIRO et al., 2016; SIMÕES, 2011). Atualmente, acredita-se que mais de 80% das doenças infecciosas crônicas são mediadas por biofilmes, e o seu desenvolvimento em dispositivos médicos como próteses ortopédicas, cateteres, lentes de contato e dentaduras são comuns e geram grande preocupação para a saúde pública, uma vez que os antimicrobianos enfrentam dificuldades para exercer sua ação devido a barreira imposta pela estrutura compacta do biofilme (BAZAKA et al., 2012; LI; LEE, 2017; SIMÕES, 2011).

Além de possuir uma parede celular altamente hidrofóbica que contribui para sua virulência e resistência, a capacidade de formação de biofilme pelas micobactérias confere ainda mais vantagens a estes micro-organismos (XIANG et al., 2014). Um estudo de Steed & Falkinham (2006), relata a baixa susceptibilidade das cepas de *M. avium* e *Mycobacterium intracellulare* ao cloro nas células em biofilmes em relação as células em estado planctônico. A combinação de alta hidrofobicidade deste tipo de micro-organismo, juntamente com a resistência ao cloro e aos metais pesados, justifica a prevalência de casos de biofilmes de MNTs em sistemas de distribuição de água potável, especialmente em tubos de cobre e galvanizados.

Em testes com antimicrobianos utilizados como terapia alternativa para MCR, Flores et al. (2016) mostraram a eficácia comprometida destas opções terapêuticas na inibição e destruição de biofilmes de *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense*. Neste contexto, vários outros estudos comprovam a redução da eficácia terapêutica frente a essa adaptação bacteriana. Biofilme de *M. avium* cultivado em um cateter é significativamente mais resistente à claritromicina e à rifamicina em relação as mesmas no estado planctônico (FALKINHAM,

2007). Do mesmo modo, *M. smegmatis* em sua forma sésil necessita de concentrações de isoniazida 8 vezes maiores do que a sua contraparte planctônica (TENG, DICK, 2003). Claritromicina, azitromicina e moxifloxacina são eficazes contra a formação do biofilme de *M. avium*, mas não em sua destruição (CARTER; YOUNG; BERMUDEZ, 2004). Greendyke & Byrd (2008) descreveram apenas um efeito bacteriostático da amicacina em biofilmes maduros de *M. abscessus*, enquanto a claritromicina é relativamente inativa.

### 1.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DAS MICOBACTERIOSES

Biofilmes constituem um escudo contra as agressões externas, incluindo o tratamento antimicrobiano e reações imunológicas. Além de serem mais resistentes ao tratamento, necessitando de doses mais elevadas e um maior tempo de uso, a maioria dos antimicrobianos disponíveis são direcionados a bactérias no estado planctônico (RIBEIRO et al., 2016; SOTO, 2013).

As doenças ocasionadas por MNT são nomeadas micobacterioses (FLORES et al., 2016) e seu tratamento é complexo, pois passa por um demorado processo de identificação e determinação de sensibilidade *in vitro* aos antibióticos. Além disso, são naturalmente resistentes ou possuem pouca sensibilidade aos fármacos tuberculostáticos. Esses fatores e um baixo índice de suspeita clínica muitas vezes resultam em tratamento ineficiente de infecções por MNT (AUNG et al., 2016; WILDNER et al., 2011). Estes patógenos oportunistas geralmente são testados contra macrolídeos, quinolonas, cotrimoxazol, tetraciclina, aminoglicosídeos, linezolida, tigeciclina e alguns betalactâmicos (cefexitina, imipenem) (ESTEBAN; NAVAS, 2017).

A terapia na maioria das vezes envolve mais de um fármaco, visando evitar a seleção de cepas resistentes. O número de fármacos utilizados deve ser mantido por todo o tempo de tratamento, o qual não deve ser inferior a 18 meses. Dentre as micobactérias mais resistentes estão as do complexo *M. chelonae-abscessus*, MAC e *M. fortuitum*, que exigem, com frequência, poliquimioterapia com quatro a cinco fármacos (VICENTE, 2003).

Para o tratamento das MNT de crescimento lento, é recomendada a utilização de macrolídeos (especialmente claritromicina e azitromicina) para *M. avium* e rifampicina para *Mycobacterium kansasii* (VAN INGEN; KUIJPER, 2014; KWON; KOH, 2016). Em casos de isolados resistentes a rifampicina, ocorre a substituição por agentes secundários, como rifabutina, etambutol, isoniazida, claritromicina, fluoroquinolonas, amicacina e sulfonamidas, por meio de testes de susceptibilidade *in vitro* (KWON; KOH, 2016).

Para algumas espécies de MCR, como as pertencentes ao complexo *M. fortuitum*, os avanços na terapia antimicrobiana, incluindo os macrolídeos, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (linezolida), melhoraram as opções terapêuticas. Enquanto para outras micobactérias, especialmente *M. abscessus*, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de melhores, mais eficazes e seguros antimicrobianos orais (BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002, GUGLIELMETTI et al., 2015).

As espécies pertencentes ao complexo *M. chelonae-abscessus* apresentam teste de susceptibilidade *in vitro* difícil e duvidoso (KWON; KOH, 2016). *M. abscessus* possui uma elevada resistência natural à maioria das classes de antimicrobianos. Etambutol, rifampicina, isoniazida e pirazinamida, que são os medicamentos antituberculose de primeira linha, não apresentam atividade frente a esse micro-organismo (KASPERBAUER; DE GROOTE, 2015). Infecções causadas por esse agente podem ser tratadas com uso de um macrolídeo (azitromicina), um aminoglicosídeo (amicacina) e, pelo menos, outro antimicrobiano de classe diferente. A forma pulmonar da infecção requer um tratamento cirúrgico associado ao tratamento medicamentoso por período prolongado (GRIFFITH et al., 2007, HARRIS; KENNA, 2014; ESTEBAN; NAVAS, 2017).

Quanto à resposta aos tratamentos pulmonares por MNT, as taxas são preocupantes. Para os representantes do MAC cerca de 70-80% dos tratamentos sofrem a conversão da cultura prolongada (permanecer negativo durante e após o tratamento), enquanto para outras espécies como *M. abscessus*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium simiae* esse número cai para 40-50% (VAN INGEN; KUIJPER, 2014). Ainda neste contexto, macrolídeos que muitas vezes são os únicos agentes orais ativos contra complexo *M. chelonae-abscessus* já apresentam resistência induzida em *M. abscessus* (KWON; KOH, 2016). Essa resistência ocorrer devido à metilação de um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal (HARRIS; KENNA, 2014).

### **1.3.1 Novos agentes antibacterianos**

Apesar das tentativas da indústria farmacêutica em desenvolver novos produtos antimicrobianos para o tratamento de infecções resistentes, ainda existe um número limitado de antimicrobianos que são eficazes na presença de biofilmes. Novas abordagens de terapias vêm surgindo para tentar suprir a resistência e a falta de antimicrobianos adequados. O uso de produtos biológicos, como enzimas, metabólitos microbianos, bacteriófagos e produtos do



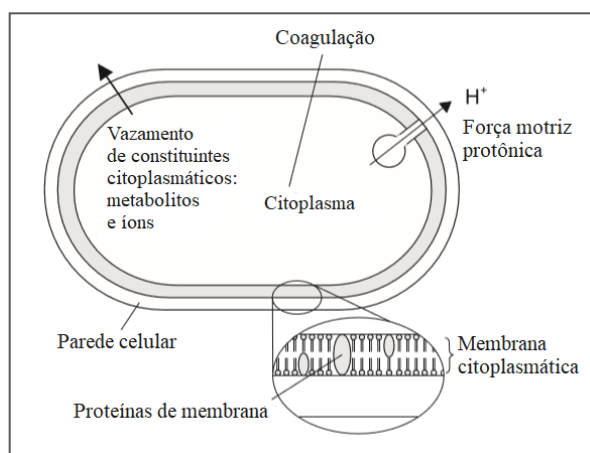
metabolismo secundário de plantas, é sugerido para controle de formação e desenvolvimento de biofilmes (SIMÕES, 2011).

Óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos voláteis produzidos pelas plantas sob a forma de metabólitos secundários. Eles podem ser obtidos de diferentes partes da planta, especialmente folhas e flores, sendo o processo de destilação a vapor o mais comumente utilizado para produção industrial. Os OEs são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e de perfumaria (NAZZARO et al., 2017; PADALIA et al., 2015; RAI et al., 2017). Além disso, essas substâncias naturais apresentam várias atividades biológicas como antibacteriana (LAKEHAL et al., 2016; MEKONNEN et al. 2016), antifúngica (KALEMBA; KUNICKA, 2003; SHARMA; TRIPATHI, 2008), antiviral (POURGHANBARI et al., 2016; SHARIFI-RAD et al., 2017), inseticida (CHAABAN et al. 2017; ZHA; WANG; LI, 2017), antioxidante (SMERIGLIO et al. 2017; ZHAO et al. 2018) e anti-inflamatórios (HAN; PARKER, 2017; LEE et al., 2018).

O amplo espectro de atividade destes compostos naturais pode ser atribuído à complexidade e variabilidade de sua composição química. Vários esforços têm sido feitos para utilizá-los como tratamento de infecções microbianas (RAI et al., 2017). OE de salsa, por exemplo, apresenta ação frente à *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella entérica* (LINDE et al., 2016), OE de cravo atua contra *Campylobacter jejuni* (KOVÁCS et al., 2016), OE de canela sobre *Candida* sp. (PIRES et al., 2011) e OE de limoeiro contra *L. monocytogenes* (DE OLIVEIRA et al., 2010).

A atividade dos OEs depende de sua composição, dos grupos funcionais presentes nos componentes ativos e suas interações sinérgicas. Quimicamente, seus principais representantes são derivados de terpenos, terpenóides, fenóis, aldeídos alifáticos e aromáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular. Considera-se que devido ao grande número de constituintes ativos, a sua atividade antibacteriana não é atribuída a um local de ação específico, mas sim a vários alvos na célula (Figura 3). Além disso, acredita-se que até mesmo as substâncias que estão em menor concentração contribuem para sua atividade, possivelmente através da produção de um efeito sinérgico com outros constituintes. Os mecanismos de ação dos OEs na célula bacteriana estão em sua maioria associados a membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzimo-dependentes (BURT, 2004; DHIFI, et al. 2016; PADALIA et al., 2015; RAI et al., 2017).

Figura 3 - Possíveis locais de ação dos componentes dos OEs na célula bacteriana



Os mecanismos de ação do OE na célula bacteriana incluem a degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática e às proteínas da membrana, vazamento de conteúdos celulares, coagulação do citoplasma e depleção da força motora do próton.

Fonte: Adaptado de BURT et al. (2004)

Ainda neste contexto, a elevada hidrofobicidade juntamente com o baixo peso molecular destes compostos, lhes permitem interagir com os ácidos graxos da membrana celular bacteriana, perturbando a sua estrutura e tornando-a mais permeável, podendo acarretar em vazamento de íons e outros conteúdos celulares. Estes mecanismos variam de acordo com o tipo de OE ou cepa de micro-organismo utilizada. Geralmente, bactérias Gram positivas são mais suscetíveis aos OEs em relação às Gram negativas. A membrana externa dos micro-organismos Gram negativos contém lipopolissacarídeos hidrofílicos que atuam como uma barreira para macromoléculas e substâncias natureza lipofílica, proporcionando assim maior tolerância a compostos antimicrobianos hidrofóbicos, como os encontrados em OEs. Além disso, as extremidades lipofílicas de ácidos lipoteicóicos, presentes na superfície da membrana celular de bactérias Gram positivas, podem facilitar a interação com os OEs (BURT, 2004, PANDEY, 2017; RAI et al., 2017).

### 1.3.1.1 Óleo Essencial de Capim-limão

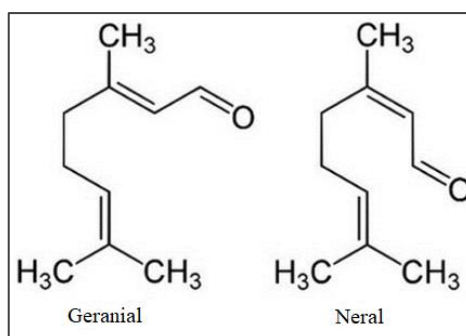
A espécie *Cymbopogon flexuosus* Stapf. é uma planta pertencente à família Poaceae, conhecida popularmente como capim-limão (MAY et al., 2008). *C. flexuosus* é natural da Índia Oriental, mas se desenvolve também em todo Brasil, se caracteriza por ser uma planta herbácea, aromática e perene. Sua aplicação para fins medicinais é vastamente empregada

pela população, sendo utilizada como anti-inflamatório, anti-hipertensivo, antitumoral e eficaz no tratamento da irritabilidade gástrica (DESAI; PARIKH, 2012; MAY et al., 2008).

O principal constituinte do OE de capim-limão é o citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), um aldeído de monoterpreno frequentemente presente sob a forma de mistura de seus isômeros geranial e neral (Figura 4). Este componente, que representa cerca de 61% da composição do óleo, é o responsável pelo aroma de limão desta espécie, servindo de matéria prima para a indústria cosmética e alimentícia (DESAI; PARIKH, 2012; KUMAR et al., 2009, SHI et al., 2016). Alguns estudos sobre sua atividade são relatados na literatura, e mostram que o citral tem efeitos anti-inflamatórios (ORTIZ et al., 2010), anticorrosivos (KORENBLUM et al., 2013), anticancerígeno (SHARMA et al., 2009) e larvicida (VERA et al., 2014). Além disso, há evidências crescentes de que este composto atua como agente fungicida (SADDIQ; KHAYYAT, 2010; TAMPIERI et al., 2005) e bactericida (ADUKWU et al. 2016, ADUKWU; ALLEN; PHILLIPS, 2012).

Os terpenos são hidrocarbonetos naturais que se classificam de acordo com o número de resíduos de isopreno ( $C_5H_8$ ) que apresentam. Dentre seus representantes estão os monoterprenos ( $C_{10}H_{16}$ ) e sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), além de terpenos de cadeias mais longas como diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ) e triterpenos ( $C_{30}H_{40}$ ), todos sintetizados no citoplasma das células da planta através da via do ácido mevalônico, a partir do acetil-CoA. Estes compostos isoprenóides são os principais constituintes dos OEs, sendo responsáveis por várias características químicas e propriedades biológicas (HABTEMARIAM, 2017; NAZZARO et al., 2017).

Figura 4 - Estrutura química do Citral



O Citral é formado pela mistura de dois isômeros: o isômero E é conhecido como geranial ou citral A e o isômero Z é conhecido como neral ou citral B.

Fonte: Adaptado de DHIFI et al. (2016)

Obtidos a partir da união de duas unidades de isopreno, os monoterpenos constituem certa de 90% dos OEs. Por possuírem estruturas terpênicas de menor massa molecular, os monoterpenos juntamente com o sesquiterpenos, se destacam por apresentar uma volatilidade acentuada. Essa última característica, por sua vez, apresenta grande importância para o aroma dos produtos naturais, particularmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014). A ação antibacteriana dos monoterpenos envolve principalmente efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular. Como resultado do seu carácter lipofílico, os monoterpenos preferencialmente se deslocam da fase aquosa para as estruturas de membrana, resultando na acumulação dos constituintes do OE em sua bicamada lipídica. Esse acúmulo perturba a integridade estrutural da membrana celular, alterando assim a permeabilidade da mesma, o que provoca vazamento de eletrólitos e perda de conteúdo intracelular vital, como proteínas, açúcares redutores, ATP e DNA, enquanto inibe a geração de energia e as enzimas relacionadas, podendo levar a morte da célula (DE OLIVEIRA, 2010; TROMBETTA et al., 2005).

Em estudo anterior, demonstrou-se a ação do citral sobre a célula microbiana de *Cronobacter sakazakii*. O citral foi capaz de danificar a membrana celular microbiana, evidenciado pela diminuição da concentração de ATP e pH intracelular, além da hiperpolarização da membrana (SHI et al., 2016). Da mesma maneira, ratificou-se que o citral foi capaz de inibir a ação de bomba de efluxo em estirpe de *S. aureus* (GUPTA et al, 2017).

### 1.3.1.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia também tem sido sugerida como estratégia de combate aos mecanismos de resistência dos patógenos (SANS-SERRAMITJANA et al., 2015). A razão pela qual estas moléculas são estudadas e testadas contra infecções, se dá devido suas propriedades (RIBEIRO et al., 2016). O seu tamanho em nanoescala a torna compatível com biomoléculas e sistemas celulares bacterianos, fornecendo as interações da nanoestrutura com os micro-organismos. Ainda nesse contexto, o seu tamanho reduzido resulta em uma área superficial elevada, proporcionando uma alta carga de agentes terapêuticos (GUPTA et al., 2016).

Acredita-se que é improvável o desenvolvimento de resistência a essa nova abordagem antimicrobiana. Seria necessário que o micro-organismo sofresse várias mutações genéticas para suprimir os múltiplos mecanismos simultâneos de ação da nanoestrutura (PELGRIFTA; FRIEDMAN, 2013). Esta tecnologia aumenta a absorção do fármaco, diminui o efluxo do

antimicrobiano e tem uma maior atuação sobre o biofilme formado, fornecendo, por conseguinte, uma maneira de superar mecanismos comuns de resistência a antibióticos (PELGRIFTA; FRIEDMAN, 2013; RIBEIRO et al., 2016; SANS-SERRAMITJANA et al., 2015).

As nanoemulsões, nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas), lipossomas e as nanopartículas lipídicas sólidas constituem os sistemas carreadores nanoestruturados de maior interesse na área farmacêutica (SCHAFFAZICK et al., 2003; SINGH; LILLARD, 2009). As nanoemulsões se caracterizam pela dispersão do óleo em água, estabilizadas por um emulsificante e finalizadas por um processo de redução de tamanho, fornecendo um sistema mais estável que uma emulsão. Com uma faixa de tamanho que varia entre 10-500 nm, as gotículas dispersas em uma nanoemulsão apresentam uma significativa estabilização estérica entre elas, proporcionando uma elevada estabilidade cinética que pode ter anos de duração. Deste modo, pode-se dizer que a estabilidade física a longo prazo é consequência direta do pequeno tamanho de gotícula, o que acaba prejudicando os fenômenos de desestabilização convencionais (BILIA et al., 2014; DONSI; FERRARI, 2016, SINGH et al., 2017).

Ainda neste contexto, a incorporação do OE em sistemas de nanoemulsão, pode suprir algumas limitações tecnológicas destas substâncias, como a alta volatilidade e a fácil degradação quando expostos diretamente ao calor, umidade, luz ou oxigênio. Da mesma forma, nestes sistemas os OEs tornam-se mais miscíveis em água acarretando na melhora de sua biodisponibilidade, reduzindo também a sua toxicidade e a degradação por enzimas. Sugere-se que o aumento da atividade antimicrobiana das moléculas lipofílicas encapsuladas na nanoemulsão ocorre devido ao aumento de sua área superficial e à exposição dos grupos hidrofílicos das moléculas do emulsificante, o que proporciona um transporte eficiente através das proteínas da membrana externa. Esta tecnologia, além de reforçar o potencial antimicrobiano dos OEs, representa uma abordagem promissora, garantindo a liberação lenta e controlada do óleo (BILIA et al., 2014; DONSI; FERRARI, 2016; RAI et al., 2017; SUGUMAR et al., 2013).

Anwer et al. (2014) avaliaram e compararam a ação antimicrobiana do OE de cravo livre e nanoestruturado. Os compostos foram testados frente a cinco cepas bacterianas: *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*; foi verificado que os efeitos antibacterianos da nanoemulsão eram superiores ao óleo livre. Moghimi et al. (2016) também comprovaram a melhor atividade antimicrobiana da nanoemulsão do OE de *Thymus daenensis*, em relação ao óleo livre.

Em um estudo de Li et al. (2016), mostrou-se a atividade antifúngica e antibacteriana *in vitro* e *in vivo* da nanoemulsão do óleo derivado de *Melaleuca artemifolia*. A nanoemulsão apresentou elevada atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *Candida albicans*. A ação *in vivo* do óleo nanoestruturado, proporcionou melhor efeito antifúngico que o fluconazol, sobre os modelos de rato com pneumonia fúngica. No tratamento da pneumonia bacteriana, a nanoemulsão apresentou ligeiramente menor eficácia terapêutica que a penicilina, embora foi testada em dose muito mais baixa. Nanopartículas deste mesmo óleo também apresentaram atividade frente a MCR (DE SOUZA et al., 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de *C. flexuosus*, na sua forma livre e em nanoemulsão contendo 5% do óleo, contra cepas de micobactérias de crescimento rápido.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Caracterizar quimicamente o OE de *C. flexuosus*;
- 2.2.2 Desenvolver a nanoemulsão de óleo de capim-limão e caracterizá-la quanto a sua estabilidade, carga de superfície e tamanho de partícula;
- 2.2.3 Definir as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do óleo de *C. flexuosus* e da nanoemulsão sobre a MCR;
- 2.2.4 Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo livre e nanoestruturado frente as cepas;
- 2.2.5 Determinar a Concentração Mínima De Inibição Do Biofilme (CMIB) do óleo livre e da nanoemulsão;
- 2.2.6 Avaliar a destruição do biofilme de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum* pelo óleo de *C. flexuosus* livre e em nanoemulsão contendo 5% do OE.

### 3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

A publicação científica inclui um artigo publicado no periódico *Microbial Pathogenesis* e que está formatado de acordo com as normas exigidas pelo mesmo, acessadas no site: <https://www.elsevier.com/journals/microbial-pathogenesis/0882-4010/guide-for-authors>.

#### 3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

**Título: Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria**

Autores: Grazielle Guidolin Rossi, Kevim Bordignon Guterres , Pauline Cordenonsi Bonez, Samanta da Silva Gundel, Vanessa Albertina Aggertt, Fallon Santos Siqueira, Aline Ferreira Ourique, Roger Wagnerd, Bruna Klein, Roberto Christ Vianna Santos, Marli Matiko Anraku de Campos.

Artigo publicado no periódico *Microbial Pathogenesis* (Fator de impacto: 2,009, Qualis B2) (Microbial Pathogenesis, v. 113, p. 335-341, 2017) Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.002>



## Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria

Grazille Guidolin Rossi<sup>a</sup>, Kevim Bordignon Guterres<sup>a</sup>, Pauline Cordenonsi Bonez<sup>a</sup>, Samanta da Silva Gundel<sup>b</sup>, Vanessa Albertina Aggertt<sup>a</sup>, Fallon Siqueira dos Santos<sup>a</sup>, Aline Ferreira Ourique<sup>b</sup>, Roger Wagner<sup>c</sup>, Bruna Klein<sup>c</sup>, Roberto Christ Vianna Santos<sup>a</sup>, Marli Matiko Anraku de Campos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Nanotechnology, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Oral Microbiology Research, Microbiology and Parasitology Department, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rs, Brazil.

### ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic microorganisms that can cause both local and disseminated infections. When in biofilm, these pathogens become highly resistant to antimicrobials used in clinical practice. Composed abundantly of polymeric substances, biofilms delay the diffusion of antimicrobials, preventing the drug from penetrating the deeper layers and having an effective action. Therefore, the search for new and alternative therapeutic options has become of fundamental importance. Natural products fall into these options, especially essential oils. However, these oils present problems, such as low miscibility in water (which decreases its bioavailability) and degradation by light and temperature. Thus, the objective of this work was to explore the action of free essential oil and nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* on strains of RGM, in planktonic and sessile forms. In this work, standard strains of *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) and *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977) were used. The susceptibility of the microorganisms in planktonic form was obtained by conventional microdilution techniques and by cell viability curve. The analysis of the antibiofilm activity was performed by a semi-quantitative macrotechnique. The nanoemulsion exhibited significant antimicrobial activity, with minimum inhibitory concentration values lower than those presented by the free essential oil, against strains in the planktonic state. However, both were efficient in destroying the already formed biofilm, whereas only the free oil inhibited the formation of mycobacterial biofilm. This study demonstrated the therapeutic potential of *C. flexuosus* essential oil, especially in its nanostructured form, which can be demonstrated against infections caused by rapidly growing mycobacteria.

**Keywords:** RGM, Biofilms, *Cymbopogon flexuosus*, Nanoemulsion.

## 1. Introduction

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) have been documented since 1950 as microorganisms capable of causing diseases in humans, receiving greater clinical recognition due to the control of tuberculosis and improvements in culture techniques and the identification of NTM [1,2]. When responsible for pathological processes in humans, NTMs can cause both localized disease, like skin infections, and disseminated disease [3].

Among the NTM species, there is a group of non-pigmented mycobacteria, known as rapidly growing mycobacteria (RGM), which are highly resistant and capable of developing, even in hostile environments [4,5]. The frequent presence of these microorganisms in hospitals' tap water, their relative resistance to sterilizing agents, as well as their frequent involvement in the formation of biofilms, contribute to the species of RGM causing infections related to healthcare [6,7].

The diseases caused by these microorganisms are called mycobacteriosis and are characterized by a difficult and prolonged treatment. In addition, RGMs have a high ability to form biofilms, which makes the efficacy of these therapies even more difficult [8,9]. Biofilms are complex functional structures that present a variable distribution of cells and aggregates, which constitute a protected mode of growth, allowing their survival in a hostile environment [10]. It is a successful survival strategy developed by microorganisms, making them more resistant to conventional treatments, requiring higher doses and a longer treatment time. Thus, in addition to the intrinsic difficulty involved in the treatment of mycobacteriosis, biofilm poses a great challenge for therapeutics, since most of the available antimicrobials are directed only to microorganisms in the planktonic state [11,12].

Due to the resistance of these microorganisms to the antimicrobials used in therapeutics, it is necessary to use new approaches that can combat this problem. The use of secondary plant metabolites, such as essential oils (EOs), has already been studied as an alternative to antimicrobial therapy [13]. The *Cymbopogon flexuosus* species is a plant belonging to the Poaceae family, popularly known as lemongrass [14]. This oil is composed basically of monoterpenes, with citral (geranial and neral isomer) being the major component, representing about 61% of its composition. Lemongrass presents anticancer, antifungal and antibacterial activities, and citral is the element responsible for these properties, mainly in relation to the antimicrobial potential [15,16,17,18]. On the other hand, the use of these oils as a biopharmaceutical product is hampered by some of their own characteristics, such as low miscibility in water, which leads to a decrease in their bioavailability, photosensitivity and

ease of degradation when exposed to temperature fluctuations, as well as their volatile nature [19,20].

The use of nanotechnology as a strategy to combat resistance mechanisms of pathogens has also been gaining importance and the focus of researchers [21]. Essential oils carried by nanostructured systems have been investigated as a potential strategy to improve their use, stability and effectiveness [20]. The literature presents some important reports on the use of nanostructures technology in order to increase the antimicrobial potential [22,23,24]. It has been shown that oil nanoparticles of *Melaleuca alternifolia* are efficient in reducing biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and in bacterial adhesion in epithelial cells [25]. Likewise, it was demonstrated that the antibiofilm activity of glycerol monolaurate is increased when it is nanoencapsulated, being able to significantly reduce the biofilm biomass of *Candida albicans*, an activity not exerted by the free monolaurate [26].

Since anti-mycobacterial therapy for combating mycobacteriosis is becoming increasingly difficult and complex, due to the evolution and improvement of the mechanisms of resistance, this study has evaluated the anti-mycobacterial and antibiofilm activities of the lemongrass essential oil, in its free form and in nanoemulsions.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Essential Oils*

The essential oil of *Cymbopogon flexuosus* was obtained commercially from the company FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil and was used in the free form and in nanoemulsions containing 5% EO (LGNE). The concentrations tested varied from 56.18 mg/mL to 0.1096 mg/mL for the oil and 11.23 mg/mL to 0.0438 mg/mL for the LGNE.

#### *2.1.1 Characterization of essential oil*

The characterization of the *C. flexuosus* essential oil was performed according to Godoi et al. [53] by gas chromatography using the Varian Star 3400CX equipment (CA, EUA) equipped with flame ionization detector (CG-FID). The retention times of the compounds were compared with a series of homologous n-alkanes which were analyzed under the same chromatographic conditions [27].

The qualitative analysis of the compounds was performed by the Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (CG-MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The analytes were identified based on the comparison with the mass spectra available from the National Institute of Standards and Technology (NIST) and by comparing the calculated linear retention indices with those available in the scientific literature. From the peak area revealed in CG-FID, the relative percentage amount of each compound was calculated [27].

## *2.2 Nanoemulsions*

### *2.2.1 Preparation of nanoemulsions*

The nanoemulsions were prepared using the homogenization method under high stirring using the equipment Ultra-Turrax® (IKA, Germany). The formulation consists of two phases: an oil phase containing 5% lemongrass essential oil and the Span 80 surfactant (Sigma Aldrich, Brazil), and an aqueous phase containing Tween 80 (Synth, Brazil) and ultrapure water. After the solubilization of each phase separately, the oil phase is injected into the aqueous phase under a stirring rate of 10,000 rpm in the Ultra-Turrax®. Stirring was increased to 17,000 rpm and held for 1 h. The blank nanoemulsion (BNE), nanoemulsion without active principle, was also assayed under the same conditions.

### *2.2.2 Characterization of nanoemulsions*

The nanoemulsions were characterized according to particle average diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential by means of the Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern, United Kingdom). For the determination of particle size and PDI, the dynamic light scattering technique was employed, while the zeta potential was determined through the electrophoretic mobility technique. The pH values of the formulations were determined immediately after preparation using a potentiometer (DM-22, Digimed®), previously calibrated with standard solution.

The morphology of nanoemulsion was analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM). The water-diluted (1:10 v/v) nanoemulsions were deposited in a drop-sample grid. After 1 min., the samples were dried and stained with uranyl acetate (2%), for TEM evaluation at 80 KV (JEM-1200 EXII, JEOL, Japan) [28].

### 2.3 Microorganisms

For the realization of this study, 3 standard strains were used: *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) e *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977). These strains were maintained at -80°C and were grown on Löwenstein-Jensen Agar for use (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India).

### 2.4 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The anti-mycobacterial activity of free EO, LGNE and BNE was evaluated by the broth microdilution method, following the guidelines of CLSI M24-A2 [29]. The oil and nanoemulsions were used in different concentrations from serial dilutions in Mueller Hinton Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India). The inoculum density was standardized according to the MacFarland 0.5 scale and transferred to the 96-well microplates. The plates were incubated at 37°C for 72 h., and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the indicator 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

### 2.5 Time kill assay

Evaluation of the action of free EO and LGNE during different growth times of the RGM strains was performed through the time-kill curve. MIC and 2xMIC aliquots were used for plating in Mueller Hinton Agar (HiMedia Laboratories Pvt Ltd, India) after 24, 48, 72, 96 and 120 h of exposure to the compounds. The plates were incubated at 37°C for 72 h and then the viable microorganisms were counted [8].

### 2.6 Biofilm inhibition test

The biofilm formation was performed according to Carter et al. [30], with some modifications. The technique was performed in polystyrene tubes using Middlebrook 7H9 (BD®, Le Pont de Claix, France) as culture medium, containing 1 mL of bacterial suspension at  $1 \times 10^7$  CFU/mL concentration and 1 mL free EO or LGNE at sub-inhibitory concentrations. The tubes were sealed with parafilm® and incubated at 30°C for 7 days.

### *2.7 Biofilm destruction test*

The biofilm destruction capacity was tested as described by Carter et al. [30], with some adaptations. The bacterial biofilm was formed in polystyrene tubes using MD7H9 as a culture medium, containing 1 mL of bacterial suspension in the concentration  $1 \times 10^7$  CFU/mL. The tubes were sealed with parafilm® and incubated at 30°C for 7 days. After this period, 1 mL of the compounds, in concentrations equal to or greater than MIC, were added to each tube with the biofilm formed. The tubes were again covered with parafilm® and incubated at 30°C for further 24 h.

### *2.8 Quantification of biofilms*

The biofilm quantification was performed by the crystal violet technique. Subsequent to the incubation period in the biofilm inhibition and destruction assays, the tubes were washed with saline to remove planktonic cells. The biofilm was stained with 0.1% violet glass solution for 10 min. The polystyrene tubes were again washed with saline and dried at room temperature. Finally, 2 mL of 95% ethanol was added to each tube and left to rest for 15 min. The absorbance was measured in a spectrophotometer (Spectrophotometer U-1800, HITACHI) at the optical density of 570 nm [31].

### *2.9 Statistical analysis*

All tests were performed in 3 replicates and the results were expressed as the Average  $\pm$  Standard deviation. The time-kill curve was performed using GraphPad Prism® 5. The optical density readings obtained in the biofilm formation assay were recorded as mean  $\pm$  standard deviation and were submitted to the t-test (as compared to the positive control). Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . The graphs were prepared using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

### 3. Results

#### 3.1 Essential Oils

##### 3.1.1 Characterization of essential oils

The characterization of *C. flexuosus* oil provided Z-Citral (34%) and  $\beta$ -Geranial ( $\alpha$ -Citral) (46%) as the major compounds, being identified approximately 97% of oil.

#### 3.2 Nanoemulsions

##### 3.2.1 Characterization of nanoemulsions

The determination of the particle average diameter, polydispersity index, zeta potential and pH of the nanoparticles are described in Table 1. The image obtained from the nanoemulsion by TEM is shown in Fig. 1.

##### 3.3 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The susceptibility of RGM strains to free EO, LGNE and BNE is described in Table 2. The oil and LGNE showed inhibitory activity against the strains, with MIC values ranging from 3.506 to 0.877 mg/mL for the free oil and 0.351 mg/mL for the LGNE. As expected, BNE did not inhibit bacterial growth.

##### 3.4 Time-kill assay

In the time-kill curve (Fig. 2), the bactericidal action of EO in its free form was observed, which was able to inhibit the growth of all three RGM strains at MIC and 2xMIC concentrations in the first 24 h of the test. On the other hand, the LGNE curve showed a bacteriostatic behavior in MIC concentration for the strains under analysis. LGNE completely inhibited the growth of *M. fortuitum* in the first 72 h and in the first 48 h of *M. abscessus*. After this period, the two strains grew again, while the *M. massiliense* strain presented a small reduction in growth in the first 24 h and, afterwards, maintained its exponential growth. At 2xMIC concentration, LGNE completely inhibited bacterial growth after 24 h.

### 3.5 Biofilm inhibition test

The ability of EO to reduce the biofilm production of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*, MIC and all sub-inhibitory concentrations tested, is shown in Fig. 3. With the exception of *M. massiliense*, which at a concentration below the MIC (0.1755 mg/mL) was able to interfere with biofilm formation, graphs E and F show the low action of LGNE in inhibiting the biofilm formation of other RGM, in sub-inhibitory concentrations.

### 3.6 Biofilm destruction test

The results of the action of EO and LGNE on the three strains of studies are presented in Fig. 4. Three concentrations above MIC were used along with MIC itself, which are presented in descending order in the graphic. The MIC and all concentrations tested above the lemongrass EO were able to destroy, to some degree, the already formed mycobacterial biofilm. The destruction of the biofilm formed by *M. fortuitum* was dose-dependent. The LGNE was also able to destroy the biofilm, but at concentrations well below the EO.

## 4. Discussion

The antimicrobial activity of many essential oils has already been proven in tests with different microorganism species [32,33,34,35]. Despite their numerous advantages, EOs present some technological limitations related to the hydrophobic, reactive and volatile nature of the bioactive molecules that constitute them. In this sense, the carriage of EOs using nanostructures, such as nanoemulsions, is now appearing as an alternative to overcome these limitations, as well as providing antimicrobial advantages such as the possibility of reducing the dose of drugs, reducing the potential effects of hepatotoxicity, as well as overcoming physical barriers and reaching difficult sites of action [21,36,37].

Through the results obtained in the characterization of LGNE and in TEM analysis (Fig. 1), the homogeneity of the system and the success in the development of nanoemulsions were confirmed. The results presented acceptable values, showing that the formulation is monodisperse ( $PDI < 0.25$ ), with a diameter of less than 300 nm and a satisfactory zeta potential, with a negative charge, resulting in a lower aggregation of particles [25,38].

Since mycobacteriosis treatment does not contain many commercial antimicrobials, and the fact that they are opportunistic infections that are associated with the formation of



biofilms, and may persist even after treatment [8,9], it is imperative that these microorganisms be included in studies that seek pharmacological alternatives aimed at the use of nanotechnology. In this context, some studies bring the nanostructuring of new compounds, antimicrobials and even EOs, aiming combating infections caused by mycobacteria. Lipid nanoparticles from *M. alternifolia* oil showed activity against different species of the *Mycobacterium* genus [39]. Likewise, studies of mixtures of different metal oxides in nanoparticles have demonstrated a potent ability to inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages [40]. However, there are no reports in the literature on the activity of oil and nanoemulsions of lemongrass against MNTs, with this work being the first to evaluate its antimicrobial and antibiofilm potential against these species.

Through analysis of the results obtained in the susceptibility test of the RGM strains against free and nanostructured EO, the higher antimicrobial activity of LGNE was observed, with the MIC value, for the three strains, but which were smaller than those obtained for EO. It is suggested that LGNE presents a spectrum of stronger antimicrobial activity due to a set of factors such as surface charge and average particle size, which allows the efficient transport of oil through the cell membrane, thus facilitating the interaction of oils with multiple molecular sites on the microbial cell membrane [41,42].

From the susceptibility test of the strains, the behavior of the mycobacteria against the oil, in its two forms, was evaluated through the time-kill curve. In this study, the bactericidal character of the free oil was observed, from 24 h, on the three standard strains of RGM, whereas the LGNE presented bacteriostatic action. This difference in behavior between EO and LGNE over time may be a result of nanoemulsion performance as a controlled release system, making the oil available in small concentrations at the site of action, constantly maintaining its bioavailability over time [36,43,44,45]. Thus, although LGNE is not able to completely eradicate microbial growth, it is able to inhibit growth in a constant and controlled way, allowing us to suggest that it has an excellent effect on the pharmacokinetics (tissue absorption and distribution) of the oil.

The present study also demonstrated that lemongrass EO can inhibit the formation of mycobacteria biofilm at sub-inhibitory concentrations, while the LGNE does not have the same effectiveness. *M. abscessus* was the only strain in which the concentration of inhibited biofilm was proportional to the concentration of the applied dose; *M. massiliense* and *M. fortuitum* were not dose-dependent. This activity of lemongrass oil on the biofilm was also shown by Adukwu et al. [17], in the inhibition of biofilm of *Staphylococcus aureus*. However, the bactericidal concentrations of the oil and bacteriostatic effect of LGNE, besides other

higher concentrations, were effective in the destruction of the previously formed biofilm. It is known that one of the characteristics of the nanostructured carriers is to favor the passage of physical and extrapolymeric barriers produced by microorganisms, like biofilms. This may explain the low activity of the nanoemulsion in inhibiting the formation of the biofilm and its better performance on the already formed biofilm [21]. Thus, LGNE has been shown to more effectively transpose the physical barrier imposed microorganisms in biofilm, taking the EO to its site of action more quickly.

In all biofilm assays, RGMs, besides producing biofilms on the surface of polystyrene tubes, were also able to form biofilm at the air-liquid interface, with the exception of the free EO inhibition test. The cell wall of mycobacteria consists of a large variety of hydrophobic lipids, such as mycolic acid, lipooligosaccharides, phthiocerol dimycocerosates, phenolic glycolipids, lipoarabinomannan (LAM) and glycopeptidolipids (GPLs), which are closely related to colony morphology, biofilm formation, antimicrobial resistance and the virulence of mycobacteria [46]. The GPLs are closely related to mycobacteria motility since they do not have flagella for this purpose [47]. Studies relate GPLs as factors for the development of biofilms in mycobacteria, being important for their fixation to surfaces, a crucial process in the first stage of biofilm formation [8,48,49], while the high level of mycolic acids is closely associated with the final stages of maturation of mycobacteria biofilms [50].

The mechanism by which monoterpenes act on bacterial cells is related to their ability to destabilize the cell membrane. These compounds, due to their lipophilic character, interact with the phospholipidic bilayer that forms the cell membrane, altering its integrity and function [51]. Andrade-Ochoa et al. [34] reported that penetration of monoterpene is also determined by the permeability of the microorganism cell wall. The high lipophilicity of the EOs major components allows them to interact easily with the mycobacterial cell wall, which is highly lipophilic due to the presence of mycolic acids, and consequently leads to changes in cell permeability and microbial death.

Among the monoterpenes that constitute lemongrass oil, citral is the one that is present at a higher quantity, being cited as the compound responsible for this antimicrobial potential of the lemongrass EO [15,16,17,18]. In our oil characterization test, citral represented 80% of its constituents. This content was also described by Adukwu et al. [17], and the literature has already described concentrations of 89% for citral [18].

Although the mechanism of lemongrass EO with mycobacterial cells is not yet fully understood, we believe that this interaction of the oil with the lipids of the mycobacterial cell wall is responsible for the biofilms formation inhibition. EO can compromise the fixation of

GPLs on the surface, hampering the first stage of biofilm formation, while interaction with mycolic acids impairs the biofilm maturation process. In this context, a study of the action of *C. citratus* oil and citral on the inhibition of *S. aureus* biofilm observed intracellular leakage and morphological changes in the treated bacterial cells, providing confirmation that the compound was able to de-structure the surface of the microorganism, which may compromise the initial fixation of *S. aureus* cells to the surface and the consequent biofilm formation [52].

## 5. Conclusion

The present study demonstrated for the first time the potential of lemongrass free essential oil and in nanoemulsion, against RGM. EO and LGNE have anti-mycobacterial and antibiofilm activity, and free EO differed from nanoemulsion because it was also able to inhibit biofilm formation and not only to destroy it. Considering that one of the main diseases caused by RGMs is skin disease, and evaluating the results presented in this study, lemongrass EO is presented as a possible antimicrobial for topical use in the treatment of mycobacteriosis. The nanoencapsulation of this oil appears as an alternative to overcome the limitations of stability that an EO can present, protecting it from light, oxidation and hydrolysis, as well as enabling a reduction in the concentration of the applied dose. This study provides robust results; however, it is necessary to perform future research that may clarify the influence exerted by lemongrass EO on the genetic and physiological factors associated with the formation of biofilms.

## References

- [1] J.E. Moore, M.E. Kruijshaar, L.P. Ormerod, F. Drobniowski, I. Abubakar, Increasing reports of nontuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006, *BMC Public Health*. 10 (2010) 612-621, doi:10.1186/1471-2458-10-612.
- [2] L. Guglielmetti, F. Mougari, A. Lopes, L. Raskine, E. Cambau, Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view, *Future Microbiol*. 10 (2015) 1467-1483, doi:10.2217/fmb.15.64.
- [3] V.A. Agertt, P.C. Bonez, G.G. Rossi, V.C. Flores, F.S. Siqueira, C.R. Mizdal, L.L. Marques, G.M. De Oliveira, M.M.A. Campos, Identification of antimicrobial activity among new sulfonamide metal complexes for combating rapidly growing mycobacteria. *Biometals*. 29 (2016) 807-816, doi:10.1007/s10534-016-9951-3.

- [4] B.A. Brown-Elliott, R.J. Wallace Jr., Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria, *Clin Microbiol Rev.* 15 (2002) 716-746, doi:10.1128/CMR.15.4.716-746.2002.
- [5] M.A. de Groote, G. Huitt, Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 42 (2006) 1756-1763, doi:10.1086/504381.
- [6] P. Sexton, A.C Harrison, Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease, *Eur Respir J.* 31 (2008) 1322-1333, doi:10.1183/09031936.00140007.
- [7] M.B. Pitombo, O. Lupi, R.S. Duarte, Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 31 (2009) 529-533, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032009001100001>.
- [8] T.T. Aung, J.K.H. Yam, S. Lin, S.M. Salleh, M. Givskov, S. Liu, N.C. Lwin, L. Yang, R.W. Beuerman, Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by New Therapeutic Approaches, *Antimicrob Agents Chemother.* 60 (2016) 24-35, doi:10.1128/AAC.01509-15.
- [9] V.C. Flores, F.S. Siqueira, C. R. Mizdal, P. C. Bonez, V. A. Agertt, S. T. Stefanello, G. G. Rossi, M.M.A. de Campos, Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis, *Microb Pathog.* 99 (2016) 229-235, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.017>.
- [10] R. Vasudevan, Biofilms: microbial cities of scientific significance, *J Microbiol Exp.* 1 (2014).
- [11] S.M. Soto, Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm, *Virulence.* 4 (2013) 223-229, doi:10.4161/viru.23724.
- [12] S.M. Ribeiro, M.R. Felício, E.V. Boas, S. Gonçalves, F.F. Costa, R.P. Samy, N.C. Santos, O.L. Franco, New frontiers for anti-biofilm drug development, *Pharmacol Ther.* 160 (2016) 133-144, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.006>.
- [13] M. Simões, Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms, *Curr Med Chem.* 18, (2011) 2129-2145, doi:10.2174/092986711795656216.
- [14] A. May, O.A. Bovi, N.B. Maia, A.R.A. Moraes, M.Q. Pinheiro, M. Mario, Influence of the interval between cuts on biomass yield of two lemon grass species, *Hortic. Bras.* 26 (2008) 379-382, <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362008000300017>.
- [15] B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, Comparative analysis of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Cymbopogon citratus* Stapf, *Nat Prod Res.* 20 (2006) 455-459, doi:10.1080/14786410500277837.
- [16] C.D.B. Da Silva, S.S. Guterres, V. Weisheimer, E.E.S. Schapoval, Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp., *Braz J Infect Dis.* 12 (2008) 63-66, <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702008000100014>.

- [17] E.C. Adukwu, S.C. Allen, C.A. Phillips, The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*, J Appl Microbiol. 113 (2012) 1217–1227, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x.
- [18] E.C. Adukwu, M. Bowles, V. Edwards-Jones, H. Bone, Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. Appl Microbiol Biotechnol. 100 (2016) 9619–9627. doi:10.1007/s00253-016-7807-y.
- [19] S. Sugumar, J. Nirmala, V. Ghosh, H. Anjali, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, Bio-based nanoemulsion formulation, characterization and antibacterial activity against food-borne pathogens, J. Basic Microbiol. 53 (2013) 677–685, doi:10.1002/jobm.201200060.
- [20] R. Moghimi, L. Ghaderi, H. Rafati, A. Aliahmadi, D.J. McClements, Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. Food Chem. 194 (2016) 410–415, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.139>.
- [21] E. Sans-Serramitjana, E. Fusté, B. Martínez-Garriga, A. Merlos, M. Pastor, J.L. Pedraz, A. Esquisabel, D. Bachiller, T. Vinuesa, M. Viñas, Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients, J Cyst Fibros. 14 (2015) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2015.12.005>.
- [22] C.C. Liolios, O. Gortzi, S. Lalas, J. Tsaknis, I. Chinou, Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity, Food Chem. 112 (2009) 77–83. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.060.
- [23] R.K. Bhawana, H.S. Basniwal, V.K. Buttar, N. Jain, Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization, and antimicrobial study, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 2056–2061. doi:10.1021/jf104402t.
- [24] L.Q.S. Lopes, C.G. Santos, R.A. Vaucher, L. Gende, R.P. Raffinb, R.C.V. Santos, Evaluation of antimicrobial activity of glycerol monolaurate nanocapsules against *American foulbrood* disease agent and toxicity on bees, Microb Pathog. 97 (2016) 183–188, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.014>.
- [25] V.M. Comin, L.Q.S. Lopes, P.M. Quattrin, M.E. de Souza, P.C. Bonez, F.G. Pintos, R.P. Raffin, R.A. Vaucher, D.S.T. Martinez, R.C.V. Santos, Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Microb Pathog. 93 (2016) 120–125, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.019>.
- [26] L.Q.S. Lopes, C.G. Santos, R.A. Vaucher, R.P. Raffinb, R.C.V. Santos, Nanocapsules with glycerol monolaurate: Effects on *Candida albicans* biofilms, Microb Pathog. 97 (2016) 119–124, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.016>.
- [27] J. Amini, V. Farhang, T. Javadi, and J. Nazemi, Antifungal Effect of Plant Essential Oils on Controlling Phytophthora Species, Plant Pathol J. 32 (2016) 16–24, doi:10.5423/PPJ.OA.05.2015.0091.

- [28] A. Ishaka, M. U. Imam, R. Mahamud, A. B. Z. Zuki, and I. Maznah, Characterization of rice bran wax policosanol and its nanoemulsion formulation, *Int. J. Nanomedicine*. 9 (2014) 2261–2269, <https://doi.org/10.2147/IJN.S56999>.
- [29] G.L. Woods, B. Brown-Elliott, P.S. Conville, E.P. Desmond, G. S. Hall, G. Lin, ... F.G. Witebsky, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard — Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute. 31 (2011).
- [30] G. Carter, M. Wu, D.C. Drummond, L. E. Bermudez, Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*, *J Med Microbiol*. 52 (2003) 747-752, doi:10.1099/jmm.0.05224-0.
- [31] P.C. Bonez, C.F.S. Alves, T.V. Dalmolin, V.A. Agertt, C.R. Mizdal, V.C. Flores, J.B. Marques, R.C. Santos, M.M.A. de Campos, Chlorhexidine activity against bacterial biofilms, *Am J Infect Control*. 41 (2013) 4-7. doi:10.1016/j.ajic.2013.05.002.
- [32] J. Bueno, P. Escobar, J.R. Martínez, S.M. Leal, E.E. Stashenko, Anti-tubercular activity of eleven atomatic and medicinal plants occurring in Colombia, *Biomedica*. 29 (2009) 51-60.
- [33] S. Zanetti, S. Cannas, P. Molicotti, A. Bua, M. Cubeddu, S. Porcedda, B. Marongiu, L.A. Sechi, Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis L.* against clinical strains of *Mycobacterium spp.*, *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010 (2010) 3, doi:10.1155/2010/931530.
- [34] S. Andrade-Ochoa, G.V. Nevárez-Moorillón, L.E. Sánchez-Torres, M. Villanueva-García, B.E. Sánchez-Ramírez, L.M. Rodríguez-Valdez, B.E. Rivera-Chavira, Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, *BMC Complement Altern Med*. (2015) 315-332, doi:10.1186/s12906-015-0858-2.
- [35] G.A. Linde, Z.C. Gazim, B.K. Cardoso, L.F. Jorge, V. Tešević, J. Glamočlija, M. Soković, N.B. Colauto, Antifungal and antibacterial activities of *Petroselinum crispum* essential oil, *Genet Mol Res*. 15 (2016), doi:10.4238/gmr.15038538.
- [36] V. Karavelidis, D. Giliopoulos, E. Karavas, D. Bikiaris, Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior. *Eur J Pharm Sci*. 41 (2010) 636–643, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.004>.
- [37] F. Donsì, M. Annunziata, M. Vincensi, G. Ferrari, Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier, *J Biotechnol*. 159 (2012) 342–350, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.001>.
- [38] R.B. Friedrich, M.C. Fontana, R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions, *Quim. Nova*. 31 (2008) 1131–1136. doi:10.1590/S0100-40422008000500038.
- [39] M.E. de Souza, L.Q.S. Lopes, R.A. Vaucher, D.N. Mário, S.H. Alves, V.A. Agertt, B.V. Banchini, S.I. Felicidade, M.M.A. de Campus, A.A. Boligon, M.L. Athayde, C.G. Santos,

R.P. Raffin, P. Gomes, R.C.V. Santos, Antimycobacterial and antifungal activities of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 24 (2014) 559-560, [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50105-0](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50105-0).

[40] A.R. Jafari, I.T. Mosav, N. Mosavari, A. Majid, F. Movahedzade, M. Tebyaniyan, M. Kamalzadeh, M. Dehgan, S. Jafari, S. Arastoo, Mixed metal oxide nanoparticles inhibit growth of *Mycobacterium tuberculosis* into THP-1 cells, *Int J Mycobacteriol.* 1 (2016) S181-S183. doi:10.1016/j.ijmyco.2016.09.011.

[41] J. Wu, Y. Zheng, X. Wen, Q. Lin, X. Chen, Z. Wu, Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation *in vitro* and *in vivo*, *Biomed. Mater.* 9 (2014) 12, doi:10.1088/1748-6041/9/3/035005.

[42] F. Donsì, G. Ferrari, Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol.* 233 (2016) 106-120, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>.

[43] S.R. Schaffazick, S.S. Guterres, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova.* 26 (2003) 726-737, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>.

[44] D. Passeri, F. Rinaldi, C. Ingallina, M. Carafa, M. Rossi, M.L. Terranova, C. Marianecchi, Biomedical Applications of Nanodiamonds: An Overview, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 972–988, doi:10.1166/jnn.2015.9734.

[45] M. Kim, Nanoparticle-Based Therapies for Wound Biofilm Infection: Opportunities and Challenges, *IEEE Trans Nanobioscience.* 15 (2016) 294-304, doi:10.1109/TNB.2016.2527600.

[46] X. Xiang, W. Deng, M. Liu, J. Xie. *Mycobacterium* Biofilms: Factors Involved in Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 24 (2014) 269-279.

[47] J. Recht, A. Martínez, S. Torello, R. Kolter, Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis* Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 182 (2000) 4348–4351, doi:10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.

[48] J. Recht, R. Kolter, Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 183 (2001) 5718-5724, doi:10.1128/JB.183.19.5718-5724.2001.

[49] R. Greendyke, T.F. Byrd, Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 2019–2026, doi:10.1128/AAC.00986-07.

[50] A.K. Ojha, A.D. Baughn, D. Sambandan, T. Hsu, X. Trivelli, Y. Guerardel, A. Alahari, L. Kremer, W.R. Jacobs Jr, G.F. Hatfull, Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol.* 69 (2008) 164–174, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x.

[51] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. de Martino, R. Coppola, V. de Feo, Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria, *Pharmaceuticals* (Basel). 6 (2013) 1451-1474, doi:10.3390/ph6121451.

[52] J. Aiensaard, S. Aiumlamai, C. Aromdee, S. Taweechaisupapong, W. Khunkitti, The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745, *Res Vet Sci.* 91 (2011) e31–e37, doi:10.1016/j.rvsc.2011.01.012.

[53] S.N. Godoi, P.M. Quatrin, M.R. Sagrillo, K. Nascimento, R. Wagner, B. Klein, R.C.V. Santos, A.F. Ourique, Evaluation of stability and in vitro security of nanoemulsions containing eucalyptus globulus oil, *BioMed Research International* 2017 (2017) 1–10.



**Table 1**

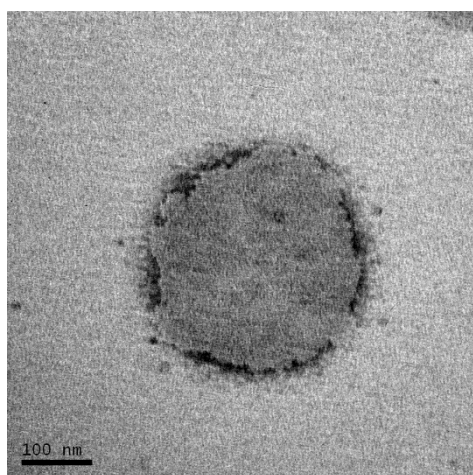
Physicochemical characteristics of LGNE and BNE.

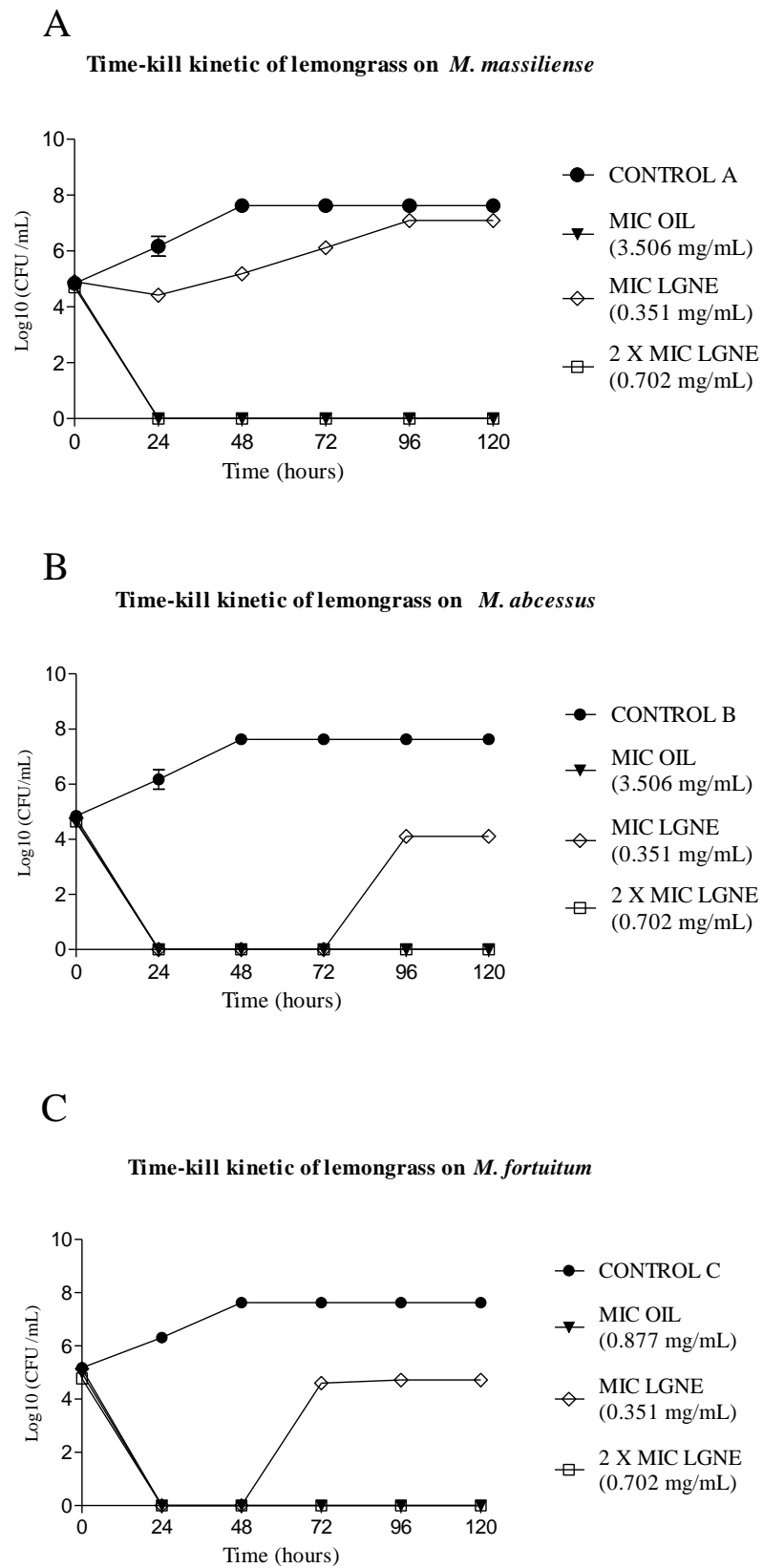
Parameters	LGNE	BNE
Particle size (nm)	92.32 ± 0.143	130,42 ± 1.05
Polydispersion index	0.217 ± 0.005	0,23 ± 0,71
Zeta potential (mV)	- 8.236 ± 0.005	- 7,98 ± 0,92
pH	3.72 ± 0.11	5,61 ± 0,65

**Table 2**

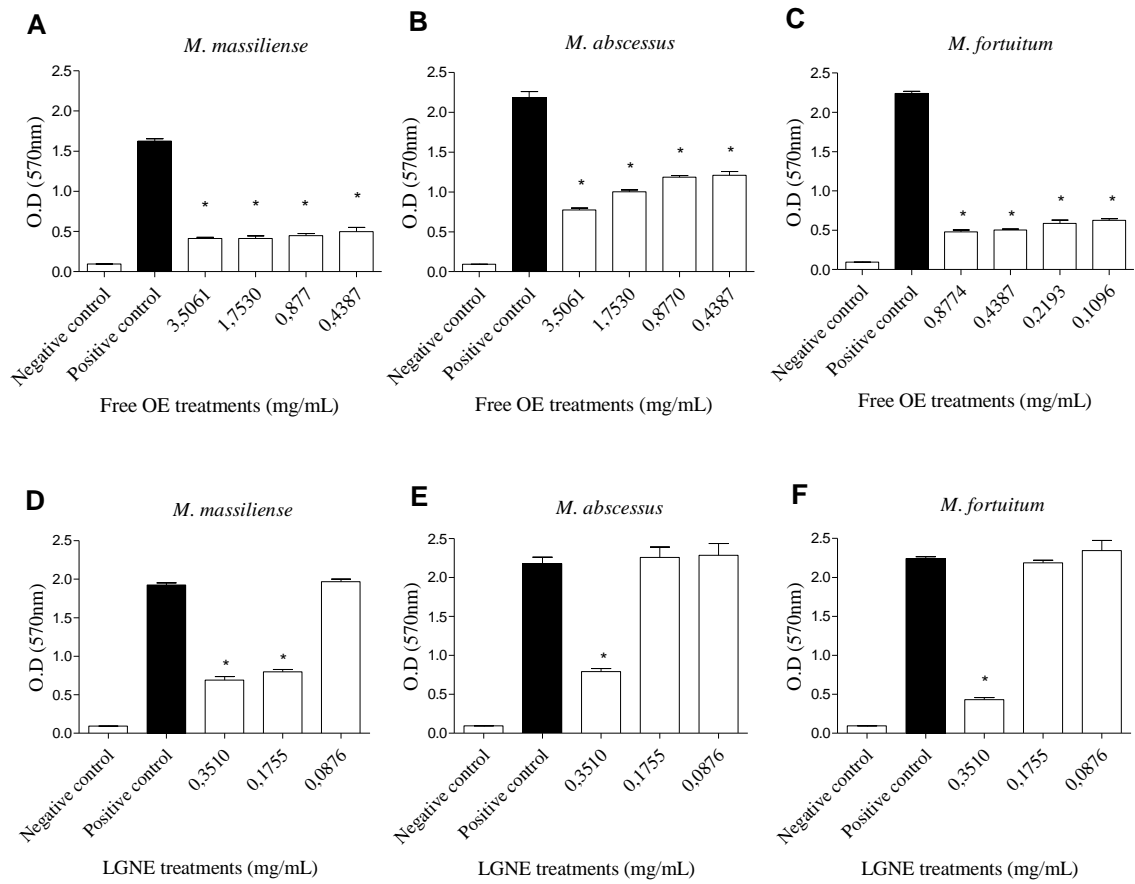
Values of MIC for free EO, LGNE and BNE tested against RGM.

	EO	LGNE	BNE
<i>M. fortuitum</i>	0.877 mg/ml	0.351 mg/ml	NA <sup>a</sup>
<i>M. massiliense</i>	3.506 mg/ml	0.351 mg/ml	NA <sup>a</sup>
<i>M. abscessus</i>	3.506 mg/ml	0.351 mg/ml	NA <sup>a</sup>

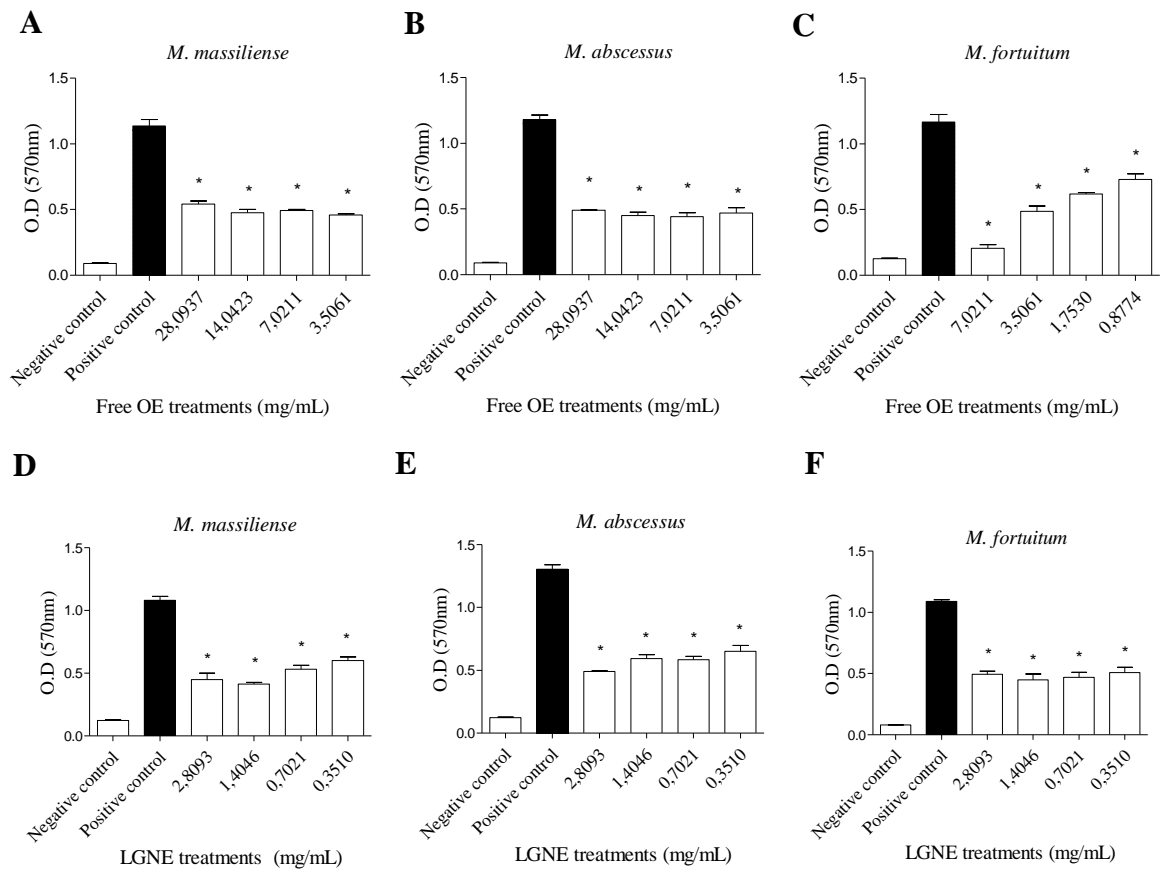
<sup>a</sup>N.A. – not active**Fig. 1.** Nanoemulsion containing 5% of lemongrass essential oil in TEM.



**Fig. 2.** Time-kill curve on *M. massiliense* (A), *M. abcessus* (B) and *M. fortuitum* (C) exposed to several concentrations (based on MIC) of LGNE and free OE.



**Fig. 3.** The action of free OE (A, B and C) and LGNE (D, E and F) on biofilm formation by *M. massiliense*, *M. abscessus* and *M. fortuitum*. \* Indicates significant difference between concentrations tested and the positive control.



**Fig. 4.** Biofilm destruction of *M. massiliense*, *M. abscessus* and *M. fortuitum* by free EO (A, B and C) and LGNE (D, E and F). \* Indicates significant difference between concentrations tested and the positive control.

## 4 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- aproximadamente 97% da composição do OE foi determinada e o citral, com um rendimento de 80%, foi seu componente majoritário;
- os resultados da caracterização comprovaram que a nanoemulsão apresentou características satisfatórias para um sistema nanoestruturado;
- o OE e nanoemulsão contendo 5% de óleo foram capazes de inibir o crescimento micobacteriano, sendo que a nanoestrutura teve ação em concentrações mais baixas;
- o ensaio de curva de morte revelou a ação bactericida do OE frente as cepas de MCR, enquanto a nanoemulsão obteve um efeito bacteriostático sobre elas;
- o ensaio semi-quantitativo utilizando cristal violeta revelou que o OE foi capaz de destruir o biofilme formado e também inibir sua formação. A nanoemulsão também apresentou atividade antibiofilme, mas somente na destruição do mesmo.

## REFERÊNCIAS

- ADUKWU, E. C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 100, n. 22, p. 9619-9627, 2016.
- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 113, n. 5, p. 1217-1227, 2012.
- ANWER, M. K. et al. Enhanced Antibacterial Effectes of Clove Essential Oil by Nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**. v. 63, n. 4, p. 347-354, 2014.
- AUNG, T. T. et al. Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by New Therapeutic Approaches. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**. v. 60, n. 1, p. 24-35, 2016.
- BAZAKA, K. et al. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 95, n. 2, p. 299–311, 2012.
- BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**. v. 8, n. 1, p. 68-83, 2013.
- BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2014.
- BONEZ, P. C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**. v. 41, n. 12, p. 4-7, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008.
- BROWN-ELLIOT, B. A.; WALLACE JR, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 4, p. 716-746, 2002.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CARDOSO, A. M. **Surto de Infecção após videoscopias causado por *Mycobacterium massiliense* em Goiânia: Análise molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

- CARTER, G.; YOUNG, L. S.; BERMUDEZ, L. E. A subinhibitory concentration of clarithromycin inhibits *Mycobacterium avium* biofilm formation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 48, n. 12, p. 4907-4910, 2004.
- CHAABAN, A. et al. Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Natural Product Research**. p. 1-5, 2017.
- CHEN, H. et al. Epidemiology and resistance mechanisms to imipenemin *Klebsiella pneumoniae*: A multicenter study. **Molecular Medicine Reports**. v. 7, n. 1, p. 21-25, 2013.
- CHIARADIA, L. et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, 2017.
- CONAGLEN, P. D. et al. Systematic review of tattoo-associated skin infection with rapidly growing mycobacteria and public health investigation of a cluster in Scotland, 2010. **Euro Surveill**. v. 18, n. 32, p. 1-13, 2013.
- DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**. v. 39, p. 131–203, 1998.
- DAFFÉ, M.; QUÉMARD, A.; MARRAKCHI, H. Mycolic Acids: From Chemistry to Biology. **Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes**. v 1, n. 36, 2017.
- DE GROOTE, M. A.; HUITT, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42, n. 12, p. 1756-1763, 2006.
- DE OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v. 21, n. 4, p. 549–553, 2010.
- DE SOUZA, M. E. et al. Antimycobacterial and antifungal activities of *Melaleuca alternifolia*oil nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 24, n. 5, p. 559-560, 2014.
- DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.
- DESAI, M. A.; PARIKH, J. Hydrotropic Extraction of Citral from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 51, n. 9, p. 3750-3757, 2012.
- DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**. v. 3, n. 4, 2016.
- DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**. v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001a.
- DONLAN, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**. v. 7, n. 2, p. 277-281, 2001.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**. v. 233, p. 106-120, 2016.

ESTEBAN, J. et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiology**. v. 8, n. 1, 2008.

ESTEBAN, J.; NAVAS, E. Treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 2017.

FALKINHAM, J. O. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, n. 2, p. 250–254, 2007.

FARIA, S.; JOÃO, I.; JORDÃO, L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. **Journal of Pathogens**. v. 2015, 2015.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. Safety of foods and beverages: spices and seasonings. In: MOTAJERMI, Y. (Ed.). **Encyclopedia of Food Safety**. 1. ed. Elsevier, 2014. 3 v. (Foods, Materials, Technologies and Risks), p. 324-330.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature**. v. 8, p. 623-633, 2010.

FLORES, V. C. et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. **Microbial Pathogenesis**. v. 99, p. 229-235, 2016.

FONTANA, R. T. The Mycobacterias of Rapid Growth and the hospital infection: a public health problem. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 61, n. 3, p. 371-376, 2008.

FREEMAN, R. et al. Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 12, p. 7554-7558, 2006.

GARNETT, J. A; MATTHEWS, S. Interactions in Bacterial Biofilm Development: A Structural Perspective. **Current Protein and Peptide Science**. v. 13, n. 8, p. 739-755, 2013.

GREENDYKE, R.; BYRD, T. F. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 6, p. 2019–2026, 2008.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

GUGLIELMETTI, L. et al. Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view. **Future Microbiology**. v. 10, n. 9, p. 1467-1483, 2015

GUPTA P. et al. Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**. v. 34, p. 85-96, 2017.



GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**. v. 198, n. 1, p. 1–15, 2016.

HABTEMARIAM, S. Antidiabetic Potential of Monoterpenes: A Case of Small Molecules Punching above Their Weight. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 19, n. 1, 2017.

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. **Pharmaceutical Biology**. v. 55, n. 1, p. 1619-1622, 2017.

HARRIS, K. A.; KENNA, D. T. D. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis: molecular typing and clinical outcomes. **Journal of Medical Microbiology**. v. 63, p. 1241-1246, 2014.

HENKLE, E.; WINTHROP, K. L. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. **Clinics in Chest Medicine**. v. 36, n. 1, p. 91-9, 2015.

HOWARD, S. T. et al. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. **Microbiology**. v. 152, n. 6, p. 1581-1590, 2006.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**. v. 81, n. 1, p. 7-11, 2017.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**. v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KAPLAN, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. **The International Journal of Artificial Organs**. v. 34, n. 9, p. 737-751, 2011.

KASPERBAUER, S. H.; DE GROOTE, M. A. The Treatment of Rapidly Growing Mycobacterial Infections. **Clinics in Chest Medicine**. v. 36, n. 1, p. 67-78, 2015.

KOH, W. J. Nontuberculous Mycobacteria-Overview. **Microbiology Spectrum**. v. 5, n. 1, 2017.

KORENBLUM, E. et al. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**. v. 3, n. 1, 2013.

KOVÁCS, J. K. et al. Antimicrobial and Virulence-Modulating Effects of Clove Essential Oil on the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82, n. 20, p. 6158-6166, 2016.

KUMAR, A. et al. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 63, n. 6, p. 712-716, 2009.

- KWON, Y-S.; KOH, W-J. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. **Journal of Korean Medical Science**. v. 31, n. 5, p. 649-659, 2016.
- LAKEHAL, S. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba - alba* Asso grown in Algeria. **Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 435-439, 2016.
- LEE, S. C. et al. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde and linalool from the leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira in endotoxin-induced mice. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 26, n. 1, p. 211-220, 2018.
- LEE, S. Y. et al. Effect of amikacin on cell wall glycopeptidolipid synthesis in *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Microbiology**. v. 55, n. 8, p. 640-647, 2017.
- LI, M. et al. Tea tree oil nanoemulsions for inhalation therapies of bacterial and fungal pneumonia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 141, p. 408-416, 2016.
- LI, X. H.; LEE, J. H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**. v. 55, n. 10, p. 753-766, 2017.
- LINDE, G. A. et al. Antifungal and antibacterial activities of *Petroselinum crispum* essential oil. *Genet Mol Res*. v. 15, n. 3, 2016.
- MAY, A. et al. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**. v. 26, n. 3, 2008.
- MAYA-HOYOS, M. et al. Sliding Motility, Biofilm Formation, and Glycopeptidolipid Production in *Mycobacterium colombiense* Strains. **BioMed Research International**. 2015.
- MEKONNEN, A. et al. In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**. v. 2016, 2016.
- MELLO, K. G. C. et al. Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Brazil, 1993–2011. **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, n. 3, p. 393-399, 2013.
- MOGHIMI, R. et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**. v. 194, p. 410-415, 2016.
- MONEGO, F. et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 5, p. 436-441, 2011.
- MOORE, J. E. et al. Increasing reports of nontuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BMC Public Health**. v. 10, p. 612-621, 2010.
- MOTA, S. P. M. S. **Isolamento e identificação molecular de micobactérias não tuberculosas**. 2011. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

- NAZZARO, F. et al. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 10, n. 4, 2017.
- OJHA, A. et al. GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. **Cell**. v. 123, n. 5, p. 861–873, 2005.
- OJHA, A. K. et al. Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 23, p. 17380-17389, 2010.
- OJHA, A. K. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 164-174, 2008.
- OLIVEIRA, K. R. **Análise da formação de biofilmes em cateteres: métodos de identificação e controle**. 2011. 39 p. Monografia. (Pós-graduação em Análises Clínicas e Gestão de Laboratório) - Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de ação**. p. 1-14, 2012.
- ORTIZ, M. et al. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. **Phytomedicine**. v.18, n. 1, p. 74–79, 2010.
- PADALIA, H. et al. Antimicrobial and synergistic effects of some essential oils to fight against microbial pathogens - a review. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**. 1. ed. Formatex Research Center S.L., 2015. vol. 1. p. 34-45.
- PANDEY, A. K. et al. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 2161, 2017.
- PANG, L. et al. Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 114, n. 8, p. 1705-1713, 2013.
- PELGRIFTA, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 2013.
- PÉREZ-VELÁZQUEZ, J.; GÖLGELI, M.; GARCÍA-CONTRERAS, R. Mathematical Modelling of Bacterial Quorum Sensing: A Review. **Society for Mathematical Biology**. v. 78, n. 8, p. 1585-1639, 2016.
- PHILIPS, R. C. et al. *Mycobacterium fortuitum* infection arising in a new tattoo. **Dermatology Online Journal**. v. 20, n. 6, 2014.
- PIRES, R. H. et al. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. **Mycopathologia**. v.172, n. 6, p. 453-464, 2011.

- PITOMBO, M. B.; LUPI, O.; DUARTE, R. S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 31, n. 11, p. 529-533, 2009.
- PORVAZNIK, I.; SOLOVIC I.; MOKRY, J. Non-tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. p. 1-7, 2016.
- RAI, M. et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 519, n. 1-2, p. 67-78, 2017.
- RECHT, J. et al. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**. v. 182, n. 15, p. 4348-4351, 2000.
- RECHT, J.; KOLTER, R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**. v. 183, n. 19, p. 5718-5724, 2001.
- RIBEIRO, S. M. et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**. v.160, p. 133-144, 2016.
- RINDI, L.; GARZELLI, C. Increase in non-tuberculous mycobacteria isolated from humans in Tuscany, Italy, from 2004 to 2014. **BMC Infectious Diseases**. v. 16, n. 44, 2016.
- ROBLEDO, J. A.; MURILLO, A. M.; ROUZAUD, F. Physiological role and potential clinical interest of mycobacterial pigments. **IUBMB Life**. v. 63, n. 2, p. 71-78, 2011.
- SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.98, n. 1, p 89-93, 2010.
- SANS-SERRAMITJANA, E. et al. Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 14, n. 3, p 1-8, 2015.
- SCHAFFAZICK, S. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHOREY, J. S.; SWEET, L. The mycobacterial glycopeptidolipids: Structure, function, and their role in pathogenesis. **Glycobiology**. v. 18, n. 11, p. 832–841, 2008.
- SEXTON, P.; HARRISON, A.C. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. **European Respiratory Journal**. v. 31, n. 6, p. 1322-1333, 2008.
- SHARMA, N.; TRIPATHI. A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**. v. 163, n. 3, p. 337-344, 2008.

SHARMA, P. R. et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**. v. 179, n. 2-3, p. 160-168, 2009.

SHI, C. et al. Antimicrobial Activity and Possible Mechanism of Action of Citral against *Cronobacter sakazakii*. **PLoS One**. v. 11, n. 7, 2016.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Current Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 14, p. 2129-2145, 2011.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 252, p. 28-49, 2017.

SMERIGLIO, A. et al. Essential oil of *Citrus lumia* Risso: Phytochemical profile, antioxidant properties and activity on the central nervous system. **Food and Chemical Toxicology**. 2017.

SONG, T.; DUPERTHUY, M.; WAI, S. N. Sub-Optimal Treatment of Bacterial Biofilms. **Antibiotics**. v. 5, n. 2, 2016.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**. v. 4, n. 3, p. 223–229, 2013.

SOUSA, S. et al. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. **International Journal of Mycobacteriology**. v. 4, n. 1, p. 36-43, 2015.

STEED, K. A.; FALKINHAM, J.O. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 6, p. 4007-4011, 2006.

SUGUMAR, S. et al. Chandrasekaran, Bio-based nanoemulsion formulation, characterization and antibacterial activity against food-borne pathogens. **Journal of Basic Microbiology**. v. 53, n. 8, p. 677-685, 2013.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**. v. 159, n. 3, p. 339-45, 2005.

TENG, R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 227, n. 2, p. 171-174, 2003.

TORTOLI, E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy : the New Mycobacteria of the 1990s Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy : the New Mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, n. 2, p. 319-354, 2003.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v. 48, n. 2, p. 159-178, 2006.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial activity of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

VAN INGEN, J. et al. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 15, n. 10, p. 888-893, 2009.

VAN INGEN, J.; KUIJPER E. J. Drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Future Microbiology**. v. 9, n. 9, p. 1095-1110, 2014.

VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**. v. 1, n. 3, 2014.

VERA, S. S. et al. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. v. 113, n. 7, p. 2647-2654, 2014.

VICENTE, I.C.S. 2003. **Atividade bactericida de um novo derivado 1,2,4 oxadiazol-hidrazida frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.

XIANG, X. et al. Mycobacterium Biofilms : Factors Involved in Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**. v. 24, n. 3, p. 269-279, 2014.

YAMAZAKI, Y. et al. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 1, p. 819-825, 2006.

ZHA, C.; WANG, C.; LI, A. Toxicities of Selected Essential Oils, Silicone Oils, and Paraffin Oil against the Common Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae). **Journal of Economic Entomology**. 2017.

ZHAO, J. et al. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Flower Volatile Oils of *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* and *Fagopyrum Cymosum*. **Molecules**. v. 23, n. 1, 2018.