

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

Andressa Ester Rockenbach

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E
CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* COM
ÊNFASE EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa***

Santa Maria, RS
2023

Andressa Ester Rockenbach

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTOXICIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* COM ÊNFASE EM BIOFILMES DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Quintana Soares Lopes

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rockenbach, Andressa Ester
Atividade Antimicrobiana, Antibiofilme e
Citotoxicidade do Óleo Essencial de *Thymus vulgaris* com
Ênfase em Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* / Andressa
Ester Rockenbach.- 2023.
76 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientador: Leonardo Quintana Soares Lopes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. Óleo essencial 2. *Thymus vulgaris* 3. Atividade
antimicrobiana 4. Biofilmes 5. *Pseudomonas aeruginosa* I.
Christ Vianna Santos, Roberto II. Quintana Soares
Lopes, Leonardo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ANDRESSA ESTER ROCKENBACH, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Andressa Ester Rockenbach

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTOXICIDADE DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* COM ÊNFASE EM BIOFILMES DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 08 de maio de 2023:

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

Ana Júlia Figueiró Dalcin, Dr^a (UFN)

Patricia Kolling Marquezan, Dr^a (UFSM)

Santa Maria/RS
2023

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* COM ÊNFASE EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

AUTORA: Andressa Ester Rockenbach

ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos

COORIENTADOR: Leonardo Quintana Soares Lopes

Os biofilmes são caracterizados como um conjunto de microrganismos envoltos por uma matriz de polissacarídeos extracelular. *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, que expressa diversos fatores de virulência. A capacidade desse microrganismo em formar biofilmes tem aumentado significativamente a resistência aos fármacos existentes, dificultando o tratamento. Dessa forma, novas alternativas para o combate dessas infecções são urgentes, e nesse contexto, os óleos essenciais vêm sendo estudados por sua ampla ação antimicrobiana. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* vem demonstrando ação frente a diversos microrganismos, e pode ser considerado promissor no combate aos biofilmes. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e a citotoxicidade do óleo essencial de *T. vulgaris*, com ênfase em biofilmes de *P. aeruginosa* (Pa01). Foram utilizados os microrganismos: *P. aeruginosa* (Pa01), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Shigella flexneri* (ATCC 12022323A), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). O óleo essencial de *T. vulgaris* foi caracterizado por cromatografia gasosa, e a atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da disco-difusão e da microdiluição, para determinar a concentração inibitória e bactericida mínima. A atividade antibiofilme foi determinada através do ensaio de cristal violeta, da contagem de colônias viáveis no biofilme formado e da cinética do biofilme em relação ao tempo. A influência sobre a motilidade *swimming*, *swarming* e *twitching* de *P. aeruginosa* também foi avaliada através de meios de cultura específicos. A cito-genotoxicidade do óleo foi avaliada em três linhagens celulares saudáveis. A caracterização do óleo apresentou o timol (41,8%) e o para-cimeno (31,6%) como componentes majoritários. O óleo apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme frente todas as bactérias testadas. Frente à cepa Pa01, os resultados mostraram que o óleo é capaz de inibir e destruir o biofilme formado de forma significativa e rápida, como mostrou a cinética em relação ao tempo, além de ter mostrado influência sobre as motilidades *swimming*, *swarming* e *twitching*. Nas concentrações testadas (2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL), o óleo apresentou citotoxicidade nas três linhagens celulares utilizadas. O presente estudo demonstrou que o óleo essencial de *T. vulgaris* possui grande potencial antimicrobiano e antibiofilme, porém outros estudos são necessários para buscar alternativas para reduzir a citotoxicidade apresentada, para que esse possa ser utilizado como estratégia farmacológica.

Palavras-chave: Óleo essencial. *T. vulgaris*. Biofilmes. *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL, ANTIBIOFILM AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Thymus vulgaris* WITH EMPHASIS ON BIOFILMS OF *Pseudomonas aeruginosa*

AUTHOR: Andressa Ester Rockenbach
ADVISOR: Roberto Christ Vianna Santos
CO-ADVISOR: Leonardo Quintana Soares Lopes

Biofilms are characterized as a set of microorganisms surrounded by a matrix of extracellular polysaccharides. *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram negative bacillus, which expresses several virulence factors. The ability of these microorganisms to form biofilms has significantly increased resistance to existing drugs, making treatment difficult. Thus, new alternatives to combat these infections are urgent, and in this context, essential oils have been studied for their broad antimicrobial action. The essential oil of *Thymus vulgaris* has been demonstrating action against several microorganisms, and can be considered promising in the fight against biofilms. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial, antibiofilm and cytotoxicity of *T. vulgaris* essential oil, with emphasis on *P. aeruginosa* biofilms (Pa01). The following microorganisms were used: *P. aeruginosa* (Pa01), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Shigella flexneri* (ATCC 12022323A), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) and *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). The essential oil of *T. vulgaris* was characterized by gas chromatography, and the antimicrobial activity was performed by the disk-diffusion and microdilution methods, to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentration. The antibiofilm activity was determined through the crystal violet assay, the count of viable colonies in the formed biofilm and the kinetics of the biofilm in relation to time. The influence on swimming, swarming and twitching motilities of *P. aeruginosa* was also evaluated using specific culture media. Cytogenotoxicity of the oil was evaluated in three healthy cell lines. The characterization of the oil showed thymol (41.8%) and paracymene (31.6%) as major components. The oil showed antimicrobial and antibiofilm activity against all tested bacteria. In relation to the Pa01 strain, the results showed that the oil is capable of inhibiting and destroying the formed biofilm significantly and quickly, as shown by the kinetics in relation to time, in addition to having shown influence on swimming, swarming and twitching motility. At the tested concentrations (2,5 mg/mL, 5 mg/mL and 10 mg/mL), the oil showed cytotoxicity in the three cell lines used. The present study demonstrated that the essential oil of *T. vulgaris* has great antimicrobial and antibiofilm potential, but further studies are needed to seek alternatives to reduce the cytotoxicity presented, so that it can be used as a pharmacological strategy.

Keywords: Essential oil. *T. vulgaris*. Biofilms. *P. aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Principais vias do metabolismo secundário das plantas.....	16
Figura 2- Esquema simplificado das rotas metabólicas precursoras do metabolismo secundário das plantas.....	17
Figura 3- <i>Thymus vulgaris</i>	20
Figura 4- Estrutura química do Timol e Carvacrol.....	21
Figura 5- Etapas da formação do biofilme.....	25
Figura 6- Inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>S. mutans</i> por <i>T. vulgaris</i>	47
Figura 7- Destruição do biofilme de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>S. mutans</i> pelo óleo de <i>T. vulgaris</i>	49
Figura 8- Efeito de inibição e destruição do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> (Pa01) e Isolados clínicos 15, 20 e 22.....	50
Figura 9- Cinética de atividade do biofilme de Pa01 em relação ao tempo.....	55
Figura 10- Atividade do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> na motilidade <i>swarming</i> de Pa01.....	56
Figura 11- Atividade do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> na motilidade <i>twitching</i> de Pa01.....	57
Figura 12- Atividade do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> na motilidade <i>swimming</i> de Pa01.....	57
Figura 13- Cito-genotoxicidade do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> em linhagem de células mononucleares do sangue periférico.....	59
Figura 14- Citotoxicidade do óleo essencial de Tomilho em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HACAT).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição dos meios de cultura específicos para cada tipo de motilidade.....	37
Tabela 2- Composição do óleo essencial de Tomilho (<i>T.vulgaris</i>).....	42
Tabela 3- Diâmetros dos halos de inibição do óleo essencial de <i>T.vulgaris</i> pelo método de disco-difusão frente microrganismos.....	43
Tabela 4- Contração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo de <i>T. vulgaris</i> frente microrganismos.....	45
Tabela 5- Contagem de colônias viáveis no biofilme após tratamento com o óleo de <i>T. vulgaris</i>	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	PLANTAS MEDICINAIS	14
3.2	METABOLISMO SECUNDÁRIO DAS PLANTAS.....	15
3.2.1	Terpenos e Fenilpropanóides	16
3.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	17
3.4	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Thymus vulgaris</i>	19
3.5	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	22
3.6	BIOFILMES	24
3.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.9	<i>Escherichia coli</i>	29
3.10	<i>Enterococcus faecalis</i>	30
3.11	<i>Streptococcus mutans</i>	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE <i>T. vulgaris</i>	33
4.2	MICROORGANISMOS.....	33
4.3	DISCO-DIFUSÃO	34
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA.....	34
4.5	INIBIÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME	35
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NO BIOFILME	36
4.7	CINÉTICA DE ATIVIDADE EM BIOFILME FORMADO.....	36
4.8	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE BACTERIANA	37
4.9	CITO-GENOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>T. vulgaris</i> EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	38
4.9.1	Cultura de células e tratamentos	38
4.9.2	Ensaio de MTT	38
4.9.3	Ensaio de óxido nítrico	39
4.9.4	Ensaio de DCFH-DA	40
4.9.5	Ensaio de Picogreen	40

4.10	CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>T. vulgaris</i> em FIBROBLASTOS MURINOS (L929) E QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT)	41
4.10.1	Linhagens celulares	41
4.10.2	Ensaio de viabilidade celular	41
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO POR CROMATOGRÁFICA GASOSA (GC-FID e GC/MS)	42
5.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	43
5.2.1	Disco-difusão	43
5.2.2	Concentração Inibitória e Bactericida Mínima	44
5.3	ATIVIDADE ANTIBIOFILME (INIBIÇÃO E DESTRUIÇÃO).....	46
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVIES NO BIOFILME.....	53
5.5	CINÉTICA DE ATIVIDADE EM BIOFILME FORMADO.....	54
5.6	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE BACTERIANA	56
5.7	AVALIAÇÕES DA CITO-GENOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>T. vulgaris</i>	58
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 80% das infecções em humanos são relacionadas com a formação de biofilmes (RICHARDS; REED; MELANDER, 2008). Esses são caracterizados por um conjunto de bactérias, de mesma espécie ou não, que estão encobertas em uma matriz polimérica autoproduzida, que se adere a uma superfície. Vivendo nesses aglomerados, os microrganismos compartilham seu material genético com facilidade, ao mesmo tempo que permanecem protegidos das condições ambientais adversas (WATNICK; KOLTER, 2000).

As infecções causadas por biofilmes microbianos representam um fardo socioeconômico significativo, que resulta em hospitalização, sofrimento do paciente, perda de empregos e redução da qualidade de vida. Além disso, os antimicrobianos convencionais muitas vezes não são capazes de combater essas infecções, principalmente devido a matriz polimérica produzida, que dificulta a penetração dos agentes microbianos, aumentando a resistência a esses fármacos. Dessa forma, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas alternativas para o combate a esses biofilmes (HUANG, 2020).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista Gram-negativo que causa infecções agudas e crônicas em feridas graves, trato urinário ou em pacientes submetidos à quimioterapia ou qualquer outra condição médica relacionada a um sistema imunológico enfraquecido, como fibrose cística (ŽIEMYTĚ et al., 2021). Além disso, a capacidade de formação de biofilme de *P. aeruginosa* contribui de forma expressiva para o desenvolvimento das infecções, pois os biofilmes protegem essa bactéria do ataque do sistema imunológico e do tratamento antimicrobiano convencional (LIU et al., 2021).

Os óleos essenciais têm sido amplamente estudados no controle de biofilmes por apresentarem amplo espectro de atividade antimicrobiana (BHATTI et al., 2014). Uma planta conhecida como tomilho (*Thymus vulgaris*) já é utilizada há bastante tempo como aromática e condimentar, e atualmente o seu óleo essencial vem sendo estudado por suas propriedades antissépticas, expectorantes, carminativas, antiespasmódicas e antimicrobianas. Essas características antibacterianas e antifúngicas se relacionam com dois de seus componentes principais: timol e carvacrol. (ITEN et al., 2009). Um número crescente de relatos indica que o timol pode atuar sobre alvos intracelulares para exercer a ação antibacteriana, além de

destruir a membrana celular bacteriana (AKERMI et al., 2022; PANDEY et al. 2021; RADI et al., 2021).

Dessa forma, o presente estudo visou investigar o potencial antimicrobiano, antibiofilme e a cito-genotoxicidade do óleo essencial de *T. vulgaris*, com maior aprofundamento em biofilmes de *P. aeruginosa*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica do óleo essencial de *T. vulgaris*, com ênfase em biofilmes de *P. aeruginosa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização do óleo essencial de *T. vulgaris*;
- Determinar a suscetibilidade de cepas e isolados clínicos frente ao óleo essencial de *T. vulgaris*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*, *E faecalis*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Pa01 e isolados clínicos);
- Avaliar o efeito antibiofilme, mensurando a capacidade de inibição e destruição do óleo essencial de *T. vulgaris* frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*, *E faecalis* e *P. aeruginosa* (Pa01 e isolados clínicos);
- Avaliar a cinética de atividade do biofilme de Pa01 tratado com o óleo de *T. vulgaris* em relação ao tempo;
- Realizar a quantificação das colônias viáveis no biofilme de Pa01 após tratamento com o óleo de *T. vulgaris*;
- Verificar a influência do óleo essencial nas motilidade *swimming*, *swarming* e *twitching* de *P. aeruginosa*;
- Avaliar a cito-genotoxicidade do óleo essencial de *T. vulgaris* células mononucleares do sangue periférico e linhagens de fibroblastos e queratinócitos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas pelo homem desde o início da civilização, uma vez que eram o único recurso terapêutico disponível para o tratamento e cura de enfermidades (CARNEIRO et. al, 2014). Papiros egípcios de 1.600 a.C listam muitos medicamentos feitos a partir de plantas, animais e minerais, destacando algumas plantas, como: funcho (*Foeniculum vulgare*), coentro (*Coriandrum sativum L.*), genciana (*Genciana lutea*), zimbro (*Juniperus cummunis L.*), tomilho (*Thymus vulgaris L.*), dentre outras. O conhecimento popular foi essencial para difundir a utilização das plantas no tratamento de enfermidades, o que aumenta o interesse pela descoberta de novas alternativas terapêuticas naturais e também pela validação científica do uso dessas plantas e extratos naturais (CARSON, 2006).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, abrigando mais de 20% do total de espécies do planeta, com mais de 46 mil espécies vegetais conhecidas que estão distribuídas nos seis biomas terrestres (BRASIL, 2023). É estimado que 14-18% das espécies de plantas superiores, gimnospermas e angiospermas, são utilizadas medicinalmente, e que 74% dos componentes derivados dessas plantas foram descobertos após o acompanhamento dos estudos etnobotânicos. Dessa forma, as plantas medicinais representam o recurso biológico mais rico dos sistemas tradicionais da medicina (ABBAS et al., 2017; KHAYAT et al., 2018).

Em 2006, foi aprovada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) juntamente com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como objetivo a promoção do uso sustentável da biodiversidade, desenvolvimento da cadeia produtiva e uso seguro e racional das plantas medicinais (CARVALHO, 2007).

Os estudos com esses recursos buscam entender essa variedade de atividades biologicamente ativas que esses vegetais possuem, sendo interesse de diversas áreas do conhecimento, como cosmética, farmacêutica, alimentícia, entre outras (ATHAYDES, 2010). Os fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% dos medicamentos em uso clínico em

todo o mundo. Atualmente, a busca por soluções para várias enfermidades humanas é contínua, e as plantas possivelmente poderão contribuir de maneira significativa para solucioná-las (PINTO, 2002; NEWMAN et al., 2020).

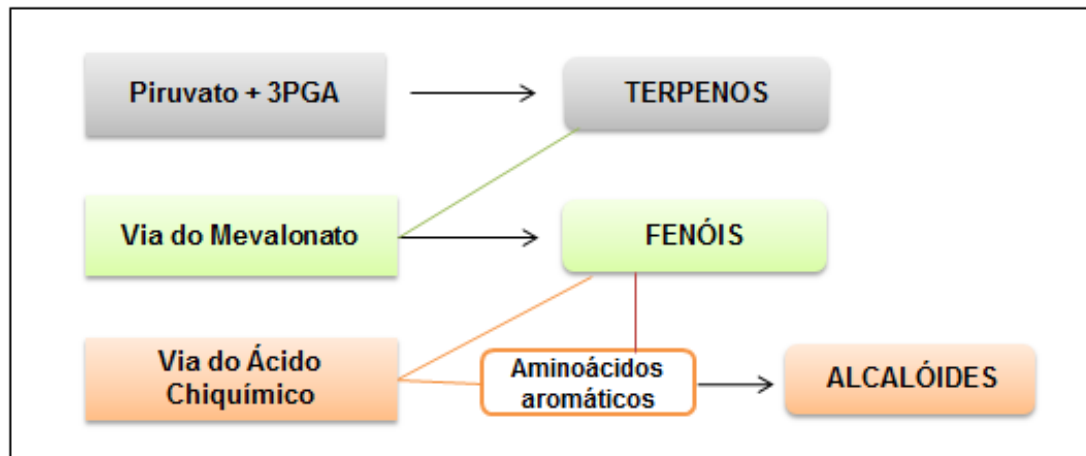
3.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO DAS PLANTAS

Diversas substâncias bioativas, provenientes da biossíntese do metabolismo vegetal das plantas, são responsáveis pela atividade biológica dos vegetais (CUNHA et al., 2016). O metabolismo vegetal gera compostos químicos denominados metabólitos, que compreendem dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários são provenientes do conjunto de reações ligadas aos processos vitais de respiração, fotossíntese e formação de novos tecidos nas plantas, responsáveis pela síntese dos carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Em contrapartida, os metabólitos secundários não são essenciais às plantas, mas asseguram vantagens para o desenvolvimento e permanência da planta no meio ambiente, como proteção das mudanças de temperatura, exposição à luz e raios ultravioletas, níveis de água, mecanismo de defesa, entre outros (ROSSO, 2019).

Os metabólitos secundários geralmente são substâncias que possuem baixo peso molecular, encontradas em baixas concentrações, porém com atividades farmacológicas pronunciadas. Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (Figura 1) (SILVA, 2013).

Figura 1 - Principais vias do metabolismo secundário das plantas.



Fonte: (Adaptação de ROSSO, 2019).

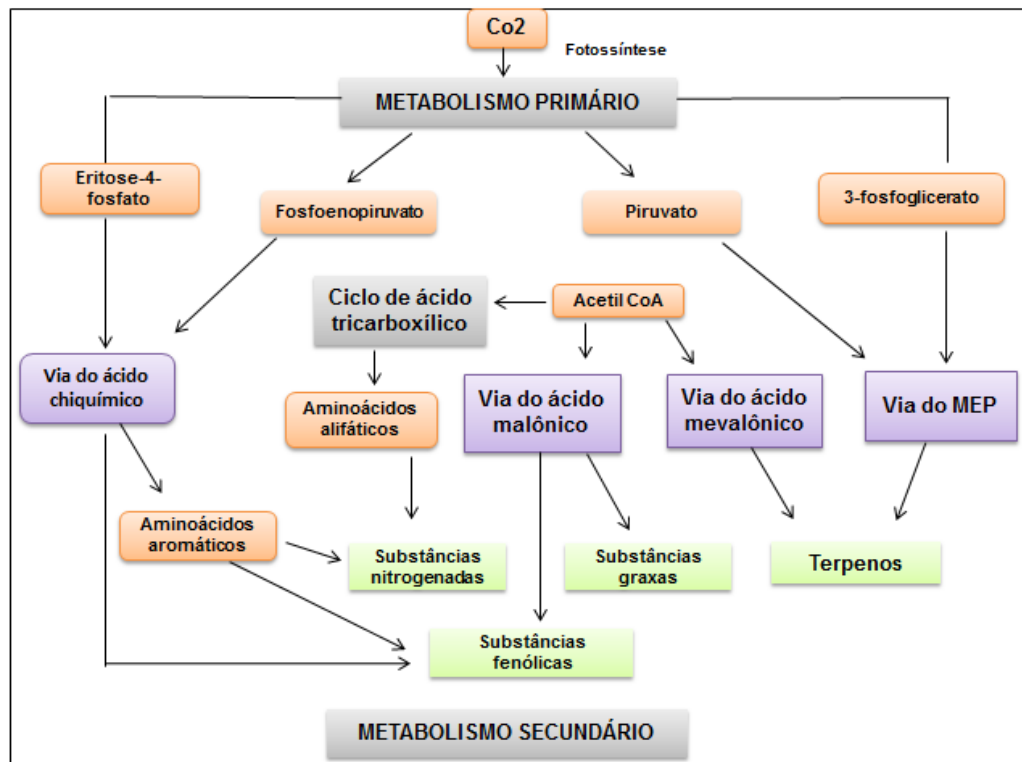
3.2.1 Terpenos e Fenilpropanóides

Os terpenos são compostos que constituem uma classe de produtos naturais, obtidos das plantas, que apresentam uma grande variedade estrutural e funcional (RAVEN et al., 2001; PHILLIPS et al., 2008). São um dos principais grupos formados a partir do metabolismo secundário das plantas (Figura 2). Esses compostos apresentam uma dupla ligação carbono-carbono, sendo caracterizados como hidrocarbonetos insaturados. Os terpenos também podem ser denominados terpenóides, quando possuem em sua estrutura moléculas de oxigênio. A sua constituição é baseada em unidades de isoprenos (cinco carbonos) ligados por ligação 1-4 (“cabeça-cauda”) (ROSSO, 2019).

A volatilidade dos terpenos é associada ao tamanho da sua cadeia carbônica. Dessa forma, os monoterpenos (10 carbonos) e sesquiterpenos (15 carbonos) são substâncias voláteis e, por esse motivo, são mais frequentes nos óleos essenciais (cerca de 90% dos óleos essenciais) (FEHLBERG, 2011; ALMEIDA, 2015).

Os fenilpropanóides costumam ser substâncias voláteis, e são considerados, juntamente com os monoterpenos e sesquiterpenos, constituintes dos óleos essenciais (JAKIEMIU, 2008). Esses derivados fenólicos também são provenientes do metabolismo secundário das plantas, e são constituídos por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos (ROSSO, 2019).

Figura 2 - Esquema simplificado das rotas metabólicas precursoras do metabolismo secundário das plantas.



Fonte: (Adaptado de Taiz e Ziegler, 2009).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Formados a partir do metabolismo secundário das espécies vegetais, os óleos essenciais são substâncias voláteis, perfumadas, com consistência oleosa e tipicamente produzidas pelas plantas. São sintetizados por todos os órgãos vegetais, ou seja, por brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, sendo armazenados em células secretoras, cavidades, canais e células epidérmicas (BAKKALI et al., 2008). Esses são misturas aromáticas lipofílicas, que se apresentam na forma líquida, levemente amarelada ou incolor, instáveis na presença de calor e umidade, com forte odor característico, solúveis em solventes orgânicos, possuindo baixa polaridade (DAMASCENO, 2007).

São formados por uma associação complexa de substâncias naturais, devido à diversidade de grupos funcionais dos seus constituintes, como os hidrocarbonetos, álcoois, cetonas ésteres, aldeídos, fenóis e éteres (LIMA et al., 2010; ALMEIDA, 2015). O Brasil está entre os quatro grandes produtores mundiais de óleos

essenciais, juntamente com a China, Indonésia e Índia (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

A composição química e o rendimento dos óleos essenciais podem variar de acordo com a parte da planta, clima, genética, época de coleta, localização e também com o método de extração utilizado. Esses fatores podem influenciar diretamente nas propriedades biológicas dos óleos essenciais, além de fazer com que uma mesma espécie apresente diferentes composições (CIOLFI, 2010; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; RAI et al., 2017).

Os óleos essenciais podem ser obtidos através de diferentes métodos de extração. Os métodos mais comumente empregados são arraste direto por vapor d'água, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos e extração com fluidos supercríticos (ROCHA, 2013). A escolha do método a ser empregado depende da localização do óleo essencial no vegetal, para que não haja influência e para que as características físico-químicas sejam preservadas (JAKIEMIU, 2008).

Esses vêm sendo estudados para fins terapêuticos, e já são reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, espasmolíticas, sedativas, antioxidantes e antimicrobianas (BHATTI et al., 2014). Apesar de o mecanismo terapêutico desses óleos não estar totalmente elucidado, já existem estudos que mostram ótima atividade antimicrobiana contra uma série de microrganismos planctônicos e também sobre biofilmes (SADERI et al., 2003; SULISTYANI et al., 2016; HANS et al., 2016). Os estudos que se aprofundaram em desvendar os mecanismos de ação dos óleos essenciais demonstram que o efeito que esses possuem se dá principalmente devido as alterações na permeabilidade da membrana plasmática, causando extravasamento de K^+ , ATP e outros materiais celulares, além de redução do pH intracelular, alterações na morfologia celular, redução da atividade da urease e inibição da atividade respiratória (BARBOSA, 2019).

Na literatura, encontram-se diversos estudos que vêm sendo realizados com grande variedade de óleos essenciais e para diversas finalidades. Glowniak e colaboradores (2020) realizaram um estudo *in vitro* com 26 óleos essenciais comerciais frente à bactéria *Helicobacter pylori*, e os que apresentaram melhores resultados de concentração inibitória mínima foram selecionados (nove óleos essenciais). Os resultados demonstraram que os óleos essenciais mais ativos foram os óleos de tomilho, capim-limão, cedro, erva-cidreira e óleo de orégano, que

também apresentaram atividade de inibição da urease. Os mais ativos contra as cepas clínicas de *H. pylori* foram os óleos de cedro e orégano, demonstrando serem potenciais alternativas terapêuticas frente essa bactéria.

Panikar e colaboradores (2021) avaliaram o efeito de óleos essenciais como uma efetiva alternativa terapêutica para o tratamento da COVID-19. O estudo avaliou os compostos bioativos dos óleos essenciais das espécies *Eucalyptus* e *Corymbia*. Os resultados deste estudo relataram que o óleo essencial das espécies citadas, principalmente o eucaliptol, pode ser utilizado como um potencial inibidor contra a COVID-19, podendo ser usado em seu tratamento. Entretanto, ainda são necessários testes adicionais para que possam ser utilizados efetivamente na medicina.

Em 2019, Vidanã e colaboradores utilizaram um modelo animal de administração crônica de alta dose de corticosterona, como forma de induzir comportamento semelhante à depressão e ansiedade, com neurogênese reduzida, para explorar as mudanças biológicas trazidas pela aromaterapia com o óleo essencial de Lavanda. Os resultados demonstraram que o tratamento foi capaz de melhorar o comportamento do tipo depressão, apresentar efeito neurogênico e aumentar a complexidade dendrítica, além de aumentar a concentração de ocitocina no soro.

Costa e colaboradores (2019) testaram a capacidade antimicrobiana e antibiofilme de microemulsões contendo o óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) frente *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. Os resultados mostraram ação contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. typhimurium* com valores de CIM e CBM de $3,9 \mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$, mostrando atividade antimicrobiana satisfatória. Para a atividade antibiofilme, uma redução significativa foi observada para *S. typhimurium* e *S. aureus*, além de que a biomassa do biofilme reduziu significativamente para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE *T. vulgaris*

T. vulgaris é uma planta cuja espécie pertence à ordem *Lamiales*, da família *Lamiaceae*, e do gênero *Thymus*, comumente conhecida como tomilho, nativa do sul da Europa, tendo distribuição mundial (HOSSEINZADEH et al., 2015). A família

Lamiaceae possui 150 gêneros, em torno de 2800 espécies, distribuídas por todo mundo. Entre essas, as espécies que se destacam são a sálvia (*Salvia officinalis*), o manjeriço (*Ocimum basilicum*), o orégano (*Origanum vulgare* L.), a manjerona (*Origanum majorana* L.) e o tomilho (*Thymus vulgaris*), entre outras (ROCHA et al., 2012). É um subarbusto perene, ereto, ramificado, muito aromático, de 20-30 cm de altura, com ramos levemente cobertos de pelos brancos e de folhas simples pequenas, verde escuras, de forma oval e com comprimento entre 6 a 12 mm (Figura 3).

É utilizado como planta medicinal e como especiaria, e seu óleo essencial possui atividades antimicrobianas e antioxidantes amplamente descritas na literatura (CUTILLAS et al., 2018). É uma planta utilizada desde os primórdios da civilização, especialmente como agente antisséptico e para a conservação de alimentos (STAHL-BISKUP; SAEZ, 2002).

Figura 3 - *Thymus vulgaris*.



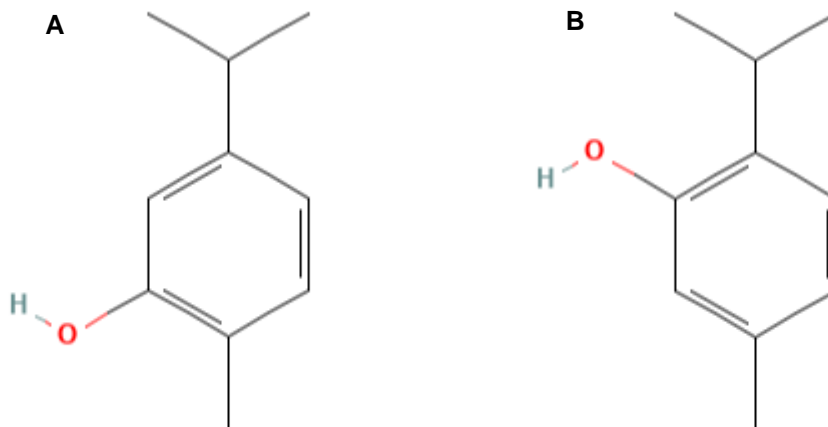
Fonte: Jardim Botânico da UTAD, disponível em:
https://jb.utad.pt/especie/Thymus_vulgaris_subesp_vulgaris#imagem-7854.

A planta foi relatada pelo seu amplo espectro de ação, tendo efeito contra bactérias, fungos e partículas virais. Teve atividade em casos de infecções e infestações intestinais variadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Seu componente majoritário, o timol, demonstrou efeito contra enterobactérias e cocos Gram positivos (REDDY et al., 2014). O seu óleo essencial é considerado um

dos produtos com a mais pronunciada atividade antimicrobiana (ITEN et al., 2009). O óleo essencial de *T. vulgaris* também possui ação antisséptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica (JAKIEMIU et al., 2010).

Sua atividade biológica está relacionada aos seus principais constituintes: o timol e o carvacrol (Figura 4). O timol, também conhecido por 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol, e seu isômero carvacrol, com a denominação de 2-meil-5(1-metiletil)-fenol diferem na sua estrutura apenas pela posição do grupo hidroxila no anel fenólico, ambos sendo monoterpenos. (ALMEIDA, 2015). O timol vem demonstrando efeitos antifúngicos, antibacterianos e anti-helmínticos, e o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (SAKURAI et al., 2016). O mecanismo de ação do timol e do carvacrol contra os diversos microrganismos ocorre através do rompimento da membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade do meio e causando vazamento dos componentes intracelulares e desregulação da função celular, levando a morte dos microrganismos. (XU et al., 2008).

Figura 4 - Estrutura química do Timol (A) e Carvacrol (B).



Fonte: Pubchem (2023).

Vários estudos vêm demonstrando a ação do óleo essencial de *T. vulgaris* frente à *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *S. epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* (LEVIC et al., 2011; AL-SHUNEIGAT et al., 2014; HUSSEIN et al., 2014; KON; RAI, 2012; MOHSENIPOUR; HASSANSHAHIAN, 2015).

Alibi e colaboradores (2020) estudaram as atividades antimicrobiana, anti-biofilme, *anti-quorum sensing* e antioxidante de quatro óleos extraídos de *Cinnamomum verum*, *Origanum majorana*, *T. vulgaris* e *Eugenia caryophyllata* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes. O estudo demonstrou que os óleos de *C. verum*, *T. vulgaris* e *E. caryophyllata* apresentaram importante atividade antibacteriana, além de apresentarem uma notável atividade antibiofilme e *anti-quorum sensing* contra quase todas as espécies estudadas.

Em 2019, Reyes-Jurado e colaboradores estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho, orégano (*Lippia berlandieri*) e mostarda (*Brassica nigra*) contra diversas bactérias e fungos por meio do teste de difusão em fase de vapor por cromatografia gasosa. Os microrganismos foram expostos aos vapores dos óleos essenciais e os resultados foram apresentados como concentrações inibitórias mínimas (CIMs). Os testes demonstraram que os óleos apresentam atividade antimicrobiana significativa, mostrando potencial para proteger alimentos embalados contra o crescimento microbiano.

Jafri e colaboradores (2020) testaram o potencial antifúngico e antibiofilme do óleo essencial de *T. vulgaris* e seu principal composto ativo, o timol, tanto isoladamente quanto em combinação com outros fármacos antifúngicos contra espécies de *Candida spp.* Concentrações sub-inibitórias do óleo e do timol foram capazes de reduzir significativamente os biofilmes. Outros testes também revelaram desagregação e deformação de hifas nas células do biofilme de *C. tropicalis* com concentrações sub-inibitórias de timol. Efeito significativo de *T. vulgaris* e timol também foi registrado em biofilmes pré-formados de *C. albicans* e *C. tropicalis*, além de apresentarem sinergia com fluconazol contra ambos os modos de crescimento planctônico e biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

3.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A descoberta e comercialização de fármacos antimicrobianos para tratar infecções revolucionaram a medicina moderna, trazendo alterações positivas no paradigma farmacêutico (SINGH et al., 2012). Entre os anos 40 e começo dos anos 70, período que ficou conhecido como a era de ouro da descoberta dos antimicrobianos, criou-se uma percepção equivocada de que as doenças infecciosas

já não representavam um grande problema de saúde, e o foco das pesquisas se tornou as doenças não infecciosas, fazendo com que a descoberta de novos antimicrobianos despencasse. Entretanto, a resistência aos antimicrobianos começou a aumentar (O'NEILL, 2016).

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde (2021), prevê-se que a resistência aos antimicrobianos cause 10 milhões de mortes por ano até 2050. Com a chegada da pandemia da COVID-19, a resistência aos antimicrobianos foi impulsionada pelo aumento do uso de antimicrobianos para tratar pacientes com essa doença.

Os microrganismos podem se tornar resistentes por mecanismos específicos, como: produção de enzimas que inativam o antimicrobiano, expressão de bomba de e-fluxo, alteração da permeabilidade ou absorção do antimicrobiano, redução do número ou afinidade aos locais de ligação do antimicrobiano, transferência de plasmídeos contendo genes de resistência e também pela formação de biofilmes em superfícies, dentre outros (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014; SINGH et al., 2017).

Outro fator de extrema importância é a habilidade que os microrganismos possuem de se adaptar ao uso indiscriminado de medicamentos, com o aumento da pressão seletiva. Essa resistência também pode ser impulsionada por fatores ambientais e epidemiológicos, como o uso desses fármacos em grande escala pelas indústrias avícola e pecuária, através de infecções hospitalares, prescrições impróprias e compra ilegal (KULAC et al., 2013; ROMO; QUIRÓS, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2023), a resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça crescente à saúde pública mundial, visto que esses mecanismos de resistência ameaçam a capacidade de tratamento de doenças infecciosas comuns, o que resulta em doença prolongada, incapacidade e morte. Além disso, a resistência antimicrobiana aumenta o custo da atenção médica com estadias mais longas em hospitais e necessidade de cuidados mais intensivos.

Segundo o relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de vigilância de uso Antimicrobiano (2022), com participação de 127 países, altos níveis de resistência (mais de 50%) foram relatados em bactérias que frequentemente causam sepse em hospitais, como *Klebsiella pneumoniae*. Mais de 20% das cepas isoladas de *E. coli* eram resistentes tanto aos medicamentos de primeira linha como os de segunda linha (OMS, 2022). Dessa forma, há uma grande necessidade no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater patógenos

existentes e emergentes, principalmente aqueles que possuem resistência às terapias disponíveis no mercado atualmente (TALBOT et al., 2006).

3.6 BIOFILMES

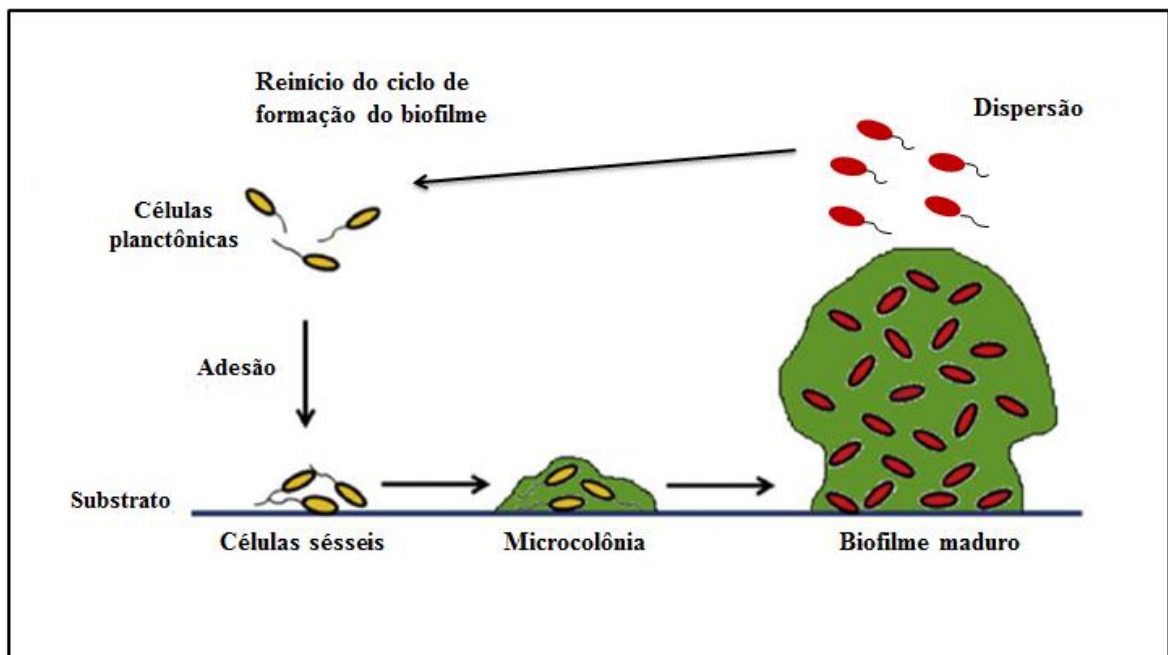
Os biofilmes podem ser definidos como comunidades ou ecossistemas microbiológicos complexos, onde os microrganismos se aderem a superfícies bióticas ou abióticas envolvidas por uma matriz polimérica, que é produzida por eles mesmos, e serve como proteção as defesas do hospedeiro e aos agentes terapêuticos (DUNNE, 2002). As bactérias presentes em biofilmes se encontram protegidas do sistema imunológico e da exposição aos antimicrobianos, tornando o biofilme de 10 a 1000 vezes mais resistente aos efeitos de um tratamento (HUANG et al., 2020).

A formação do biofilme acontece em vários estágios (Figura 5), e é um processo coordenado de eventos moleculares. O estágio inicial de adesão é chamado de adesão primária, e envolve interações físico-químicas entre as superfícies. Esse processo é iniciado com a aderência microbiana à superfície, e é condicionado a interferência de fatores biológicos (crescimento das células microbianas e sua divisão, produção e excreção de exopolissacarídeos) e não biológicos, que são as interações químicas (como as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio) que ocorrem entre as macromoléculas (BEHLAU; GILMORE, 2008). Além disso, a formação do biofilme requer um tipo especial de sinalização, chamada de *quórum sensing* (QS), entre as células dos microrganismos. Esse fenômeno pode ser entendido como um “sentido de grupo”, ou seja, as células que estão dentro da estrutura do biofilme se comunicam por meio de moléculas químicas, mostrando um modo de vida organizado onde se estabelecem atividades coordenadas (DONLAN, 2001).

Após esse estágio, os microrganismos concretizam o processo de adesão através da produção de exopolissacarídeos (EPS) formando complexos, caracterizando a adesão secundária. Em um terceiro passo, ocorre a maturação do biofilme, formado por microrganismos que são interceptados por canais de água, permitindo a entrada dos nutrientes. O biofilme então atinge uma massa crítica, e ocorre a liberação de células planctônicas que formam novos biofilmes (DUNNE,

2003; COSTERTON et al., 2003; LA TOURETTE et al., 2003). Essas células planctônicas podem se desprender de um biofilme maduro para colonizar outras áreas tanto de forma passiva, devido à erosão do biofilme por fatores mecânicos, quanto de forma ativa, que depende da degradação da matriz ou de algumas células dentro do biofilme de adquirirem novamente a sua motilidade e se desprenderem (TOYOFUKU, 2016).

Figura 5 – Etapas da formação do biofilme.



Fonte: (Adaptado de Bonez et al., 2017).

Não está claro como as células bacterianas percebem que chegaram a uma superfície sólida, porém uma teoria sugere que a resistência que é imposta por uma superfície mais dura pode ativar genes reguladores (KAZMIERCZAK, 2015). O biofilme maduro geralmente é composto de vários aglomerados de células, chamados de macrocolônias, que se intercalam com canais que permitem a passagem de água, nutrientes e metabólitos, envolvidos por uma matriz, que compõe cerca de 80% da massa do biofilme. Os biofilmes podem apresentar variedades de estruturas tridimensionais, que variam de acordo com o meio em que foram formados e também com as espécies de bactérias formadoras (YAWATA, 2008).

Os biofilmes permitem a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura, podendo ser de mesma espécie (monomicrobiano) ou não

(polimicrobiano). Quando ocorre o crescimento de diferentes espécies, pode existir uma interação de comensalismo, quando uma espécie é favorecida pela presença da outra (NICOLAEV; PLACUNOV, 2007). Existem diversas vantagens para os microrganismos que se encontram na forma de biofilme quando comparados aos de vida livre. Isso se dá devido à maior disponibilidade de nutrientes no agregado, interferindo nas taxas de crescimento, cooperação metabólica e proteção dos fatores externos (BEHLAU; GILMORE, 2008).

A maioria das infecções relacionadas a biofilmes estão associadas com a utilização de implantes médicos invasivos, como cateteres intravenosos e urinários e próteses ortopédicas. Um grande número de cateteres é inserido em pacientes todos os anos, e destes, mais de 60% acabam relacionados com a formação de biofilmes (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A resistência multifatorial desses biofilmes aos antimicrobianos e aos fatores externos tem sido a grande problemática para um sucesso terapêutico. Isso pode estar relacionado à dificuldade desses fármacos na penetração da matriz polimérica extracelular, principalmente pela presença dos EPS, que determinam a estrutura e a integridade do biofilme (KIVES; ORGAZ; SANJOSÉ, 2006). Além disso, a resistência também se dá devido às alterações fenotípicas dos microrganismos no biofilme, ao desenvolvimento de mecanismos de resistência e a associação do seu modo de crescimento a natureza crônica das infecções posteriores (TOMIHAMA et al., 2007).

Outros mecanismos que conferem essa gama de resistência multifatorial são: a presença de fímbrias, que favorecem a adesão do biofilme a superfície; a resistência mediada por enzimas, que é responsável por degradar metais pesados e compostos fenólicos e aromáticos; QS, responsável por regular a densidade populacional através da sinalização química; a heterogeneidade no metabolismo e taxa de crescimento, onde os microrganismos com baixa atividade metabólica, chamados de *persisters*, não são atingidos pelos fármacos que conseguem adentrar o biofilme; bombas de e-fluxo e resposta ao estresse (DONG et al., 2015; FAHED et al., 2017; KYIMACI et al., 2018).

3.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Consiste em uma bactéria Gram-negativa que se apresenta na forma de bacilo não esporulado, sendo conhecida por não utilizar glicose através das suas vias fermentativas. Está presente no meio ambiente, podendo ser encontrada no solo, na água, em vegetais e até mesmo em animais. Em relação a sua relevância clínica, é encontrada em associação com infecções nosocomiais e em pacientes imunocomprometidos (JAKOBSEN et al., 2013). Esse patógeno oportunista está frequentemente associado a infecções do trato urinário e do sistema respiratório, assim como dermatites, infecções dos tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas (SELEZSKA et al., 2012; PACZKOWSKI et al., 2017). A patogenicidade dessa bactéria está fortemente ligada à expressão de um grande número de fatores de virulência, que geram danos aos tecidos, retardam o reparo de feridas e suprimem a resposta imune inata (DUBERN; DIGGLE, 2008). A formação de biofilme é considerada, clinicamente, um fator tóxico e uma estratégia bacteriana que auxilia a *P. aeruginosa* a causar infecções crônicas como a obstrução da cicatrização de feridas, a fibrose cística nos pulmões e a colonização e infecção na superfície dos implantes (HUANG et al., 2020).

Os principais mecanismos de virulência dessa bactéria são os componentes de superfície da parede celular. As células da *P. aeruginosa* possuem flagelo e pili, que são responsáveis pelo seu movimento, o que facilita a invasão e a aderência às células epiteliais do hospedeiro, ligando-se a receptores específicos (STRATEVA; MITOV, 2011). A motilidade apresentada por essa bactéria é essencial para a sua fixação e colonização, tanto em reservatórios ambientais quanto em tecidos hospedeiros (MURRAY; KAZMIERCZAK, 2008). *P. aeruginosa* possui 3 tipos de motilidade: *swarming*, *swimming* e *twitching*. *Swimming* e *swarming* são ambas mediadas por flagelos e *twitching* é um movimento através de uma superfície mediada por pili tipo IV (KEARNS, 2010).

A motilidade do tipo *swimming* é caracterizada pelo movimento aleatório e desordenado de um microrganismo, causada por ação de um único flagelo. Já a motilidade do tipo *swarming* é descrita como um movimento contínuo, regular e altamente organizado promovido por um grupo de microrganismos contendo múltiplos flagelos. A motilidade do tipo *twitching* é menos compreendida, porém se sabe que esse tipo de translocação ocorre pela contração e extensão dos pilis na

superfície, ocorrendo preferencialmente com células bacterianas isoladas com ou sem flagelos (BONEZ, 2017).

Além disso, esse microrganismo é capaz de produzir quatro tipos de pigmentos: piocianina, pioverdina, piomelanina e piorrubina, sendo os dois primeiros os mais frequentemente detectados. A toxina piocianina, que é um pigmento fluorescente que está envolvido no processo de patogênese, sendo considerado um fator de virulência, prejudica a resposta imunológica do hospedeiro, além de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (MULLER, 2002). Esse pigmento desempenha efeitos tóxicos nos tecidos do hospedeiro, principalmente no epitélio respiratório. Os estudos mostram que biossíntese de piocianina foi necessária para a virulência de *P. aeruginosa* em modelos murinos de pneumonia e sepse, além de já terem sido detectadas elevadas concentrações dessa toxina em escarro de pacientes com fibrose cística (BROOKS, et al., 2014).

3.8 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é caracterizado por bactérias Gram positivas cocoides, produtoras de catalase, pertencentes à família *Micrococcaceae*, em que algumas fazem parte da microbiota natural dos seres humanos e de animais, sendo responsáveis por papéis fundamentais na manutenção da homeostase (PACHA et. al, 2021). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que tem formato de coco e tende a se organizar em aglomerados descritos como “semelhantes a uvas”. Suas colônias são douradas ou amarelas, podem crescer em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos e os testes bioquímicos mais comuns para identificação dessa espécie são a catalase positiva, coagulase positiva, sensível a novobiocina e fermentação do manitol positiva (LOWY, 1998; RASIGADE; VANDENESCH, 2014).

Essa espécie é uma das principais responsáveis por várias infecções adquiridas pela comunidade, nosocomiais e relacionadas a biofilmes em todo o mundo, sendo um dos principais patógenos humanos. A sua patogenicidade pode ser atribuída à ampla gama de fatores de virulência que esse patógeno produz para impedir as respostas imunes do hospedeiro (SURESH et. al, 2019). Essa bactéria é responsável por causar múltiplas infecções humanas, incluindo bacteremia, endocardite infecciosa, infecções de pele e tecidos moles, osteomielite, artrite

séptica, infecções de dispositivos protéticos, infecções pulmonares, gastroenterite, meningite, síndrome do choque tóxico e infecções do trato urinário (TONG et al., 2015).

Os mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro incluem a produção de uma cápsula antifagocítica, sequestro de anticorpos do hospedeiro ou mascaramento do antígeno pela Proteína A, formação de biofilme, sobrevivência intracelular e bloqueio da quimiotaxia de leucócitos (FOSTER, 2005; DELEO et al., 2009). Em relação ao cenário clínico do biofilme de *S. aureus*, esse é formado nas superfícies dos cateteres e dispositivos médicos implantados, se tornando resistentes a antimicrobianos e mecanismos de defesa inatos do hospedeiro. O tratamento, nesses casos, requer a substituição dos cateteres e implantes infectados por novos, e posterior tratamento com fármacos, resultando em aumento drástico no custo do tratamento (SURECH, 2019).

3.9 *Escherichia coli*

É uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo assim um bacilo Gram-negativo, não esporulante, anaeróbio facultativo e amplamente distribuído na natureza, tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal. A *E. coli* comensal, que está presente na microbiota normal do intestino, apresenta um papel fisiológico importante para o funcionamento do organismo, não sendo patogênica. Porém, existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção, sendo denominadas de *E. coli* diarreio gênicas, classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC). Essas categorias patogênicas são diferenciadas por serem altamente adaptadas e pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas (SOUZA et al., 2016, KAPER et al., 2004).

As principais infecções extraintestinais causadas por *E. coli* são as infecções do trato urinário (ITU), as sepses (frequentemente associadas à infecção urinária) e as meningites de recém-nascidos. As cepas causadoras destas doenças são coletivamente denominadas *E. coli* extraintestinais (ExPEC) (JOHNSON; RUSSO,

2005; PITOUT, 2012; RILEY, 2014). Os fatores de virulência conhecidos em ExPEC estão associados à capacidade de sobreviver ao ambiente e também à colonização, e os genes que codificam esses fatores de virulência estão localizados no cromossomo bacteriano e são separados em cinco grupos principais: adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro, produção de cápsula e invasinas (DALE; WOODFORD, 2015).

As infecções causadas por essa bactéria se agregam e são difíceis de erradicar devido à formação de biofilmes, causando várias complicações associadas a dispositivos médicos, como cateteres uretrais e intravasculares, articulações protéticas e shunts e enxertos protéticos. A formação de biofilme por *E. coli* em cateteres torna as infecções do trato urinário associadas a cateteres uma das infecções nosocomiais mais frequentes (REISNER et al., 2014). Dessa forma, há uma urgência em explorar agentes terapêuticos alternativos para combater as doenças originadas especialmente devido à formação de biofilme de *E. coli* (SHARMA et al., 2016).

3.10 *Enterococcus faecalis*

O gênero *Enterococcus* faz parte da família *Enterococcaceae*, e é composto por 58 espécies descritas até o momento (PARTE, 2014). Pertence ao grande grupo das bactérias Gram-positivas, sendo ovoides e não esporuladas, arranjando-se em células individuais, pares ou cadeias curtas, podendo ou não apresentar motilidade, e são anaeróbios facultativos. Também se caracterizam por serem patógenos oportunistas que apresentam a habilidade de colonizar e permanecer em diversos ambientes e hospedeiros, podendo ser encontrados na microbiota do trato gastrointestinal de muitos animais, incluindo os seres humanos (OLIVEIRA, 2019).

Os enterococos ganharam notoriedade ao longo das últimas décadas como causas frequentes de infecções da corrente sanguínea, do trato urinário e de feridas cirúrgicas adquiridas em hospitais, resistentes a múltiplos antibióticos e por causa de sua capacidade de transferir resistências a antibióticos para outros microrganismos. Embora mais de uma dúzia de diferentes espécies de enterococos tenham sido associadas a doenças humanas, a maioria das infecções por enterococos humanos é causada pela espécie *Enterococcus faecalis* (MCBRIDE et al., 2007). A maioria

das infecções enterocócicas é originária da microbiota do próprio paciente, e em menor proporção podem ser transmitidas por contato ou pelo consumo de alimentos contaminados (KONEMAN et al., 2014).

Os enterococos têm sido associados a biofilmes em vários tipos de dispositivos médicos internos, como próteses artificiais de quadril, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas protéticas, cateteres venosos centrais e cateteres urinários (TENDOLKAR et al., 2004). Além disso, *E. faecalis* é o microrganismo predominante e ocasionalmente a única espécie detectada em canais radiculares de dentes associados a lesões periradiculares persistentes, sendo capaz de invadir os túbulos dentinários e permanecer viável dentro desses por um período prolongado de tempo, se aderindo e formando biofilme na dentina sob diferentes condições ambientais, resistindo a desinfetantes intracanalais (WU et al., 2014).

Eles são intrinsecamente resistentes/tolerantes a muitos antibióticos e são capazes de adquirir resistência a medicamentos por cromossomo, transferência de plasmídeo ou aquisição de transposon contendo sequências genéticas que conferem resistência em outras bactérias. Dessa forma, os casos de Enterococos resistentes à vancomicina vêm aumentando, causando um sério problema no tratamento das infecções por essa bactéria, mas também pelo fato de que o microrganismo pode transferir horizontalmente esta resistência determinante para outras espécies susceptíveis à vancomicina (UPADHYAYA et al., 2009).

3.11 *Streptococcus mutans*

S. mutans é um microrganismo pertencente à família *Streptococcaceae* e ao filo firmicutes, em formato de coco, Gram-positivo, anaeróbio facultativo e catalase negativo. A maioria das cepas isoladas é α -hemolítica ou não-hemolítica e podem ser encontradas em quatro sorotipos: c, e, f e k (BITTENCOURT, 2020).

É considerado um dos agentes causadores primários de cárie dentária e também podem ser uma fonte de endocardite infecciosa. Os principais fatores de virulência associados à cariogenicidade incluem adesão, acidogenicidade e tolerância a ácidos. Cada uma dessas propriedades funciona de forma coordenada para alterar a ecologia do biofilme dentário (BANAS, 2004).

Esses fatores de virulência são divididos em três atributos principais: a capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir de sacarose, que auxiliam na colonização de superfícies duras e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular *in situ*; a capacidade de transportar e metabolizar uma ampla gama de carboidratos em ácidos orgânicos e a capacidade de prosperar sob condições de estresse ambiental, particularmente baixo pH (BOWDEN et al., 1990).

Existem estudos que sugerem que isolados de *S. mutans* têm maior capacidade de formar biofilme do que isolados de outras espécies de *Streptococcus* que colonizam o ambiente da cavidade oral humana. O crescente problema da resistência das cepas aos antibióticos traz a necessidade de buscar alternativas terapêuticas que lidem com patógenos da cavidade oral que sejam seguras para os usuários (KRZYSCIAK et al., 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE *T. vulgaris*

O óleo de *T. vulgaris* foi obtido comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio LTDA, Brasil. A amostra de óleo essencial foi diluída 1:100 em hexano. A análise do perfil do componente foi realizada usando um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID; Varian Star 3400) e um amostrador automático (Varian 8100). 1 µL do extrato foi injetado no modo split 1:20, com a temperatura do injetor em 250°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio a uma pressão de 15 psi. A separação dos analitos foi realizada por uma coluna capilar BPX5 (25 m × 0,22 mm; fase estacionária de 0,25 µm de espessura). A temperatura iniciou em 40°C por 1 min e aumentou 2°C.min⁻¹ até atingir 120°C, depois atingiu 250°C subindo 10°C.min⁻¹, onde permaneceu por 2 min. A temperatura do detector FID operou a 250°C. Os resultados foram expressos em porcentagem a partir da normalização das áreas dos picos cromatográficos em relação à área total.

A análise qualitativa dos compostos foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu GCMS QP-2010 Ultra) usando as mesmas condições cromatográficas descritas acima para GC-FID. O detector MS foi operado no modo de ionização de elétrons (EI) em um único analisador de massa quadrupolo no modo de varredura completa com uma faixa de 35 a 400 m/z. A interface GC/MS e a fonte de ionização foram mantidas a 250 e 200°C, respectivamente. A identificação dos analitos foi realizada comparando os espectros de massa experimentais com os encontrados na biblioteca do NIST. Adicionalmente, o índice de retenção linear dos compostos foi calculado usando uma série homóloga de alcanos e comparado com aqueles descritos na literatura (ADAMS, 1995).

4.2 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa* (Pa01), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC

700603), *Shigella flexneri* (ATCC 12022323) e os isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* enumerados como 15, 20 e 22 pertencentes ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria.

4.3 DISCO-DIFUSÃO

O teste de susceptibilidade foi realizado inicialmente pela técnica de disco-difusão, previamente descrita por Bauer e colaboradores (1966) em ágar Mueller Hinton. A partir de uma colônia do microrganismo, foi realizada uma suspensão em salina correspondente a 0,5 na escala Mc Farland. As suspensões contendo os microrganismos foram semeadas em uma placa, em todas as direções, contendo ágar Mueller Hinton e 10 µL do óleo de *T. vulgaris* foi adicionado ao disco que por sua vez foi depositado na placa. Após adicionar os discos, a placa foi incubada por 24 horas a 37°C, e as zonas de inibição foram mensuradas.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA

Colônias crescidas em ágar MacConkey e ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI) foram utilizadas para formar uma suspensão em salina correspondente a 0,5 na escala Mc Farland. O óleo de *T. vulgaris* foi previamente diluído com 5 mg/mL de DMSO e água destilada. A CIM foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços (CLSI, 2012) com modificações. Foi adicionado 100 µl de caldo Muller Hinton ou caldo BHI em todos os poços da placa, e em sequência foi realizada uma diluição seriada do óleo essencial de *T. vulgaris*, resultando em diferentes concentrações. Após esse procedimento, foi adicionado 15µl da suspensão contendo o microrganismo em todos os poços, exceto no controle negativo. O controle positivo de crescimento foi considerado o poço com inóculo em caldo e o controle negativo somente caldo sem o inóculo. O ensaio foi realizado em triplicata. Após o processo, a placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Após a incubação, foi considerada a CIM aquela em que o poço não demonstrou

crescimento microbiano visível. Para determinar a CBM, uma alíquota de 1 µL foi retirada de cada poço, semeada em ágar MacConkey ou BHI e incubada por 24 horas a 37°C. Após essa incubação, as colônias foram identificadas e a menor concentração que não demonstrou crescimento microbiano na placa foi considerada a CBM.

4.5 INIBIÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME

Para a destruição do biofilme, esse foi previamente formado de acordo com condições descritas (SANDBERG et al., 2009), com algumas modificações. Culturas com crescimento exponencial de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans* foram diluídas até 0,5 na escala Mc Farland. Após a diluição, 15µL desta suspensão foi adicionada em placa de 96 poços já contendo 100 µL de caldo MH (para *P. aeruginosa* e *E. coli*), caldo TSB com adição de 2% de glicose (para *S. aureus* e *E. faecalis*) e caldo BHI com adição de 2% de sacarose (para *S. mutans*) por poço. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Após a formação do biofilme, foi realizado o tratamento e novamente a placa foi incubada por 24 horas a 37°C.

Para o tratamento, foram divididos os grupos: grupo controle positivo de crescimento (inóculo bacteriano + caldo), grupo controle negativo de crescimento (somente caldo) e grupo óleo de *T. vulgaris* (inóculo bacteriano + caldo + óleo de *T. vulgaris*). As concentrações testadas foram relativas a 1× CIM, 2× CBM e 4× CBM.

Para o teste de inibição do biofilme, foram adicionados 100µL de caldo MH e 15 µL do inóculo bacteriano diluído a 0,5 na escala Mc Farland em uma placa de 96 poços. O tratamento foi adicionado no mesmo momento da formação do biofilme, sendo utilizadas concentrações sub-inibitórias ($\frac{1}{2}$ CIM, $\frac{1}{4}$ CIM E $\frac{1}{8}$ de CIM). Após a adição do tratamento, a placa foi incubada por 24 horas a 37°C.

Após o tratamento e a incubação, tanto para a destruição do biofilme como para a inibição, o sobrenadante foi removido e o poço foi lavado com água destilada para a realização da quantificação. O resultado da inibição e da destruição do biofilme foi medido fixando o biofilme em estufa à 60°C durante 60 minutos, e corando com cristal violeta a 1% por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Após

esse período, as placas foram lavadas com água destilada. Etanol a 95% foi adicionado para dissolver a coloração, e após 15 minutos, foi transferido 100µl de cada poço a uma nova placa para determinar a densidade óptica (570 nm) em leitor de microplacas. A capacidade do óleo em destruir e inibir o biofilme foi determinada pela diferença entre a média da densidade óptica (DO) obtida no controle positivo (caldo + inóculo bacteriano) e o tratamento com o óleo de *T. vulgaris*.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NO BIOFILME

Após a formação e o tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* (Pa01), o número de células viáveis foi determinado pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) após suspender as células do biofilme (LOPES et al., 2019). Brevemente, os biofilmes foram lavados com água destilada estéril para remover células que não estiverem aderidas, e então o biofilme foi ressuspendido com sucessivas pipetagens para romper o biofilme e liberar as células. A completa remoção foi confirmada pela coloração de cristal violeta. O biofilme resuspendido foi agitado em vórtex por 5 minutos para romper a matriz e após uma alíquota foi semeada em ágar MacConkey e incubada por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, as colônias dos biofilmes tratados foram contadas e comparadas com as do biofilme não tratado.

4.7 CINÉTICA DE ATIVIDADE EM BIOFILME FORMADO

A cinética da atividade do óleo essencial de *T. vulgaris* foi avaliada frente o biofilme de *P. aeruginosa* (Pa01) pela curva de combate dependente de tempo (LOPES et al., 2019). Os biofilmes foram previamente formados em microtubos e tratados com 1x CIM, 2x CBM e 4x CBM do óleo de *T. vulgaris*. Nos intervalos de 0, 3, 6, 12 e 24 horas, a atividade antibiofilme foi medida pela coloração por cristal violeta (1%) por 10 minutos. Após a coloração, os microtubos foram lavados 3 vezes com água destilada estéril. Após a descoloração com álcool etílico (95%), 150 µl foram transferidos para uma microplaca para leitura em D.O 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a absorbância determinada em espectrofotômetro.

4.8 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE BACTERIANA

A avaliação da motilidade bacteriana foi realizada com base no protocolo descrito por Déziel et al. (2001), com algumas modificações. As motilidades de *swimming*, *swarming* e *twitching* foram analisadas inoculando 4 µl de suspensão bacteriana da cepa padrão PA01 de *P. aeruginosa* no centro das placas contendo meio de cultura específico para cada tipo de motilidade (Tabela 1) . Após 24 h de incubação a 37°C, a motilidade foi avaliada por meio da análise da área circular formada pelas células bacterianas que migram para longe do local de inoculação (diâmetro dos halos formados). Os halos formados foram medidos e submetidos à análise estatística. O ensaio de motilidade foi realizado nos meios de cultura sem tratamento e nos meios contendo a concentração sub-inibitória do óleo de *T. vulgaris*. A interpretação foi realizada observando-se a variação do crescimento da colônia (em mm) a partir do ponto de inoculação, comparando-as com as culturas nas placas com e sem tratamento.

Tabela 1- Composição dos meios de cultura específicos para cada tipo de motilidade.

Componente	<i>Swimming</i>	<i>Swarming</i>	<i>Twitching</i>
Triptona	1%	-	1%
Peptona	-	0,5%	-
NaCl	0,5%	-	1%
Extrato de levedura	-	0,2%	0,5%
Glicose	-	1%	-
Ágar-ágar	0,3%	0,5%	1%
Água destilada	100 ml	100 ml	100 ml

4.9 CITO-GENOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *T. vulgaris* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

4.9.1 Cultura de células e tratamentos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), derivadas do sangue total de amostras descartadas de adultos saudáveis, foram obtidas do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana (LEAC-UFN) (protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da UFN) (CAAE número: 31211214.4.0000.5306) com ausência de dados de identificação.

As amostras de sangue foram processadas para separação de PBMC usando o procedimento com base na diferença no gradiente de densidade usando o Ficoll Histopaque-1077VR reagente (Sigma-Aldrich). Após o sangue ter sido descartado no reagente (1:1 v/v), as amostras foram centrifugadas por 30 minutos, 1500 RPM. PBMCs foram distribuídos em placas de 96 poços contendo meio celular RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino e suplementado com 1% de antibióticos. As células foram cultivadas em 2×10^5 células mL^{-1} por poço (BOTTON et al. 2015). Em seguida, as células foram expostas ao óleo essencial de *T. vulgaris* para o protocolo de eficácia descrito nesta pesquisa, em diferentes concentrações (2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL) por 24 h, para avaliar seu efeito na modulação celular por meio de diferentes ensaios colorimétricos e fluorimétricos. Todos os tratamentos e os ensaios foram realizados em triplicata para garantir análises estatísticas coerentes. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 200 μM foi usado como controle positivo para todos os testes.

4.9.2 Ensaio de MTT

No ensaio de redução de MTT, o sal de tetrazolium, hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto pela atividade da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto de formazan, insolúvel em água

e de coloração roxo-azulado, o qual se armazena no citoplasma celular (FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010). Assim, é possível estabelecer parâmetros de citotoxicidade e taxas de proliferação celular.

O ensaio foi realizado conforme o método de Mosmann (1983) e para este fim, ao completar os tempos de incubação das células, adicionou-se 20 µL da solução de MTT (0,01M e pH 7,4), na concentração de 5 mg/mL, diluída em PBS (tampão fosfato 1X). As placas que receberam a solução de MTT foram homogeneizadas e incubadas durante 2 horas a 37 °C, protegidas da luz, em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 2000 RPM por 10 minutos. Então, retirou-se o sobrenadante dos poços e as células foram ressuspensas em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

A absorbância é proporcional ao número de células viáveis e foi determinada por leitora Elisa Anthos 2010 (Labtec, Áustria) em comprimento de onda de 570 nm. Além disso, a determinação do potencial citotóxico foi apresentada como porcentagem em relação ao controle negativo (células em meio de cultura).

4.9.3 Ensaio de óxido nítrico

O teste de óxido nítrico (ON) detecta a presença de nitrito orgânico na amostra. Este é detectado e analisado quando se adiciona o reagente de Griess na amostra contendo NO₂ e a coloração rosa aparece na solução (CHOI et al., 2012; NOH et al., 2015). Para este ensaio, a amostra utilizada foi o sobrenadante da cultura celular, onde se adicionou 50 µL deste em uma nova placa de 96 poços. A seguir, foi adicionado 50 µL da solução de Griess, composta por uma solução I (Sulfanilamida 1%) + a solução II (N-1-naftiletilediamino-biclorado 0,1%), na proporção 1:1. A amostra foi mantida no escuro, em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Por último, a absorbância foi determinada por leitora de ELISA, em comprimento de onda de 570 nm.

4.9.4 Ensaio de DCFH-DA

O ensaio fluorimétrico de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é baseado na desacetilação desta substância por esterases citosólicas em diclorofluoresceína (DCFH). A DCFH é um produto não fluorescente que quando em contato com espécies reativas é convertido em diclorofluoresceína (DCF). A DCF, por sua vez, possui característica fluorescente e é facilmente visualizada, pois quando excitada a 488 nm emite luz de 525 nm. Este ensaio é comumente utilizado para medir o nível de espécies reativas no sobrenadante celular, principalmente o peróxido de hidrogênio, sendo diretamente proporcional à intensidade da fluorescência (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Para esta técnica, foi utilizada placa preta de 96 poços, onde adicionou-se 50 µL do sobrenadante da cultura celular, 65µL de Tris-HCl (10 mM, pH =7,4) e 10 µL do reagente DCFH-DA. Posteriormente, a placa foi incubada por 1 h, no escuro. A leitura de fluorescência foi determinada por Fluorímetro, em 525 nm de emissão e 488 nm de excitação.

4.9.5 Ensaio de *Picogreen*

A avaliação de genotoxicidade dos compostos foi analisada por um ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA de fita dupla extracelular livre (dsDNA) no meio devido a apoptose celular. Para isso, utilizou-se o reagente PicoGreen®, corante fluorescente capaz de se ligar ao dsDNA (COSSETIN et al., 2019). Para a realização do ensaio, foi utilizada uma placa preta de 96 poços, onde adicionou-se 10 µL do sobrenadante da cultura celular, 80 µL de TE 1X (Tris HCl 10mM e EDTA 1 mM pH=7,5) e 10 µL do reagente DNA PicoGreen®. Posteriormente, a placa foi incubada por 1 hora, no escuro. A leitura de fluorescência foi determinada por Fluorímetro em 520 nm de emissão e 480 nm de excitação.

4.10 CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *T. vulgaris* em FIBROBLASTOS MURINOS (L929) E QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT)

4.10.1 Linhagens celulares

As células de fibroblastos murinos L929 e os queratinócitos humanos HACAT foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ. As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich®) com baixo teor de glicose, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), penicilina/estreptomicina (100 U/L) (Sigma®), em incubadora de atmosfera umidificada de 5% CO₂ (Laboven).

4.10.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de brometo de 3(4,5-dimetil)-2,5 difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®) em células L929 3×10^4 células/poço e para HCAT 4×10^4 células/poço semeadas em placas de 96 poços. O ensaio foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983). Após 24h, o meio de cultura foi removido e substituído por um meio fresco, e cada linhagem celular foi exposta ao tratamento com o óleo essencial de *T. vulgaris* nas concentrações de 2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste Qui-quadrado para análise das variáveis categóricas. Para comparações entre grupos, foi utilizada a análise da variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, caso as variáveis apresentassem uma distribuição normal. As análises foram realizadas nos softwares GraphPad Prism 5.0 for Windows ou SPSS 13.0. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO POR CROMATOGRÁFICA GASOSA (GC-FID e GC/MS)

A caracterização do óleo essencial de *T. vulgaris* por cromatografia gasosa possibilitou a identificação e quantificação de 99,6% dos componentes do óleo. Os componentes majoritários foram o timol (41,8%), para-cimeno (31,6%) e gama-terpineno (6,6%), seguido de diversos outros terpenos em menores concentrações (Tabela 2).

Tabela 2- Composição do óleo essencial de Tomilho (*T.vulgaris*).

Compostos	TR	IRE	IRL	Média (%)
alfa-Pineno	7,067	923	939	3,17
Canfeno	7,608	935	953	1,07
Mirceno	10,083	990	991	1,08
Para-cimeno	11,500	1016	1026	31,66
gama-Terpineno	13,475	1050	1062	6,66
Linalol	16,233	1097	1098	4,93
Cânfora	18,125	1127	1143	1,70
Isoborneol	19,058	1141	1156	0,51
Borneol	19,725	1152	1165	1,01
Terpinen-4-ol	20,950	1171	1177	0,64
Timol	28,833	1293	1290	41,88
Carvacrol	29,483	1303	1302	3,19
Beta-cariofileno	35,550	1400	1418	0,87
Óxido Cariofileno	3,733	1573	1581	1,22
Total:				99,61%

TR: tempo de retenção; IRE: índice de retenção experimental; IRL: índice de retenção da literatura.

A composição e as quantidades dos constituintes presentes nos óleos essenciais dessa espécie podem sofrer alterações, pois muitos fatores influenciam nesse aspecto, como: o ciclo vegetativo da planta, a idade, condições climáticas, época de coleta, condições do solo, método de extração e localização da planta (LIMA et al., 2010, ROMERO et al., 2012).

A composição do óleo essencial de *T. vulgaris* já é conhecida na literatura. Em 2014, Ahmad e colaboradores realizaram a identificação dos compostos do óleo essencial de *T. vulgaris*, obtendo mais de 95% dos componentes identificados, sendo os principais o timol (60,18%), para-cimeno (15,44%) e o gama-terpineno (6,39%). Boruga e colaboradores (2014) determinaram a composição química do óleo essencial de *T. vulgaris* cultivado na Romênia, sendo os principais componentes o timol (47,59%), o gama-terpineno (30,9%) e o p-cimeno (8,41%).

Em 2021, Galovicová e colaboradores obtiveram o óleo essencial de *T. vulgaris* comercialmente de empresa eslovaca e realizaram a identificação dos componentes, sendo os principais o timol (48,1%), p-cimeno (11,7%), 1,8-cineol (6,7%) e gama-terpineno (6,1%). Em 2022, Tardugno e colaboradores estudaram a composição de amostras de óleos essenciais de *T. vulgaris* cultivados em uma região da Itália, obtendo mais de 95% dos componentes de cada amostra, sendo os principais o timol (35,8-41,1%), p-cimeno (17,5-21,7%) e gama-terpineno (15-18,4%). Dessa forma, observando os dados encontrados na literatura, e também os dados descritos pelo fornecedor, o óleo essencial de *T. vulgaris* utilizado nesse estudo encontra-se dentro dos parâmetros.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.2.1 Disco-difusão

Para avaliação inicial da atividade antimicrobiana, como forma de triagem, foi realizada a técnica de disco-difusão. Como descrito na Tabela 3, o óleo de *T. vulgaris* apresentou halo de inibição contra todas as bactérias testadas.

Tabela 3 - Diâmetros dos halos de inibição do óleo essencial de *T.vulgaris* pelo método de disco-difusão frente microrganismos. (continua)

Microrganismo	Halo (mm)
<i>P.aeruginosa</i> (Pa01)	10 ± 0.7
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	22 ± 0.7
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	32 ± 0.7
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	43 ± 2.1

(conclusão)

<i>S. flexneri</i> (ATCC 12022323A)	25 ± 1.4
<i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)	25 ± 1.4
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	20 ± 0.7

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Rota e colaboradores (2008) encontraram resultados similares aos descritos nesse estudo, com halos de inibição para *E. coli* de 28 mm, para *S. flexneri* de 29 mm e para *S. aureus* de 45 mm. Kryvtsová e colaboradores (2019) também realizaram testes de disco-difusão com o óleo essencial de *T. vulgaris*, e encontraram resultados de 65 mm para *S. aureus*, 18 mm para *E. coli* e 30 mm para *E. faecalis*. Em 2021, Galovicová e colaboradores relataram terem encontrado zona de inibição de 10 mm para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*.

Boruga e colaboradores (2014) utilizaram diferentes volumes do óleo essencial de *T. vulgaris* para realizarem a comparação das zonas de inibição encontradas. Quando utilizaram 10µl do óleo, mesmo volume utilizado neste estudo, encontraram resultados semelhantes aos demonstrados na tabela 2; para *S. aureus*, o halo de inibição foi de 29 mm, para *P. aeruginosa* foi de 13 mm, para *E. coli* foi de 19 mm, para *K. pneumoniae* foi de 31 mm e para *E. faecalis* foi de 15 mm.

5.2.2 Concentração Inibitória e Bactericida Mínima

Diante dos resultados da disco-difusão, foram realizados os testes de microdiluição para determinar CIM e CBM referente aquelas bactérias que se mostraram “suscetíveis” ao óleo essencial de *T. vulgaris*. A CIM é considerada “padrão ouro” para determinar a suscetibilidade de microrganismos, e é definida como a concentração mais baixa que inibe o crescimento visível de um microrganismo. Já a CBM é definida como a concentração mais baixa que é capaz de matar o microrganismo (SOUZA, 2014). Os resultados de CIM E CBM estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Contração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo de *T. vulgaris* frente microrganismos.

Microrganismo	CIM	CBM
<i>P. aeruginosa</i> (Pa01)	5 mg/mL	5 mg/mL
Isolado Clínico 15	20 mg/mL	20 mg/mL
Isolado Clínico 20	20 mg/mL	20 mg/mL
Isolado Clínico 22	20 mg/mL	20 mg/mL
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)	5 mg/mL	5 mg/mL
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	5 mg/mL	5 mg/mL
<i>S. flexneri</i> (ATCC 12022323)	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL

É possível visualizar que o óleo essencial de *T. vulgaris* possui efeito antimicrobiano frente todas as bactérias testadas, sendo que as concentrações de CIM variaram de 0,125% a 2% do óleo, sendo a concentração mais alta atribuída aos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Além disso, o óleo apresenta atividade bactericida, visto que foi capaz de matar todos os microrganismos testados na mesma concentração em que inibiu o crescimento microbiano.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial já era esperada, visto que esse possui uma quantidade expressiva de timol, como descrito na caracterização que foi realizada, sendo esse componente o maior responsável pela atividade antimicrobiana do óleo. Alguns estudos comprovam que o timol é capaz de destruir a membrana bacteriana. Após a incorporação na membrana celular, o timol interage com suas proteínas por meio de vários mecanismos não específicos, que levam a alterações na conformação e atividade das proteínas internas e de membrana. Assim, a tensão e a desestabilização da membrana celular podem ser induzidas pela presença do timol (AKERMI et al., 2022; KOWALCZYK et al., 2020).

Na literatura, encontra-se uma variação nos resultados de CIM e CBM para o óleo de *T. vulgaris* frente os microrganismos testados, o que pode ser condicionado à variação no perfil químico desses óleos. Evidências relatam que vários compostos químicos têm atividade direta contra muitas espécies de bactérias, como terpenos e uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos (álcoois, aldeídos e cetonas) (KOWALCZYK et al., 2020).

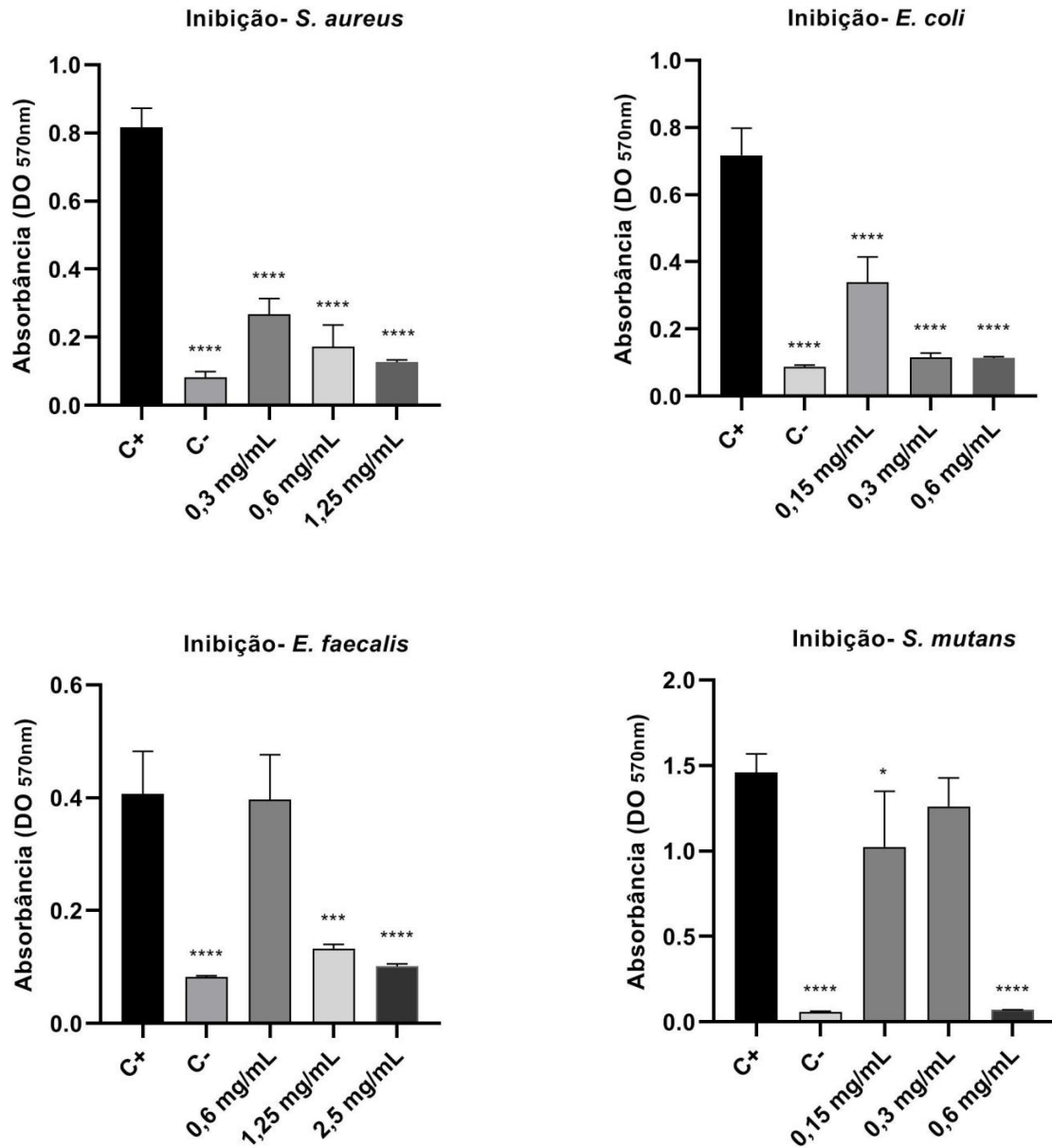
Alsakhawy e colaboradores (2022) encontraram uma CIM de 0,375 mg/mL para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo que o óleo essencial utilizado possuía uma concentração de timol de 32,9%. Galovicová e colaboradores (2021) encontraram CIM de 103,2 µg/mL para *P. aeruginosa*, CIM de 16,5 µg/mL para *S. aureus* e CIM de 13,8 µg/mL para *E. faecalis*, sendo o timol 48,8% do total da composição do óleo utilizado no estudo.

Nezhadali e colaboradores (2014) realizaram uma comparação química dos componentes do óleo essencial de *T. vulgaris* nos diferentes estágios de crescimento da planta, no Irã. Nesse estudo foi obtida uma CIM que variou de 50 a 5.000 µg/mL para *S. aureus*, de 5.000 µg/mL para *K. pneumoniae*, CIM que variou de 50 a 5.000 µg/mL para *E. faecalis* e CIM de 500-5000 µg/mL para *E. coli*. Para *P. aeruginosa*, a CIM chegou a variar de não ter atividade em alguns estágios da planta a 500 mg/mL. Esse estudo é um grande exemplo de que diversos fatores podem afetar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, visto que, somente por estar em diferentes estágios de crescimento da planta, a CIM encontrada variou de forma expressiva. Em 2014, Al-shuneigat e colaboradores encontraram resultados de CIM semelhantes aos encontrados nesse estudo. Para *E. coli*, a CIM encontrada foi de 0,06%; para *K. pneumoniae* a CIM foi de 0,125%, para *S. aureus* de 0,125% e para *P. aeruginosa* foi de 0,5%. É relevante comparar que a concentração de timol encontrada no óleo essencial utilizado também se assemelha com a encontrada nesse estudo, tendo sido de 37%.

5.3 ATIVIDADE ANTIBIOFILME (INIBIÇÃO E DESTRUIÇÃO)

Foram selecionadas duas bactérias Gram-negativas fortemente formadoras de biofilme (*P. aeruginosa* (Pa01 e isolados clínicos)) e *E. coli* (ATCC 25922)) e três bactérias Gram-positivas formadoras de biofilme (*S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 51299) e *S. mutans* (ATCC 25175)) para os testes de atividade antibiofilme do óleo essencial de *T. vulgaris*, levando em consideração os resultados de CIM e CBM obtidos como base para o tratamento que foi utilizado. A atividade de inibição do biofilme de *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans* por *T. vulgaris* está apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Inibição da formação do biofilme de *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans* por *T. vulgaris*.



Efeito de inibição do biofilme pelo óleo essencial de *T. vulgaris* frente *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Dunnet considerando estatisticamente significantes quando $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) em comparação ao controle positivo. C+: controle positivo. C-: controle negativo.

Como demonstrado na figura 6, o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento do biofilme frente todas as bactérias testadas, porém com maior ou

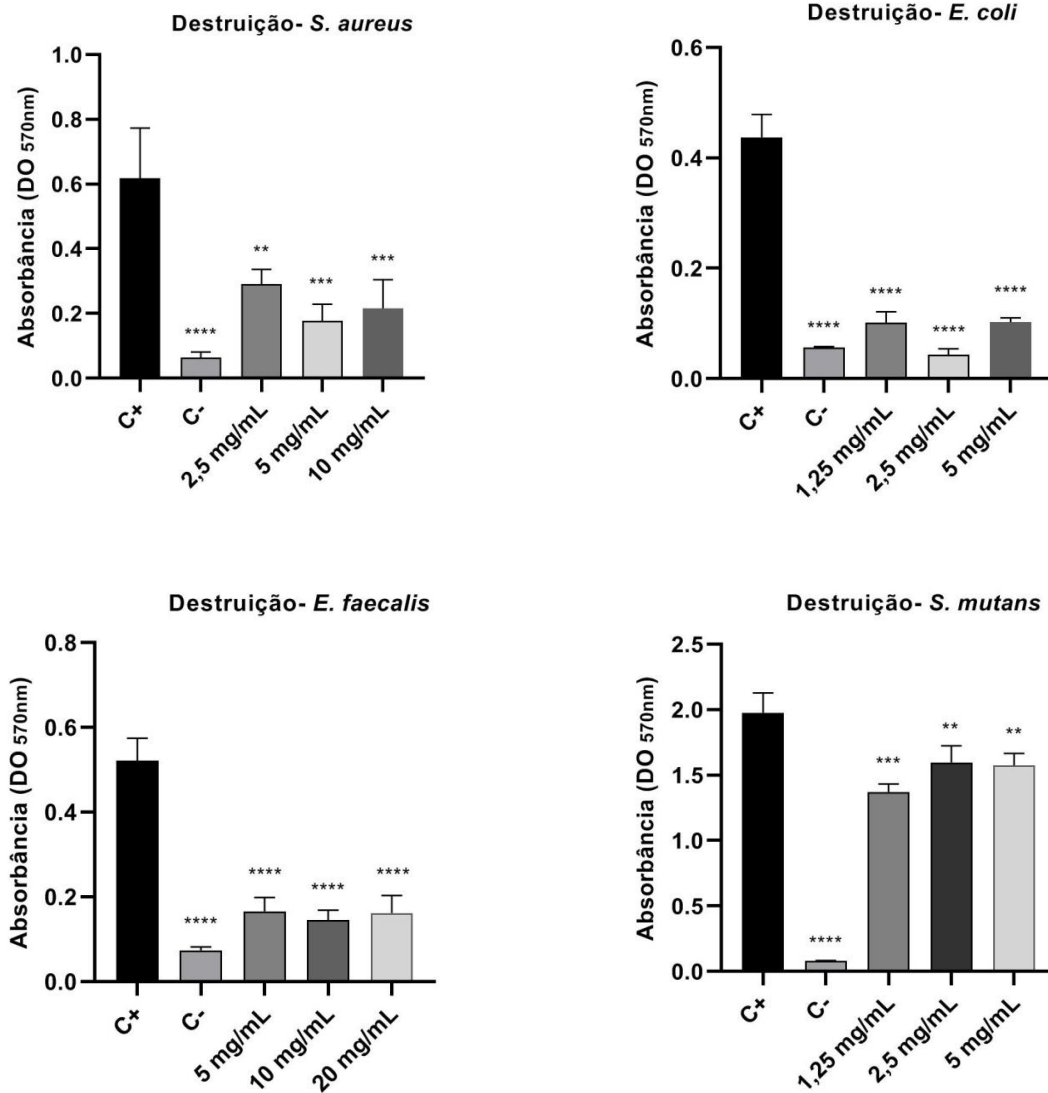
menor efetividade dependendo do microrganismo. Nos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* o óleo foi capaz de inibir o biofilme em até 84%; já para *E. faecalis*, a capacidade de inibição foi de até 75% e para *S. mutans*, o óleo mostrou atividade de inibição de 95%.

Oliveira e colaboradores (2021) obtiveram resultados que indicam o potencial antibiofilme do óleo essencial de *T. vulgaris* frente *S. mutans*. O óleo teve efeito inibitório sobre *S. mutans* através da redução da aderência bacteriana ao esmalte dentário. Em 2019, Kerekes e colaboradores realizaram um estudo do potencial de inibição de biofilmes e do mecanismo de *quorum-sensing* de três óleos essenciais e seus principais componentes, incluindo o óleo de *T. vulgaris* e o timol. Entre esses componentes, o timol mostrou a atividade mais potente contra biofilmes monomicrobianos de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida* e *S. aureus*. Em biofilmes polimicrobianos, o óleo essencial de *T. vulgaris* mostrou um forte efeito redutor de biofilme em *E. coli* e *L. monocytogenes* em uma concentração de 0,5–4 mg/mL. No biofilme formado por *L. monocytogenes* com *S. aureus*, o óleo de tomilho causou redução do crescimento em uma concentração de 0,2–1,5 mg/mL.

Zhongwei e colaboradores (2020) avaliaram o efeito do timol no biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) e a potencial sinergia do timol com a vancomicina. O timol demonstrou a capacidade de inibir a formação de biofilme e eliminar o biofilme maduro de MRSA, pela inibição da síntese das adesinas polissacarídicas intercelulares e do DNA extracelular, que são mecanismos importantes para a formação do biofilme de *S. aureus*. Além disso, o estudo sugere que o timol é eficaz em apoiar o efeito terapêutico da vancomicina em biofilmes de MRSA.

A ação de destruição dos biofilmes de *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans* pelo óleo de *T. vulgaris* estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Destruição do biofilme de *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans* pelo óleo de *T. vulgaris*.



Ação de destruição do biofilme pelo óleo essencial de *T. vulgaris* frente *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Dunnet considerando estatisticamente significantes $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) quando comparado ao controle positivo. C+: controle positivo. C-: controle negativo.

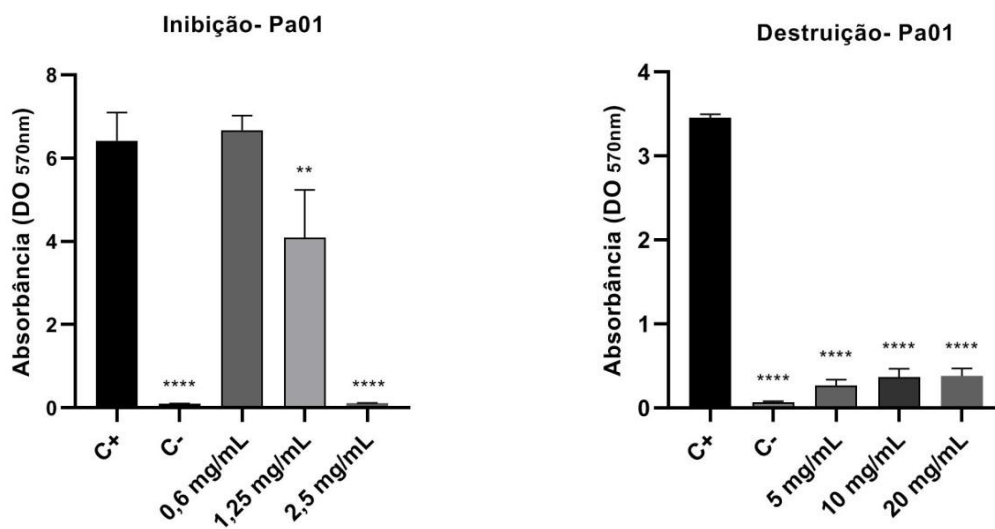
Assim como na inibição do biofilme, o óleo essencial teve atividade de destruição frente todas às bactérias testadas, também demonstrando maior ou menor efetividade dependendo do microrganismo. O óleo foi capaz de destruir o biofilme de *S. aureus* em até 71%. Para *E. coli*, o efeito de redução foi de até 90%. Para *E. faecalis*, a capacidade de destruição foi de até 72%; já para *S. mutans*, o óleo

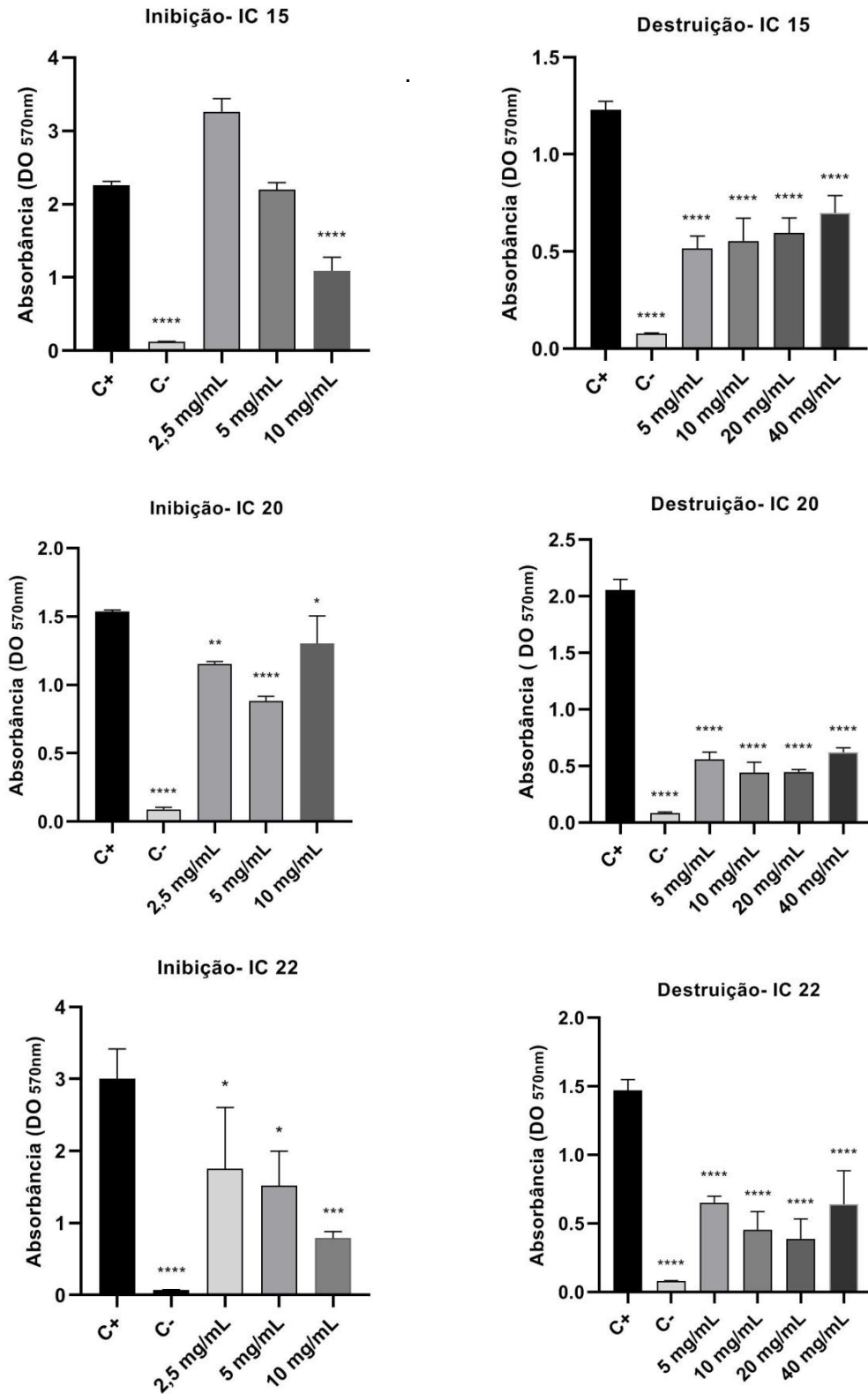
mostrou melhor atividade de inibição do que de destruição, visto que destruiu o biofilme em até 30%.

Em 2019, Kryvtsova e colaboradores estudaram a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de *T. vulgaris*, que demonstrou atividade antibiofilme, destruindo o biofilme de *S. aureus* em 53% na menor concentração exposta (0,01%), chegando a 81% na maior concentração exposta (0,1%). Em outros estudos, WANG et al. (2017) e LADE et al. (2022) observaram que o timol rompe a integridade da membrana de *S. aureus* para atingir a estrutura interna da célula bacteriana e as articulações ao sulco menor do DNA bacteriano, garantindo uma desestabilização da estrutura secundária do DNA. KAVANAUGH et al. (2012) demonstrou que o óleo essencial de *T. vulgaris* foi efetivo contra biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, demonstrando melhor efeito que a ampicilina.

Alibi e colaboradores (2020) obtiveram resultados da atividade antibiofilme do óleo essencial de *T. vulgaris* frente isolados clínicos multirresistentes. Esse foi capaz de erradicar o biofilme de três isolados clínicos de *P. aeruginosa* em 92%, 93% e 95%; para quatro cepas de *E. coli*, a redução do biofilme foi de 83% a 93% e para duas cepas de *S. aureus*, a erradicação foi de 90% e 96%. Os efeitos de inibição e destruição do óleo de *T. vulgaris* em biofilmes de *P. aeruginosa* (Pa01) e dos Isolados Clínicos 15, 20 e 22 encontram-se na Figura 8.

Figura 8 - Efeito de inibição e destruição do óleo essencial de *T. vulgaris* em biofilmes de *P. aeruginosa* (Pa01) e Isolados clínicos 15, 20 e 22.





Ação de inibição e destruição do biofilme de Pa01; inibição e destruição do Isolado Clínico 15; inibição e destruição do Isolado clínico 20 e inibição e destruição do Isolado Clínico 22 pelo óleo essencial de *T. vulgaris*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Dunnet considerando estatisticamente significantes $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) quando comparado ao controle positivo. C+: controle positivo. C-: controle negativo.

Como é possível visualizar na figura 8, o óleo foi capaz de destruir o biofilme de Pa01 em até 92% e inibir em até 98,2%; já para os isolados clínicos de *P. aeruginosa*, o efeito sobre os biofilmes parece ter uma tendência a ser um pouco menor, sendo que no isolado clínico 15 o óleo destruiu o biofilme em até 58% e inibiu o biofilme em 51%; para o isolado clínico 20, o efeito de destruição foi de até 78% e de inibição de até 42%; para o isolado clínico 22 a redução da biomassa do biofilme foi de até 73% e a inibição também foi de 73%.

Alguns estudos demonstram que bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos óleos essenciais que as Gram-negativas, pois a existência dos lipopolissacarídeos da membrana celular realiza um papel de barreira hidrofóbica (BENAMEUR et al., 2019; AKERMI et al., 2022; ALAMOTI et al., 2022). Porém, nesse estudo, as bactérias Gram-negativas mostraram grande suscetibilidade ao óleo, como é possível verificar nos resultados da atividade antimicrobiana e antibiofilme das bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Iseppi e colaboradores (2020) estudaram a atividade antibacteriana e antibiofilme de quatro óleos essenciais, incluindo o óleo de *T. vulgaris*, frente cepas de *P. aeruginosa* produtoras metalo-beta-lactamase e *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido. Os óleos de *Melaleuca alternifolia* e *T. vulgaris* mostraram a melhor atividade antibacteriana contra todas as cepas testadas, e uma capacidade antibiofilme significativa também foi demonstrada.

Uma pesquisa conduzida por Qaralleh e colaboradores (2019) mostrou grande potencial antibiofilme do óleo essencial de *Thymbra capitata* L., planta pertencente à mesma família (Lamiaceae) de *T. vulgaris*, frente *P. aeruginosa*, o que provavelmente pode ser associado à presença de timol como um componente principal do óleo. A redução do biofilme chegou a 98,4%, dependendo da cepa de *P. aeruginosa* utilizada e da concentração do óleo. Um estudo de Silva e colaboradores (2013) relatou que o óleo essencial de tomilho mostrou a atividade inibitória mais promissora, mesmo em baixas concentrações, contra *P. aeruginosa* entre os óleos essenciais de tomilho, orégano, alecrim, verbena, manjeriço, hortelã-pimenta, poejo e hortelã.

Al-Shuneigat e colaboradores (2014) investigaram os efeitos do óleo essencial de *T. vulgaris* em isolados clínicos formadores de biofilme. Os resultados

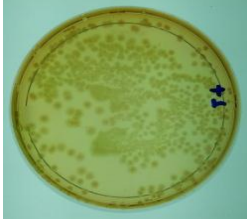
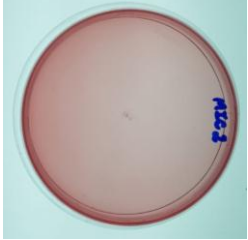
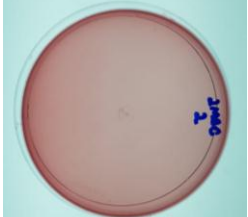
mostraram que o óleo foi capaz de inibir a formação de biofilme de todas as cepas testadas, com variação na concentração do óleo que foi capaz de inibir o biofilme de 0,25% a 2%. *P. aeruginosa* foi a cepa que apresentou maior resistência, tanto na forma planctônica quanto no biofilme, enquanto *E. coli* foi a mais sensível. Também foi investigado o efeito do óleo na inibição da aderência bacteriana inicial em concentrações sub-inibitórias para *P. aeruginosa*, que apresentou redução significativa no número de células individuais aderindo à superfície de poliestireno após 30 minutos de incubação.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NO BIOFILME

Como forma de aprofundar os estudos da atividade antibiofilme do óleo essencial de *T. vulgaris* frente *P. aeruginosa* (Pa01), foi realizada a contagem de colônias viáveis no biofilme após o tratamento com o óleo (Tabela 5).

Tabela 5 - Contagem de colônias viáveis no biofilme após tratamento com o óleo de *T. vulgaris*.

(continua)

Tratamento	Número de UFC*	Imagem da placa de incubação
Controle positivo	7040	
Óleo 5 mg/mL	0	
Óleo 10 mg/mL	0	

Óleo 20 mg/mL

0



*UFC: unidades formadoras de colônias.

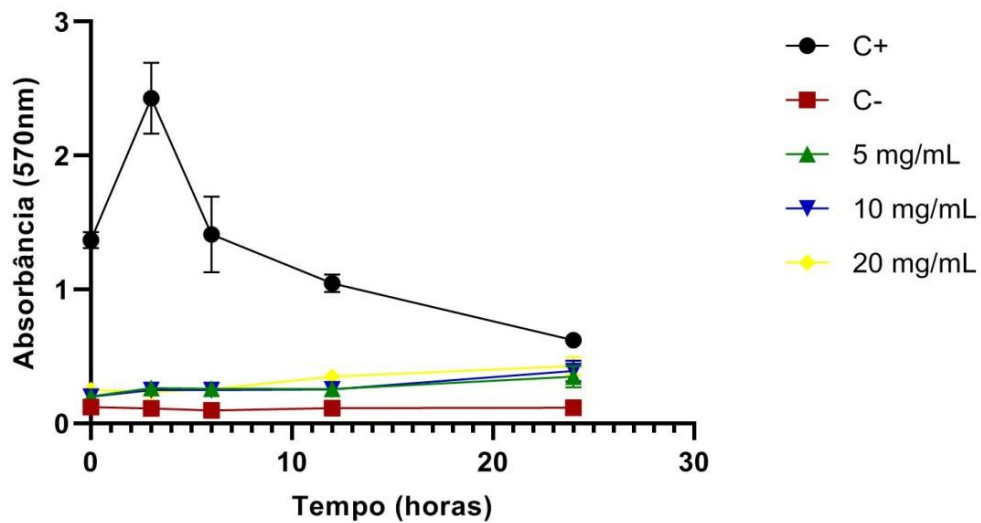
Todos os experimentos de contagem de colônias realizados mostraram que, mesmo em concentração sub-inibitória, o óleo tem grande efeito antibiofilme frente à cepa Pa01, visto que não houve crescimento de colônias visíveis na placa de incubação após o tratamento, enquanto o controle positivo mostrou crescimento significativo. Esse resultado corrobora com os resultados de destruição do biofilme de Pa01, visto que o óleo foi capaz de destruir o biofilme em até 92%.

Liu e colaboradores (2021) evidenciaram que o óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol combatem poderosamente *P. aeruginosa*, alterando diretamente a estrutura celular. Foi evidenciado um aumento na permeabilidade das membranas internas e externas e o vazamento de macromoléculas biológicas intracelulares (DNA), o que indica que a integridade da membrana celular da *P. aeruginosa* é destruída. O estudo também confirmou que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio intracelular causado pelo óleo essencial e pelo timol pode resultar em dano ao DNA mediado por estresse oxidativo.

5.5 CINÉTICA DE ATIVIDADE EM BIOFILME FORMADO

Para a melhor compreensão do funcionamento e da atividade do óleo essencial em biofilmes de *P. aeruginosa* (Pa01) em relação ao tempo, foi realizado o estudo da cinética de atividade do biofilme, apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Cinética de atividade do biofilme de Pa01, tratado com o óleo essencial de *T. vulgaris*, em relação ao tempo.



Cinética de atividade em biofilme formado. Dados expressos em média \pm desvio padrão. C+: controle positivo. C-: controle negativo.

Percebe-se que, apenas tendo contato com o óleo essencial, no tempo 0h, ocorre uma redução significativa da absorbância em todas as concentrações testadas, ficando muito próxima do controle negativo, indicando grande redução na biomassa do biofilme. Quando comparada ao controle positivo, percentualmente, essa redução atinge o seu pico em 3 horas após a exposição ao tratamento, e vai reduzindo conforme o tempo passa, até chegar à menor redução percentual, em 24 horas. Através desses dados, supõe-se que, se for utilizado como um possível tratamento, o óleo seria efetivo frente biofilmes de *P. aeruginosa* mesmo com pouco tempo de exposição ao biofilme.

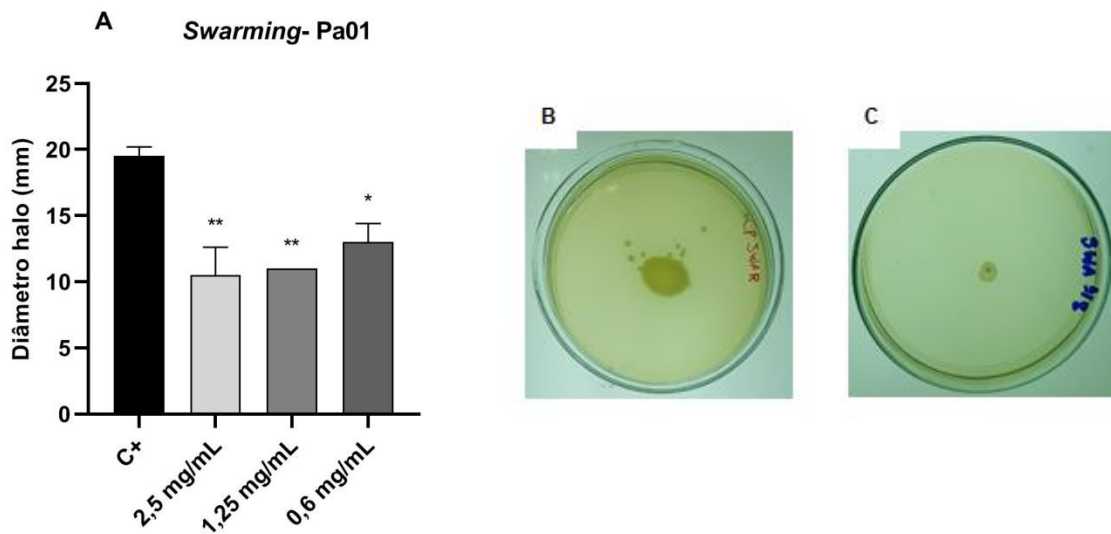
Oliveira e colaboradores (2017) realizaram um estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato de *T. vulgaris*. Os biofilmes monomicrobianos foram formados pelos microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *P. aeruginosa* e biofilmes polimicrobianos também foram formados, compostos por cada bactéria mais *C. albicans* e expostos por 5 min ao extrato da planta. Os resultados obtidos mostraram que todos os biofilmes formados tiveram redução significativa em UFC/mL, inclusive *P. aeruginosa*, que mostrou redução de quase 100% do biofilme após o tratamento. Percebe-se que, mesmo

com pouco tempo de exposição ao extrato, ocorre grande atividade antibiofilme, assim como demonstrado nesse estudo com o óleo essencial.

5.6 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE BACTERIANA

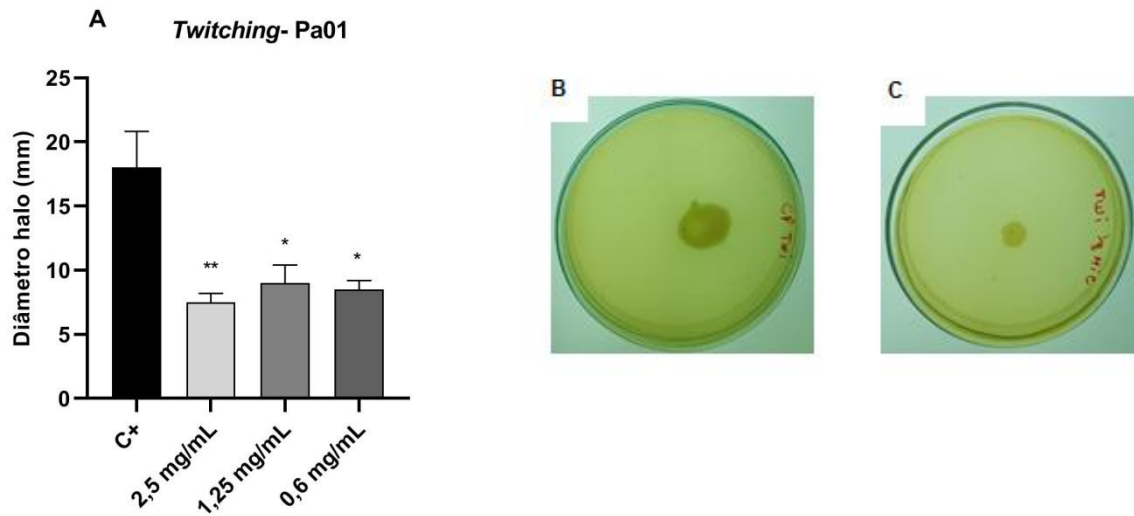
Para a melhor compreensão do mecanismo de ação do óleo essencial sobre a motilidade de *P. aeruginosa* (Pa01), foram realizados os testes de motilidade *swarming* (Figura 10), *twitching* (Figura 11) e *swimming* (Figura 12), com concentrações sub-inibitórias do óleo ($\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC e $\frac{1}{8}$ MIC).

Figura 10- Atividade do óleo essencial de *T. vulgaris* na motilidade *swarming* de Pa01.



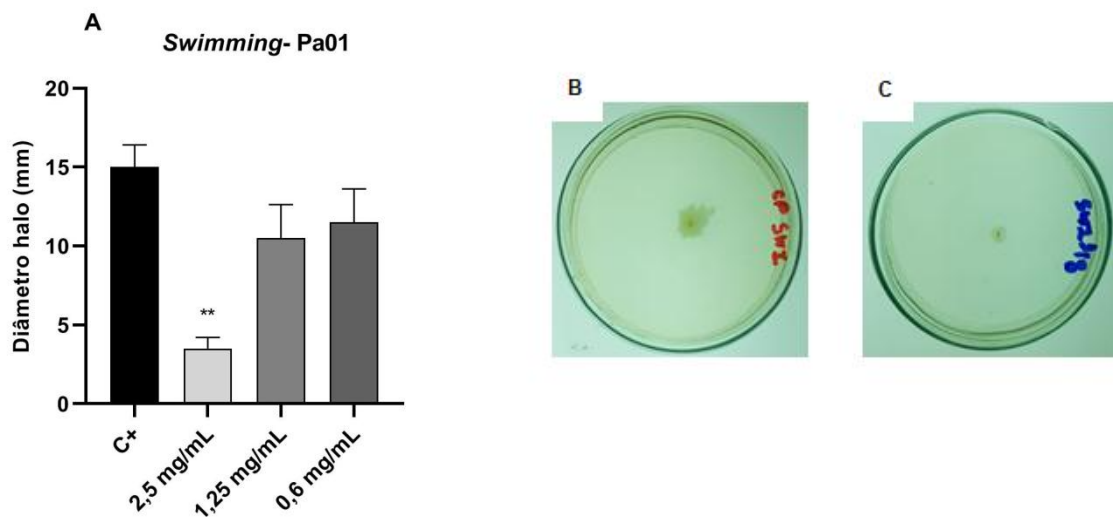
A: Diâmetro do halo em mm, considerando estatisticamente significantes $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**) quando comparado ao controle positivo. B: placa controle. C: placa tratamento. Fonte: próprio autor.

Figura 11- Atividade do óleo essencial de *T. vulgaris* na motilidade *twitching* de Pa01.



A: Diâmetro da colônia em mm, considerando estatisticamente significantes $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**) quando comparados ao controle positivo. B: placa controle. C: placa tratamento. Fonte: próprio autor.

Figura 12- Atividade do óleo essencial de *T. vulgaris* na motilidade *swimming* de Pa01.



A: Diâmetro da colônia em mm, considerando estatisticamente significantes $p < 0,01$ (**) quando comparados ao controle positivo. B: placa controle. C: placa tratamento. Fonte: próprio autor.

Os resultados obtidos demonstram que o óleo essencial de *T. vulgaris* possui atividade inibitória nas motilidades de *swarming*, *swimming* e *twitching* de *P. aeruginosa*. Na motilidade *swarming*, as três concentrações utilizadas apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo; o mesmo ocorreu para

twitching. Para *swimming*, apenas a maior concentração utilizada foi capaz interferir na motilidade bacteriana.

A motilidade bacteriana desempenha um papel importante na colonização bacteriana e na formação do biofilme. Um estudo demonstrou que o timol e o óleo de *T. vulgaris* foram capazes de limitar a atividade de *swimming* e *swarming* de *P. aeruginosa*, impedindo a formação de biofilme (LIU et al., 2021).

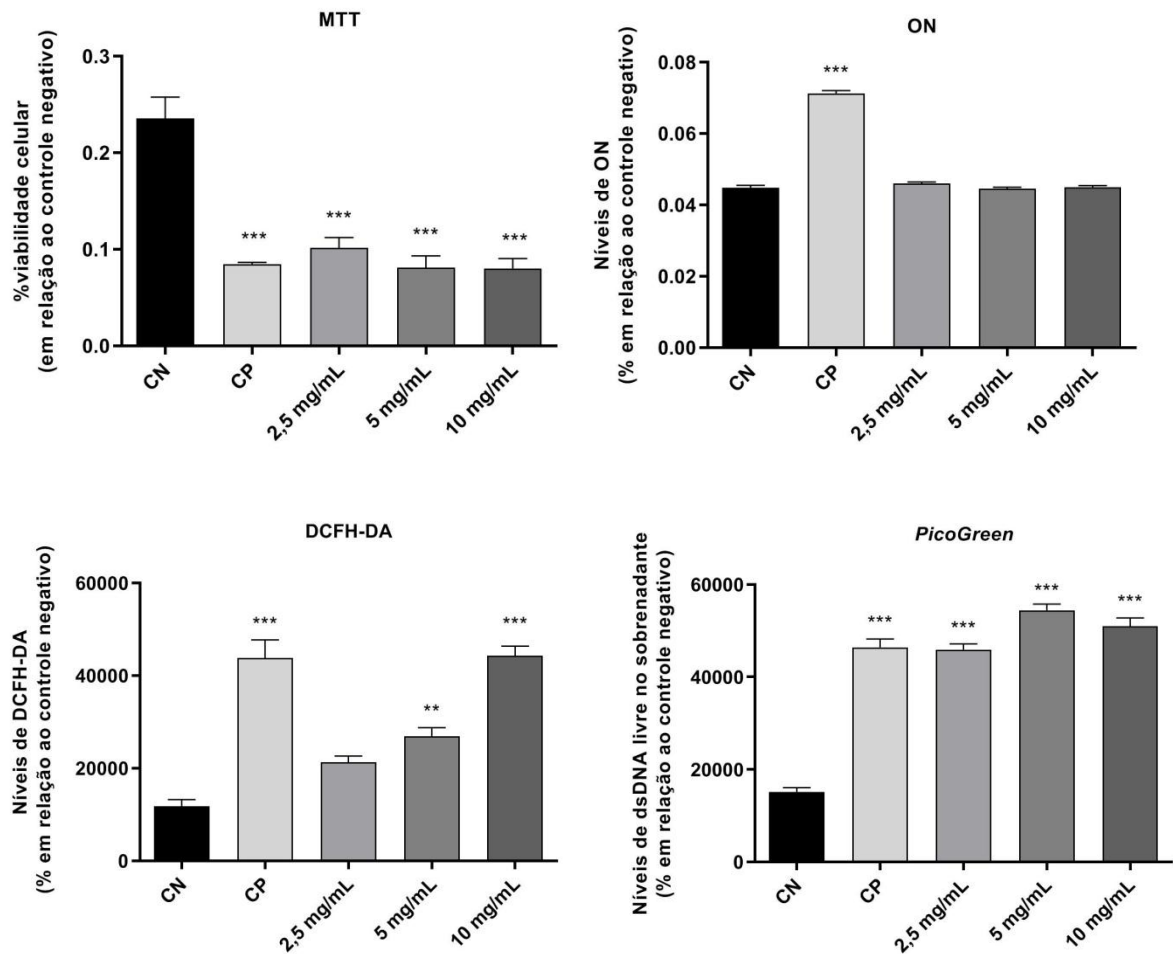
É provável que o óleo utilizado nesse estudo possua ação na síntese ou montagem do flagelo bacteriano, visto que inibiu *swarming* e *swimming*. A inibição de *twitching* pode indicar uma ação do óleo em relação à síntese de pili tipo IV, que inibe a adesão bacteriana e também a formação de biofilme, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo (CHIANG; BURROWS, 2003).

Evidências mostram que o mecanismo da atividade antibacteriana do timol está associado a sua capacidade de se integrar à camada lipídica da membrana celular, aumentando a curvatura da superfície. A parte hidrofílica da molécula interage com a parte polar da membrana, enquanto o anel benzênico hidrofóbico e as cadeias laterais alifáticas afundam na parte interna da membrana biológica, causando grandes mudanças na estrutura da membrana celular (KOWALCZYK et al., 2020). Dessa forma, é possível que os componentes como flagelo e fímbrias sejam desestabilizados ou desintegrados, influenciando na motilidade bacteriana.

5.7 AVALIAÇÕES DA CITO-GENOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *T. vulgaris*.

A avaliação da cito-genotoxicidade do óleo essencial foi realizada em células mononucleares do sangue periférico (Figura 13), e também em linhagem celular de fibroblastos murinos e queratinócitos humanos (Figura 14). Todos os testes foram realizados com as concentrações de $\frac{1}{2}$ CIM, CIM e 2x CIM encontradas para a cepa Pa01.

Figura 13- Cito-genotoxicidade do óleo essencial de *T. vulgaris* em linhagem de células mononucleares do sangue periférico.



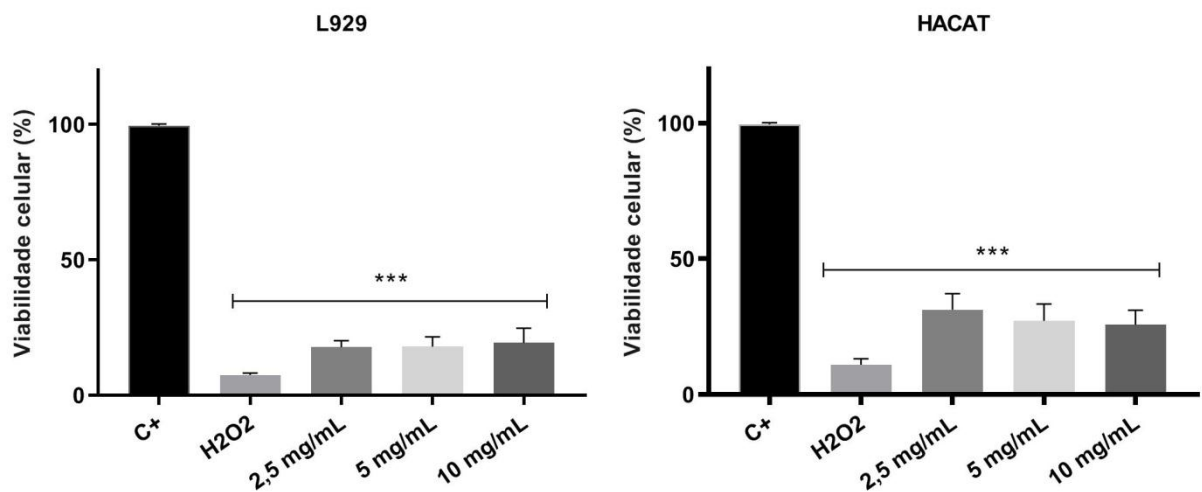
Resultados expressos em média \pm desvio padrão, considerando estatisticamente significantes $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) quando comparados ao controle negativo.

Os resultados do teste de MTT mostraram citotoxicidade na linhagem celular testada e também nas três concentrações testadas, reduzindo a viabilidade celular significativamente, chegando muito próximo aos resultados do controle positivo de morte celular. Em relação ao ensaio de *Picogreen*, foi observado dano no ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla das células, mostrando alta concentração de DNA livre no sobrenadante em todas as concentrações testadas quando comparado ao controle positivo.

Os dados obtidos no teste de diclorofluoresceína (DCFH-DA) mostraram que o óleo essencial de *T. vulgaris* não foi capaz de aumentar as espécies reativas de

oxigênio na faixa de concentração de $\frac{1}{2}$ CIM e CIM, mantendo a viabilidade celular em comparação com o controle positivo, porém na concentração $2\times$ CIM ocorreu redução da viabilidade celular. No ensaio de óxido nítrico (ON), foi possível observar que nenhuma das concentrações testadas do óleo essencial aumentou os níveis de ON em comparação com o controle negativo.

Figura 14 - Citotoxicidade do óleo essencial de Tomilho em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HACAT).



Resultados expressos em média \pm desvio padrão, considerando estatisticamente significantes $p < 0,001$ (***) quando comparado ao controle positivo.

Para as linhagens celulares de fibroblastos murinos e queratinócitos humanos os resultados de viabilidade celular foram semelhantes aos encontrados para as células mononucleares do sangue periférico. As duas linhagens apresentaram citotoxicidade, também apresentando viabilidade celular próxima a do controle positivo de morte celular após tratamento com o óleo.

Na literatura, os resultados referentes à citotoxicidade do óleo essencial de *T. vulgaris* diferem de forma expressiva. As pesquisas relacionadas a perfis toxicológicos dos óleos essenciais são pouco estudadas devido à complexidade dos experimentos e a variabilidade dos compostos presentes nos óleos. Em relação aos estudos, esses indicaram que a toxicidade é dose/concentração dependente (MEMAR et al., 2017; AKERMI et al., 2022).

Uma pesquisa relatou que, por meio de uma abordagem computacional, entre vinte e seis compostos encontrados no óleo essencial de *T. vulgaris* utilizado, dezesseis não tiveram efeitos tóxicos e poderiam ser seguros para consumo humano em comparação com os medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (ciprofloxacina e rifamicina SV) (AKERMI et al., 2021).

KOWALCZYC et al. (2020) relata que o embora o óleo de tomilho tenha propriedades citotóxicas em altas concentrações e possa causar danos às células intestinais quando administrado por via oral, nenhuma toxicidade foi relatada em doses comumente usadas e pode ser considerado um medicamento seguro. Oliveira e colaboradores (2017) realizaram ensaios de cito-genotoxicidade do extrato de *T. vulgaris* em fibroblastos humanos e macrófagos murinos após 5 minutos de exposição aos tratamentos, visto que esse também foi o tempo utilizado nos experimentos antibiofilme, que tiveram resultados satisfatórios. Nas doses utilizadas, o extrato não apresentou genotoxicidade através do ensaio de micronúcleo, e no ensaio de MTT, as células apresentaram viabilidade celular acima de 50% nas concentrações utilizadas.

PEREZ et al. (2019) relatou citotoxicidade pronunciada da emulsão do óleo essencial e também das nanovesículas carregadas com o óleo em linhagem celular de macrófagos J774A. Da mesma forma, em outro estudo, Perez e colaboradores (2022) encontraram que a emulsão do óleo essencial e as nanopartículas carregadas com o óleo diminuíram drasticamente a viabilidade das células humanas. No entanto, o estudo demonstrou que a co-entrega do óleo essencial de *T. vulgaris* juntamente com o antibiótico tobramicina por transportadores arqueolipídicos nanoestruturados, em concentração 4 vezes menor que a citotóxica, exibiu atividade antibiofilme frente *P. aeruginosa*, além de diminuir a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e ter atividade anti-inflamatória.

Dessa forma, uma alternativa para redução da citotoxicidade dos óleos essenciais é a incorporação em sistemas nanoestruturados. Essa estratégia visa proteger a estrutura dos compostos transportados contra ataques físico-químicos e enzimáticos, além de aumentar sua vida útil, modificar sua farmacocinética, biodistribuição e perfil toxicológico (RAI et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

- Através da caracterização do óleo essencial de *T. vulgaris*, por cromatografia gasosa, foi possível obter 99,6% dos componentes presentes, sendo os componentes majoritários o timol e o para-cimeno.
- O óleo apresentou atividade antimicrobiana frente todas as cepas testadas, o que foi demonstrado pelos ensaios de disco-difusão e concentração inibitória e bactericida mínima. Os resultados de CIM e CBM variaram de 1,25 mg/mL a 20 mg/mL do óleo, sendo as maiores concentrações atribuídas aos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Pa01).
- Em relação à atividade antibiofilme, esse apresentou efeito considerável frente todos os microrganismos testados, tanto para atividade de inibição quanto de destruição, porém tendo maior ou menor efetividade dependendo do microrganismo. Para a cepa Pa01, o óleo foi capaz de inibir o biofilme em até 98% e destruir em até 92%.
- A cinética do biofilme formado em relação ao tempo demonstrou que o óleo possui ação rápida e eficiente frente biofilmes de Pa01, pois mesmo no tempo 0h o óleo foi capaz de reduzir o biofilme consideravelmente.
- O ensaio de contagem de colônias viáveis do biofilme de Pa01 apresentou crescimento de colônias somente no controle positivo, em todas as concentrações testadas.
- Em relação às motilidades *swarming*, *swimming* e *twitching* de Pa01, o óleo mostrou influência nas três motilidades testadas, indicando que esse efeito poderia dificultar a formação de biofilmes por essa bactéria.
- O óleo apresentou cito-genotoxicidade nas três linhagens celulares e nas três concentrações testadas. Dessa forma, são necessários mais estudos para buscar alternativas que reduzam a citotoxicidade do óleo essencial de *T. vulgaris* para que esse possa ser utilizado como opção farmacológica, visto que, como demonstrado nesse estudo, o óleo possui grande potencial antimicrobiano e antibiofilme.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M; SAEED, F; ANJUM, F. M; AFZAAL, M; TUFAIL, T; BASHIR, M. S. Natural polyphenols: an overview. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 1689 – 1699, 2017.
- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, **Allured Publ. Corp.** Carol Stream IL, 1995.
- AHMAD, A.; VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils- the case of *thymus vulgaris* (thyme). **Molecules**, v. 19, p. 2896-2910, 2014.
- ALAMOTI M. P. et al. Essential oils from indigenous Iranian plants: a natural weapon vs. multidrug-resistant *Escherichia coli*. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 109, 2022.
- ALIBI, S. et al. Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. **Current Research in Translational Medicine**, v. 68, p. 59-66, 2020.
- ALMEIDA, M. P.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E.R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2015.
- ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 26 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)- Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG, 2015.
- ALSAKHAWY, S.A. et al. Encapsulation of *thymus vulgaris* essential oil in caseinate/gelatin nanocomposite hydrogel: *In vitro* antibacterial activity and *in vivo* wound healing potential. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 628, 2022.
- AL-SHUNEIGAT, J. et al. Effects of wild *Thymus vulgaris* essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria. **Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 13, n. 9, p. 62-66, 2014.
- ATHAYDES, G. A. **Clonagem, caracterização e expressão de genes envolvidos na síntese de compostos isoprenóides em *Eucalyptus grandis***. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- AKERMI, S. et al. In-Depth Study of *Thymus vulgaris* Essential Oil: Towards Understanding the Antibacterial Target Mechanism and Toxicological and Pharmacological Aspects. **BioMed Research International**, v. 2022, 20p., 2022.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils- a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446- 75, 2008.

- BANAS, J. A. Virulence Properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.
- BARBOSA, P. M. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Camomila Romana (*Chamaemelum nobile*)**. 2019. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M.. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 493-496, 1 abr. 1966.
- BEHLAU, I.; GILMORE, M. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. **Archives Ophthalmology**, v.126, n.11, p.1572-1581, 2008.
- BENAMEUR, Q. et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla ESBL producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. **Natural Product Research**, v. 33, n. 18, p. 2647–2654, 2019.
- BHATTI, H. N. et al. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1597-1626, 2014.
- BHAWANA, R.K. et al. Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2056-2061, 2011.
- BITTENCOURT, P.F. **Estudo do papel de *Streptococcus mutans* em biofilmes de superfícies radiculares com o uso de técnicas Ômicas**. 2020. 121p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2020.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M.; REZENDE, C. M. Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas. **Química Nova**, v.32 n.3, p. 588-594, 2009.
- BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.112, p. 105-107, 2013.
- BONEZ, P.C. **Atividade da clorexidina sobre biofilmes microbianos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2014.
- BORUGA, O. et al. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 3, p. 56-60, 2014.
- BOTTON, G. et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontic Journal**. v.49, n.8, p. 737–745, 2015.

BOWDEN, G.H. et al. Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. **Oral Microbiol Immunol**, v. 5, n. 6, p. 346-351, 1990.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p-248, 254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Brasília, 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>>. Acesso em: 05 jan. 2023.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. Ed. 26. Porto Alegre: McGraw-Hill, 872p, 2014.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendência dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.50-62, 2006b.

CHIANG, P.; BURROWS, L. L. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2374-2378, 2003.

CHOI, W. S. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 2, p. 164–170, 2012.

CIOLFI, F. Potencial antimicrobiano de extratos e óleos essenciais de vegetais não tradicionais sobre patógenos de origem alimentar. 2010. 71 p. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

CLSI, **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, 2012.

COSSETIN, J. F. et al. Peanut leaf extract has antioxidant and anti-inflammatory activity but no acute toxic effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 107, 2019.

COSTA, K. A.; MOURA, R.; MILLEZI, A. F. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cymbopogon flexuosus* essential oil microemulsions. **Ceres**, v. 66, n. 5, p. 372-379, 2019.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p. 711-745, 2003.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Revista Diversitas**, Arapiraca, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

CUTILLAS, A.B. et al. Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC-MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 529-544, 2018.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **The Journal of Infection**, v. 71, p. 615-626, 2015.

DAMASCENO, F. C. **Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas**. 2007. 143 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **American Society for Microbiology**, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DELEO, F.R; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. **Infectious Disease Clinical North America**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

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.

DÉZIEL, E.; COMEAU, Y.; VILLEMUR, R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in Swimming, Swarming, and Twitching motilities. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p.1195-1204, 2001.

DUBERN J.F.; DIGGLE S.P. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. **Molecular BioSystems**, v.4, n. 9, p.882-888, 2008.

DONG, S. J; LIN, X. H; LI, H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 68, p. 33 – 41, 2015.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p. 277-281, 2001.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–66, 2002.

FAHED, L. et al. Essential oils composition and antimicrobial activity of six conifers harvested in Lebanon. **Chemistry Biodiversity**, v. 14, n. 2, 2017.

- FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanóides de *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE)**. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2011.
- FOSTER T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews, Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-958, 2005.
- FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T.. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal Of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882-1891, 2010.
- GALOVICOVÁ, L. et al. *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. **Plants**, v. 10, n. 9, 2021.
- GLOWNIACK, I. K. et al. The *in vitro* activity of essential oils against *Helicobacter pylori* growth and urease activity. **Molecules**, v. 3, n. 25, p. 586, 2020.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- HANS, V. M. et al. Antimicrobial efficacy of various essential oils at varying concentrations against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 10, n. 9, p. ZC16, 2016.
- HOSSEINZADEH, S. et al. 2015. The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. **International Journal of Clinical Medicine**, v.9, n. 3, p. 260–266, 2015.
- HUANG, Z.X. et al. Cajaninstilbene acid analogues as novel quorum sensing and biofilm inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, v.148, 2020.
- HUSSEIN, N.H. et al. Effects of *Coriandrum sativum*, *Thymus vulgaris*, *Borago officinalis* and *Pimpinella anisum* on biofilm *Escherichia coli*. **J. Gen. Environ. Res. Conserv.** n. 2, p. 219-230, 2014.
- ISEPPI, R. et al. In Vitro Activity of Essential Oils Against Planktonic and Biofilm Cells of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)/Carbapenamase-Producing Gram-Negative Bacteria Involved in Human Nosocomial Infections. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 5, p. 272, 2020.
- ITEN, F. et al. Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*-Chemotype Carvacrol. **Planta Medica**, v. 75, n 11, p.1231-1236, 2009.
- JAKIEMIU, E. A. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

- JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Sociais e Humanas**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.
- JAKOBSEN, T. H. et al. Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. **Future Microbiology**, v. 8, p. 901-921, 2013.
- JAFRI, H; IQBAL, I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.30, n. 1, 2020.
- JARDIM BOTÂNICO DA UTAD. Fotografia 3 da Espécie *Thymus vulgaris* subesp. *vulgaris*. 2023. Disponível em:
<https://jb.utad.pt/especie/Thymus_vulgaris_subesp_vulgaris#imagem-7854>
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, 2005.
- KAPER, J.B. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews-Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- KAVANAUGH, N.; RIBBECK, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4057– 4061, 2012.
- KAZMIERCZAK, B. I.; SCHNIEDERBEREND, M.; JAIN, R. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. **Current opinion in microbiology**, v. 28, p. 78-82, 2015.
- KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.
- KEREKES, E.B. et al. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 933–942, 2013.
- KHAYAT, S; AL-ZAHRANI, S. H; BASUDAN, N; AL-ZAHRANI, N. H; SUBAHI, J. A. Chemical composition and in vitro antibacterial activities of traditional medicinal plant: *Olea sp.* **Biomedical Research**, v. 29, p. 1037 – 1047, 2018.
- KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 123–127, 2006.
- KON, K.; RAI, M. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. **Nusantara Biosci.**, v.4, p. 50-56, 2012.

- KONEMAN, E. W. et al. *Enterococcus*. In: KONEMAN, Elmer W. (Ed.). **Diagnóstico microbiológico**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 589–659, 2014.
- KOWALCZYK, A. et al. Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. **Molecules**, v. 25, n. 18, 2020.
- KRYVTSOVA, M.V. et al. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. **Biosystems Diversity**, v. 27, n.3, p. 270-275, 2019.
- KRZYSCIĄK, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 499-515, 2014.
- KULAC, M. et al. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 44, n. 1, p. 83 – 90, 2013.
- KYIMACI, M. E. et al. Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 190 – 197, 2018.
- LADE H. et al. Thymol reduces agr-mediated virulence factor phenol-soluble modulín production in *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.
- LA TOURETTE, P. B. et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p 1502-150, 2003.
- LEVIC, J. et al. In vitro antibacterial activity of essential oils from plant family Lamiaceae. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 2, p. 6034-6041, 2011.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J. C.; ANDRADE, M. A.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2010.
- LIU, T.; KANG, J.; LIU, L. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm. **Food Science and Technology**, v. 136, 2021.
- LOPES, L.Q. et al. Characterisation and anti-biofilm activity of glycerol monolaurate nanocapsules against *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 178-185, 2019.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 20, n. 8, p. 520-532, 1998.
- MCBRIDE, S. M. et al. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, 2007.

MEMAR, M.Y. et al. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28. n. 2, p. 63-68, 2017.

MOHSENIPOUR, Z; HASSANSHAHIAN, M. The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. **Avicenna J. Phytomed.**, v. 5, p. 309-318, 2015.

MONALISA, J.; SWATI, M.; SWETALINA, J.; SUDHANSHU, S.; Nanotechnology-future prospect in recent medicine: a review. **International Journal of Basic and Clinical Pharmacology**, v.2, n.4, p.353-359, 2013.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

MULLER, M. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1527-1533, 2002.

MURRAY, T.S; KAZMIERCZAK, B.I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2700-2708, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020.

NEZHADALI, A. et al. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, p. 87-92, 2014.

NICOLAEV, Y.A.; PLACUNOV, V.K.; Biofilm – “City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v.76, n.2, p. 149-163, 2007.

NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 106–112, 2015.

OLIVEIRA, E.S. **Emergência de *Enterococcus sp.* Resistentes à vancomicina na cidade de Natal-RN. 2019. 99p.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2019.

OLIVEIRA, J. R. et al. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. **Archives of Oral Biology**, v. 82, p. 271-279, 2017.

OLIVERIA, M. A. et al. Antibiofilm effects of *Thymus vulgaris* and *Hyptis spicigera* essential oils on cariogenic bacteria. **Future microbiology**, v. 16, p. 241-255, 2021.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. **HM Government and Wellcome Trust: UK**, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Resistência Antimicrobiana**. Brasil, 2023. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana> > Acesso em: 14 fev. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de vigilância de uso Antimicrobiano**. Brasil, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. A resistência aos antimicrobianos, acelerada pela pandemia de COVID-19. **Informe de Política**, 2021.

PACHA, P. A., et al. Molecular diversity of *Staphylococcus aureus* and the role of milking equipment adherences or biofilm as a source for bulk tank milk contamination. **Journal of Dairy Science**. v. 104, n. 3, p. 3522-31, 2021.

PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n.10, p. 4064-4076, 2017.

PANDEY, A. K. et al. Essential oils from the genus *Thymus* as antimicrobial food preservatives: progress in their use as nanoemulsions-a new paradigm. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 426–441, 2021.

PANIKAR, S. et al. Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (M^{pro}) with pharmacokinetics and toxicological properties. **Journal of infection and public health**, v.14, n. 5, p. 601-610, 2021.

PARTE, A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D613–D616, 2014.

PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. 2011. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PEREZ, A. P. et al. The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicles. **Phytomedicine**, v. 57, p. 339-351, 2019.

PEREZ, N. et al. *Thymus vulgaris* essential oil + tobramycin within nanostructured archaeolipid carriers: A new approach against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Phytomedicine**, v. 102, 2022.

PHILLIPS, M. A.; LEÓN, P.; BORONAT, A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 619-23, 2008.

PINTO, C. A. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p.45-61, 2002.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 19, p. 3-9, 2012.

PUBCHEM. U.S. **National Library of Medicine**. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442428>.

QARALLEH, H. Thymol Rich *Thymbra capitata* Essential Oil Inhibits Quorum Sensing, Virulence and Biofilm Formation of Beta Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Natural Product Science**, v. 25, 172–180, 2019.

RADI, F. et al. Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant properties of *Thymus zygis* L. and *Thymus willdenowii* Boiss. essential oils. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 15, 2021.

RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, p. 67-78, 2017.

RASIGADE, J. P., VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. **Infect Genet Evol.** V. 21, p. 510-514, 2014.

RAUT, K. S; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 1, p 250-264, 2014.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2001.

REDDY, P. et al. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, p. 164-167, 2014.

REISNER, A. et al. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, n. 196, p. 931-939, 2014.

REYES-JURADO, F.; CERVANTES-RINCÓN, T.; BACH, H.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops & Products**, San Andrés Cholula, v. 131, p. 90-95, 2019.

RICHARDS, J. J.; REED, C. S.; MELANDER, C. Effects of N-pyrrole substitution on the anti-biofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 15, p. 4325–4327, 2008.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, p. 380–390, 2014.

ROCHA, B. C. A. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2013. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

ROCHA, R. P.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C.; CORBÍN, J. B.; BERBET, P. A. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p. 731–737, 2012.

ROMERO, A. L. et al. Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* sobre Fungos Fitopatogênicos. **UNOPAR Científica- Ciências Biológicas e da Saúde**, Maringá, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012.

ROMO, A. L.; QUIRÓS, R. Appropriate use of antibiotics: an unmet need. **Therapeutic advances in urology: SAGE Journals**, v. 11, p. 9 – 17, 2019.

ROSSO, R.S. **Otimização de Nanoemulsões Contendo Óleo Essencial de Tomilho: Estabilidade, Atividade Antifúngica e Liberação *in vitro***. 2019. 133 p. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

ROTA, M.C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, p. 681-687, 2008.

SADERI, H. et al. Antimicrobial effects of chamomile extract and essential oil on clinically isolated *Porphyromonas gingivalis* from periodontitis. In: **III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 6: Traditional Medicine and Nutraceuticals 680**, p.145-146, 2003.

SAKURAI, F. N. et al. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.

SANDBERG, M. E.; SCHELLMANN, D.; BRUNHOFER, G.; ERKER, T.; BUSYGIN, I.; LEINO, R.; VUORELA, P. M.; FALLARERO, A. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 1, p. 104–106, 2009.

SELEZSKA, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: Impact of water quality and phage pressure. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1952-1967, 2012.

SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309-3019, 2016.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. 112 p.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, p. 503–510, 2013.

SINGH, J. et al. Bovine serum albumin bioconjugated gold nanoparticles: synthesis, hemolysis, and cytotoxicity toward cancer cell lines. **Journal of Physycal Chemical**, v. 116, p. 8834 – 8843, 2012.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v.11, p. 53-62, 2017.

SOUZA, C. O. et. al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

SOUZA, M. E. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de *Melaleuca alternifolia***. 2014. 76p. Dissertação (Mestrado Nanociências)-Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, 2014.

STAHL-BISKUP, Elisabeth; SAEZ, Francisco. The Genus *Tymus*. In: SAEZ, Francisco. **Taylor & Francis Group**. 1. ed. Londres: CRC Press, 2002. p. 346.

STRATEVA, T; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 717-732, 2011.

SULISTYANI, H. et al. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 119-124, 2016.

SURECH, M.K. et al. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, p. 1-12, 2019.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ªEd. Artmed, Porto Alegre, 2009.

TALBOT, J.; BRADLEY, J.E.; EDWARDS, J.; GILBERT, D.; SCHELD, M.; BARTLETT J.G. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America Clinical. **Infectious Diseases**. v.42, p. 657–668, 2006.

TARDUGNO, R. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oils from Emilia Romagna Apennines (Italy): phytochemical composition and antimicrobial activity on food-borne pathogens. **Natural Product Research**, v. 36, n. 3, p. 837-842, 2022.

TENDOLKAR, P. M. et al. Enterococcal Surface Protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 10, 2004.

- TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. Theae. **Journal of General Plant Pathology**, v.73, n.3, p.193-196, 2007.
- TONG S.Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.
- TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7-12, 2016.
- UPADHYAYA, G. et al. Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 301-305, 2009.
- VIDANÁ, D. I., et al. Lavender essential oil ameliorates depression-like behavior and increases neurogenesis and dendritic complexity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 701, n. 14, p. 180-192, 2019.
- WANG, L. H. et al. Combination of microbiological, spectroscopic and molecular docking techniques to study the antibacterial mechanism of thymol against *Staphylococcus aureus*: membrane damage and genomic DNA binding. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 6, p. 1615–1625, 2017.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, n. 10, p. 2675–2679, 2000
- WEISS, J. et al. Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. **Global Issues in Food Science and Technology**, p. 425–479, 2009.
- WOOLHOUSE, M; FARRAR, J. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**, v. 509, p. 555-557, 2014.
- WORTHINGTON, R.J., RICHARDS, J.J., MELANDER, C. Small molecule control of bacterial biofilms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 7457-7474, 2012.
- WU, D. et al. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 285-290, 2014.
- XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.
- YAWATA, Y.; NOMURA, N.; UCHIYAMA, H. Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5429-5435, 2008.

ZHONGWEI, Y. et al. Thymol Inhibits Biofilm Formation, Eliminates Pre-Existing Biofilms and Enhances Clearance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Peritoneal Implant Infection Model. **Microorganisms**, v. 8, p. 99, 2020.

ŽIEMYTÈ, M. et al. Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth dynamics and persister cells' eradication. **Emerging Microbes and Infections**, v. 10, n. 1, 2062-2075, 2021.