



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SARA SCANDORIEIRO

**COMBINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
BIOGÊNICAS E DERIVADOS DE *Origanum vulgare*  
(ORÉGANO) NO COMBATE A BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES E PRODUTORAS DE BIOFILME**

---

Londrina  
2020

SARA SCANDORIEIRO

**COMBINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
BIOGÊNICAS E DERIVADOS DE *Origanum vulgare*  
(ORÉGANO) NO COMBATE A BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES E PRODUTORAS DE BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S283c Scandorieiro, Sara.

Combinação de nanopartículas de prata biogênicas e derivados do *Origanum vulgare* (Orégano) no combate a bactérias multirresistentes e produtoras de biofilme / Sara Scandorieiro. - Londrina, 2020.  
309 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Óleo essencial de orégano - Tese. 2. Carvacrol - Tese. 3. Timol - Tese. 4. Patógenos ESKAPEE - Tese. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

SARA SCANDORIEIRO

**COMBINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
BIOGÊNICAS E DERIVADOS DE *Origanum vulgare*  
(ORÉGANO) NO COMBATE A BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES E PRODUTORAS DE BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata K. T. Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Idessania Nazareth da Costa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jane Martha Graton Mikcha  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 27 de agosto de 2020.

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Moacir Scandorieiro e Hermínia Scandorieiro, pelos exemplos de vida que me ensinaram a importância do amor, da dignidade e da perseverança. Ao Diego Cabreira, companheiro desta e tantas outras jornadas, pelo gigantesco apoio, incentivo, compreensão e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e suporte financeiro para realização deste presente estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela minha formação e capacitação para desenvolver pesquisa, produção intelectual, projeto de extensão e ministrar aulas na área de Microbiologia.

À Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi, minha querida orientadora, por ter me acolhido em sua equipe de pesquisa (Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada – NIP 3, Departamento de Microbiologia, UEL). Agradeço pelos ensinamentos que colaboraram com minha formação acadêmica (Graduação, Mestrado e Doutorado) durante quase dez anos, pela confiança em mim depositada, pelas diversas oportunidades de crescimento e aprendizado que recebi, pela compreensão nos momentos necessários; e por ser exemplo de pesquisadora, educadora e ser humano. Expresso minha admiração e amizade.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela acolhida em seu grupo de pesquisa (NIP 3) com muita dedicação e estímulo, pela orientação voluntária, por toda confiança depositada em mim; e pelos ensinamentos e muitas oportunidades de crescimento que colaboram com minha formação acadêmica. Agradeço por fazer parte da banca desta tese. Obrigada pelo convívio e amizade.

Ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio, pela acolhida em seu laboratório (Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais – NIP 9, Departamento de Microbiologia, UEL). Por todos ensinamentos que tenho recebido deste a graduação em Ciências Biológicas, pelas valiosas sugestões durante o cultivo do fungo e biossíntese das nanopartículas de prata. Também agradeço por aceitar de imediato o convite para participar da banca desta tese.

À Profa. Dra. Idessania Nazareth da Costa, por prontamente aceitar fazer parte desta banca de doutorado, pelas sugestões, comentários e experiência compartilhada. Além disso, agradeço por fazer parte da minha formação como bióloga e pela oportunidade de trabalhar com seu grupo de pesquisa (Laboratório de Protozoologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, UEL) durante meu doutorado. Obrigada pelo carinho.

À Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha, por aceitar de maneira

despreendida participar da banca desta tese de doutorado. Obrigada pelas sugestões e por compartilhar sua experiência para melhorar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pelos ensinamentos e sugestões sobre nanotecnologia; e pelo auxílio com a caracterização das nanopartículas sintetizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, pelas valiosas sugestões durante os ensaios que envolveram microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão, da Universidade Estadual de Maringá, pelo auxílio técnico durante a obtenção de micrografias com microscópio eletrônico de transmissão.

À Profa. Dra. Ligia Carla Faccin Galhardi e sua equipe (Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, UEL), por toda prestatividade e auxílio com o preparo do meio de cultura DMEM.

Ao Prof. Dr. Leonardo Carmezini Marques, do Laboratório de Ciências Naturais e Saúde, do Instituto Federal do Paraná – campus Londrina, pela quantificação de Ag das amostras de nanopartículas utilizando fluorescência de raios X por energia dispersiva.

À Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira, e especialmente à doutoranda Franciele Maira Moreira Batista Tomaz, por fornecerem isolados de *Klebsiella pneumoniae* MDR e produtores de biofilme que foram utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. John William Bill Costerton (*in memoriam*), por sua dedicação ao estudo de biofilme microbiano, que, por meio de artigos publicados, palestras e entrevistas impactou positivamente meu interesse sobre o assunto.

À toda equipe do NIP 9, especialmente ao mestrando Guilherme Fonseca Reis e à doutoranda Patrícia Canteri de Souza, pela convivência, amizade e parceria científica.

Aos professores Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni e Dr. Eliandro Reis Tavares, e toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP 5, Departamento de Microbiologia, UEL), pelo apoio técnico e convivência; especialmente à doutoranda Renata Perugini Biasi Garbin, pelas sugestões nos ensaios de “biofilme”.

Pelo auxílio técnico e prestatividade, agradeço: ao Prof. Dr. Galdino

Andrade Filho e toda equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana (Departamento de Microbiologia, UEL), especialmente à colega de turma de doutorado, Ane Stéfano Simionato; à Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez e toda equipe do Laboratório de Ecofisiologia Animal (Departamento de Ciências Fisiológicas, UEL); aos professores e alunos do Laboratório de Patologia Molecular (Departamento de Ciências Patológicas, UEL); ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao funcionário Osvaldo Capelo e ao Thiago Fernandes; e à Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano e equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada (Departamento de Ciências Patológicas, UEL).

Aos professores das disciplinas por mim cursadas, durante a Pós-Graduação em Microbiologia, Prof. Dr. Carlos Mitihiko Nozawa, Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, Prof. Dr. Gerson Nakazato, Prof. Dr. Guilherme Biz, Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo, Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio, Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, Profa. Dra. Ligia Carla Faccin Galhardi, Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares e Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pelos ensinamentos.

Aos demais professores, alunos e funcionários, especialmente do Departamento de Microbiologia e Departamento de Ciências Patológicas, pelo auxílio prestado, convivência e coleguismo.

À graduanda Bianca Cerqueira Dias Rodrigues (NIP 3), pela dedicação e comprometimento com este estudo, pela colaboração nos experimentos, por toda competência e profissionalismo que foram muito importantes para o fechamento deste trabalho de doutorado. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com você, ótima convivência e sincera amizade.

Às doutorandas, parceiras de laboratório (NIP 3), Meiriele da Silva das Neves e Érica Pelegrin Figueiredo, pelo comprometimento com a síntese de nanopartículas de prata, discussões científicas, diversos trabalhos que juntas desenvolvemos, ótima convivência e amizade.

Ao amigo e doutorando Erick Kenji Nishio (NIP 3), pela década de convívio diário durante nossa formação acadêmica, pelas estimulantes discussões científicas e grande amizade.

Ao doutorando Leonardo Pinto Medeiros, companheiro de laboratório (NIP 3) e cursos de Mestrado e Doutorado, pelos anos de convívio, amizade e pelas

enriquecedoras discussões científicas.

À doutoranda Érika Kushikawa Saeki (NIP 3), pela competente parceria na pesquisa e amizade.

Aos demais colegas da turma de Doutorado em Microbiologia, pelo convívio e aprendizado; especialmente à doutoranda Patrícia Morais Lopes Pereira, pelo carinho e amizade.

A todos com quem tive oportunidade de realizar trabalhos a curto, médio ou longo prazo, especificamente na área de antimicrobianos, durante a vigência deste doutorado. Especialmente à Profa. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista e equipe. Aos parceiros de laboratório (NIP 3), doutorandos, mestrandos e graduandos (iniciação científica), Anna Carolina Leonelli Pires de Campos, Victor Hugo Clébis, Kawany Nobre Gomez Guarche, Larissa Ciappina de Camargo, Matheus Alves Pauletti, Giovana Carolina Bodnar, Thiago Hideo Endo e Mohammad Khaleel Jaber. Aos demais alunos de graduação e pós-graduação, de outros laboratórios parceiros, Caroline da Rocha Tonetti, Claudia Yuri Akagi, Gustavo Issamu Asai Saikawa, Raquel Arruda Sanfelice, Flavia Debiagi, Laís Fernanda Machado e Gabriela Fonseca Rocha Leonel Caetano.

À amiga e doutoranda Angela Hitomi Kimura, pelo auxílio com a defesa remota desta tese, pelos trabalhos de pesquisa e extensão que juntas desenvolvemos durante esses dez anos; por toda prestatividade, apoio, carinho e sincera amizade fortalecida durante tanto tempo de convívio.

Às amigas, que a Microbiologia me trouxe, doutorandas e parceiras de laboratório, Heloisa Moreira Martins e Vanessa Lumi Koga, pelo carinho, amizade sincera e todo incentivo nos momentos difíceis.

A todos membros do NIP 3, egressos e atuais, pela união de equipe, década de convivência diária e momentos memoráveis. Meu agradecimento aos colegas, entre eles, queridos amigos: Bruna Carolina Gonçalves, Carolina Galdino Gumiero Ribeiro, Giovana Nicolete Pereira, Isadora Gamero Rangel, Jhonatan Macedo Ribeiro, Juan Josue Puño Sarmiento, Laura Patricia Perez Abshana, Lucas Marcelino dos Santos, Luis Eduardo De Souza Gazal, Maísa Fabiana Menck Costa, Marcellly Chue Goncalves, Maysa Chueiri Miranda, Miriam Dibo, Natalia Belebecha Terezo, Nicole Schwantes-Cezario, Osvaldo Lopes dos Santos, Paula Signolfi Cyويا, Victor Dellevedove Cruz e Viviane Ferreira Cardozo.

À Jucélia Cabreira e ao Rogério Cabreira, pela confiança em mim

depositada, pelo incentivo, apesar da distância, e por todo carinho e amizade.

Aos meus irmãos, Tânia Mara Scandorieiro e Morvan Scandorieiro, pelo grande incentivo à educação, pela confiança em mim depositada, e apoio incondicional.

À Bruna Andressa Scandorieiro Jorge, minha querida sobrinha, pelo auxílio com o software Adobe Photoshop, pela amizade fraterna e companheirismo.

À Iara Scandorieiro Jorge, minha amada sobrinha, por deixar a vida mais leve e me fortalecer durante as dificuldades.

Ao Bruno Eduardo Scandorieiro Jorge, meu sobrinho, que sempre será importante na minha vida.

Ao Diego Cabreira (Gaúcho), pela grande contribuição para a execução deste trabalho, pela confiança em mim depositada, e por sempre me incentivar na caminhada, principalmente em momentos de dificuldade. Agradeço pela compreensão e inesgotável otimismo. Obrigada pelo companheirismo, imenso apoio, pelos conselhos, carinho e amizade de valor imensurável.

Um agradecimento especial aos meus queridos e amados pais, Moacir Scandorieiro e Hermínia Scandorieiro, por incentivar e apoiar meus objetivos, por não medirem esforços para investir em minha educação, pelos ensinamentos de vida, e pela compreensão durante os momentos que precisei me ausentar de casa para estudar e realizar pesquisa. Minha eterna gratidão e admiração!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho: **Muito obrigada!**

*“Somewhere, something incredible is waiting  
to be known.”*

Carl Sagan

SCANDORIEIRO, Sara. **Combinação de nanopartículas de prata biogênicas e derivados do *Origanum vulgare* (Orégano) no combate a bactérias multirresistentes e produtoras de biofilme.** 2020. 309 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

Bactérias multirresistentes são um problema de saúde pública de impacto global, uma vez que há pouca ou nenhuma opção de tratamento eficaz para muitas dessas doenças infecciosas. Portanto, o desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgentemente necessário. Nanopartículas de prata e derivados do *Origanum vulgare* (orégano) são potentes antimicrobianos, no entanto os primeiros apresentam características organolépticas marcantes e a emergência de resistência bacteriana à prata acontece rapidamente. Com objetivo de prevenir emergência de resistência, reduzir efeito organoléptico do orégano e desenvolver uma mistura de antimicrobianos com mecanismo de ação estratégico, este estudo avaliou o efeito de quatro associações contendo nanopartículas de prata biogênicas (bioAgNP, sintetizadas com *Fusarium oxysporum*) e derivados do orégano (óleo essencial de orégano – OEO, carvacrol – CAR ou timol – Thy) contra bactérias Gram-positivas e negativas. As seguintes combinações foram testadas: OEO/bioAgNP, CAR/bioAgNP, Thy/bioAgNP e CAR/Thy. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) médias contra bactérias planctônicas e sésses (SCIM<sub>≥95</sub>) foram, respectivamente, 0,84 e 0,59 mg/mL (OEO), 0,48 e 0,46 mg/mL (CAR), 0,47 e 0,37 mg/mL (Thy) e 92 e 115,62 µM (bioAgNP). Os derivados do orégano foram bactericidas em pelo menos 10 s, enquanto bioAgNP agiram mais rápido contra Gram-negativas (30 min) do que Gram-positivas (7 h). As combinações foram pouco hemolíticas e exibiram efeito antibacteriano aditivo contra células planctônicas, reduzindo significativamente CIM de todos os compostos e tempo de ação de bioAgNP. As associações também mostraram maior efeito antibiofilme do que os antimicrobianos isolados, pois quando combinados exibiram menor SCIM<sub>≥95</sub>; e mesmo quando não houve redução de SMIC<sub>≥95</sub>, provocaram maior redução na biomassa (cristal violeta) e atividade metabólica (MTT) dos biofilmes bacterianos. CAR/bioAgNP e Thy/bioAgNP se destacam, pois inibiram extensivamente o crescimento de biofilme pré-formado em poliestireno e superfície de vidro, interferindo com sua atividade metabólica e organização estrutural (analisada por microscopia eletrônica de varredura). Além disso, em ensaio de exposição prolongada, Thy/bioAgNP preveniu a emergência de cepas resistentes, enquanto bioAgNP sozinho perdeu a eficiência antibacteriana após 12 dias de tratamento diário. O mecanismo de ação de Thy, bioAgNP e combinação de ambos (contra *Escherichia coli*) envolve estresse oxidativo, uma vez que causaram aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica, dano à membrana plasmática e parede celular (protusões na superfície celular observadas por microscopia eletrônica), com consequente perda de conteúdo citoplasmático (proteínas, DNA, RNA e ATP). OEO e CAR atuaram como antioxidantes, porém afetaram a membrana e parede celular bacterianas (protrusões na superfície e extravasamento de conteúdo citoplasmático). Este estudo descreve, pela primeira vez, o mecanismo de ação antibacteriana de derivados do orégano e bioAgNP em associações que podem ser aplicadas em indústrias e ambientes clínicos e hospitalares.

**Palavras-chave:** Óleo essencial de orégano. Carvacrol. Timol. Nanotecnologia verde. Combinações antimicrobianas. Patógenos ESKAPEE.

SCANDORIEIRO, Sara. **Combination composed of biogenic silver nanoparticles and *Origanum vulgare* (Oregano) derivatives to combat multidrug-resistant and biofilm-producing bacteria.** 2020. 309 p. Thesis (Doctorate degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Multidrug-resistant bacteria have become a serious public health problem worldwide, which reduces treatment options in clinical settings. Therefore, there is urgent need for development of new antimicrobials. Silver nanoparticles and *Origanum vulgare* (oregano)-derived compounds exhibit excellent antimicrobial activity; however these plant terpenoids present strong organoleptic characteristics and silver resistance is already reported. In order to prevent emergence of resistant strains, to reduce oregano organoleptic effect, and to develop antimicrobial mixtures with strategic action mechanism, this study evaluated two-drugs combinations composed of biogenic silver nanoparticles (bioAgNP, synthesized with *Fusarium oxysporum*) and oregano derivatives (oregano essential oil – OEO, carvacrol – CAR, and thymol – Thy) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The following four drug-associations were tested: OEO/bioAgNP, CAR/bioAgNP, Thy/bioAgNP, and CAR/Thy. The average minimum inhibitory concentrations (MICs) against planktonic and sessile bacteria (SMIC<sub>≥95</sub>) were respectively 0.84 and 0.59 mg/mL (OEO), 0.48 and 0.46 mg/mL (CAR), 0.47 and 0.37 mg/mL (Thy), and 92 and 115.62 μM (bioAgNP). Oregano derivatives showed very fast bactericidal effect (at least 10 s), while bioAgNP acted faster against Gram-negative (30 min) compared to Gram-positive (7 h). All four combinations showed low hemolytic activity and exhibited additive antibacterial effect against planktonic cells, since they significantly reduced the MIC values of all compounds and acted faster than bioAgNP individually. The associations also showed higher antibiofilm effect than antimicrobials alone, since they exhibited lower SMIC<sub>≥95</sub> in combinations; even when reduction in SMIC<sub>≥95</sub> did not happen, they caused greater reduction in biomass (violet crystal assay) and metabolic activity (MTT assay) of bacterial biofilms. We highlight two combinations, CAR/bioAgNP and Thy/bioAgNP, as they extensively inhibited growth of preformed biofilm in polystyrene and glass surfaces, interfering with its metabolic activity and structural organization (scanning electron microscopy data). In addition, Thy/bioAgNP long treatment prevented resistance emergence, while monotherapy with bioAgNP allowed silver-resistance development after 12 days of daily treatment. Mechanism of action of Thy, bioAgNP and the combination of both (against *Escherichia coli*) involves oxidative stress, since they enhanced intracellular reactive oxygen and lipid peroxidation, damage to cytoplasmic membrane and cell wall (surface protrusions observed by electron microscopy), and consequent cellular contents leakage (proteins, DNA, RNA, and ATP). OEO and CAR did not cause oxidative stress, however both affected bacterial membrane and cell wall (protrusions on surface and loss of cytoplasmic molecules). This study describes, for the first time, the antibacterial mechanism of action of mixtures containing oregano-derived compounds and bioAgNP that may be applied in industries, hospital, and clinical environments.

**Keywords:** Oregano essential oil. Carvacrol. Thymol. Green nanotechnology. Antibacterial combinations. ESKAPEE pathogens.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Fotografias originais dos experimentos de Alexander Fleming mostrando a descoberta da penicilina.....	31
<b>Figura 02</b> – Laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1945, pela descoberta da penicilina e seus efeitos contra várias doenças infecciosas.....	31
<b>Figura 03</b> – Esquema destacando os principais mecanismos gerais de resistência aos antibacterianos.....	34
<b>Figura 04</b> – Estrutura química dos betalactâmicos.....	34
<b>Figura 05</b> – Principais mecanismos bacterianos de transferência horizontal de genes, incluindo genes de resistência a antimicrobianos.....	37
<b>Figura 06</b> – Estima-se que 10 milhões de pessoas podem morrer anualmente em 2050 em decorrência de infecções por microrganismos multirresistentes.....	39
<b>Figura 07</b> – Micrografias de biofilmes microbianos.....	45
<b>Figura 08</b> – Sistema circulatório primitivo de biofilmes microbianos.....	47
<b>Figura 09</b> – Cientistas que contribuíram com o conhecimento que temos hoje acerca de biofilmes microbianos.....	48
<b>Figura 10</b> – Primeiras evidências da associação de bactérias à superfície por meio de finas fibrilas poliméricas extracelulares.....	48
<b>Figura 11</b> – Estudo científico que apresentou a teoria do glicocálice para explicar como as bactérias se aderem a superfícies de materiais vivos e inanimados.....	49
<b>Figura 12</b> – Representações esquemáticas de pulmão com fibrose cística e placa dental.....	54
<b>Figura 13</b> – Esquema mostrando o ciclo de vida de biofilmes bacterianos.....	62
<b>Figura 14</b> – Medicamentos aprovados pelo FDA, entre 1981 e 2014, classificados de acordo com a origem (natural ou sintético).....	70
<b>Figura 15</b> – Ilustração do método de destilação por arraste a vapor para extração de óleos essenciais.....	83
<b>Figura 16</b> – Ilustração do método de hidrodestilação para extração de óleos essenciais.....	84
<b>Figura 17</b> – Antigas destilarias (em campo aberto) de flores de lavanda no	

Sul da França.....	85
<b>Figura 18</b> – Estrutura química de alguns constituintes de óleos essenciais.....	88
<b>Figura 19</b> – Morfologia macroscópica da planta <i>Origanum vulgare</i> , popularmente conhecida como orégano.....	99
<b>Figura 20</b> – Mapa de distribuição do <i>Origanum vulgare</i> pelo mundo.....	100
<b>Figura 21</b> – Estruturas químicas dos isômeros timol e carvacrol.....	101
<b>Figura 22</b> – Atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) mostrada pela técnica de disco-difusão.....	109
<b>Figura 23</b> – Mecanismo hipotético de ação antibacteriana do carvacrol como trocaador de próton.....	111
<b>Figura 24</b> – Mecanismo antibacteriano do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano).....	112
<b>Figura 25</b> – O cálice de Licurgo.....	115
<b>Figura 26</b> – Cientistas que contribuíram para o início do estabelecimento da nanotecnologia como ciência.....	116
<b>Figura 27</b> – Predominância de produtos comercializados, em diferentes categorias, contendo nanopartículas de prata (AgNP).....	127
<b>Figura 28</b> – Esquema mostrando estabilização de nanopartículas de prata (AgNP) com borohidreto de sódio (NaBH <sub>4</sub> ).....	130
<b>Figura 29</b> – Solução coloidal de nanopartículas de prata (AgNP) biossintetizadas extracelularmente utilizando <i>Fusarium oxysporum</i> .....	132
<b>Figura 30</b> – Biossíntese extracelular de nanopartículas de prata (AgNP) utilizando o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .....	133
<b>Figura 31</b> – Algumas características das nanopartículas de prata (AgNP) biossintetizadas extracelularmente utilizando o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .....	135
<b>Figura 32</b> – Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, representativas de nanoestruturas de prata com diferentes morfologias.....	138
<b>Figura 33</b> – Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de prata (AgNP). .....	146
<b>Figura 34</b> – O papel dos sistemas Sil e Cus nos mecanismos de resistência bacteriana à prata.....	150

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Exemplos de infecções e doenças humanas associadas a biofilmes, indicando alguns dos microrganismos relacionados .....	52
<b>Tabela 02</b> – Susceptibilidade de célula planctônica e séssil (biofilme) de diversas espécies bacterianas a diferentes antimicrobianos, com base na concentração inibitória mínima em µg/mL (CIM) .....	56
<b>Tabela 03</b> – Mecanismos gerais de resistência de biofilmes microbianos aos antimicrobianos .....	59
<b>Tabela 04</b> – Alguns métodos, materiais e modelos utilizados no estudo de biofilme microbiano .....	64
<b>Tabela 05</b> – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada .....	72
<b>Tabela 06</b> – Principal parte vegetal utilizada para extração de alguns óleos essenciais conhecidos .....	86
<b>Tabela 07</b> – Publicações relacionadas a diversas atividades biológicas exibidas por óleos essenciais.....	89
<b>Tabela 08</b> – Estudos mostrando diferentes aplicações de óleos essenciais ou seus bioativos como antimicrobianos.....	90
<b>Tabela 09</b> – Atividade antibacteriana, indicada pela concentração inibitória mínima (CIM), de óleos essenciais obtidos de diversas plantas .....	94
<b>Tabela 10</b> – Distribuição geográfica nativa de espécies vegetais representantes do gênero <i>Origanum</i> .....	98
<b>Tabela 11</b> – Classificação taxonômica de <i>Origanum vulgare</i> .....	100
<b>Tabela 12</b> – Composição e rendimento de óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> de diferentes procedências.....	102
<b>Tabela 13</b> – Comparação da composição de óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> extraídos de diferentes partes da planta (folhas/flores, haste e raiz), com número de compostos diferentes identificados e a porcentagem dos componentes majoritários indicados.....	104
<b>Tabela 14</b> – Estudos sobre atividade antibacteriana de compostos derivados do <i>Origanum vulgare</i> (óleo essencial, carvacrol e timol), indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM), tempo de ação, espécies bacterianas testadas e forma de seu crescimento (célula planctônica ou biofilme).....	106

<b>Tabela 15</b> – Linha do tempo com alguns dos acontecimentos importantes na era moderna da nanotecnologia.....	117
<b>Tabela 16</b> – Exemplos de algumas propriedades físicas, químicas e biológicas encontradas em materiais nanométricos.....	121
<b>Tabela 17</b> – Citotoxicidade e atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (AgNP) sintetizadas com filtrado de <i>Fusarium oxysporum</i> , indicados por concentração tóxica para 50% das células (CC <sub>50</sub> ) e concentração inibitória mínima (CIM).....	136
<b>Tabela 18</b> – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando métodos de síntese, morfologia, tamanho (nm), potencial zeta (mV), faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do nanometal e as bactérias testadas.....	141
<b>Tabela 19</b> – Transformação da unidade de concentração “mg/mL” para “% (v/v)” do óleo essencial de orégano (OEO) e carvacrol (CAR) utilizados neste estudo.....	305
<b>Tabela 20</b> – Transformação da unidade de concentração “μM” para “μg/mL” de nanopartículas de prata sintetizadas extracelularmente com o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .....	306

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
°GL	Grau Gay-Lussac
>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
±	Mais ou menos para indicar desvio padrão
1 <sup>st</sup>	<i>First</i> ou primeiro
2 <sup>nd</sup>	<i>Second</i> ou segundo
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Å	Ångström
a.C.	Antes de Cristo
Ag	Prata
Ag <sup>0</sup>	Prata metálica
Ag <sup>+</sup>	Íon de prata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
AgNP	Nanopartículas de prata
AI-2	Autoindutor (molécula de sinalização de <i>quorum sensing</i> )
AMC	Amoxicilina-clavulanato
AMP	Ampicilina
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i> ou peptídeos antimicrobianos
AmpC	Tipo de cefalosporinase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
ATP	Adenosina trifosfato

B	Macromolécula biológica
BF	Biofilme em formação
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> ou hidroxitolueno butilado
bioAgNP	Nanopartículas de prata biogênica
BM	Biofilme maduro
BRICS	Grupo composto por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul
C1	Carbono de posição 1 na cadeia principal de hidrocarboneto
C2	Carbono de posição 2 na cadeia principal de hidrocarboneto
C <sub>10</sub>	Dez unidades de “carbono” (Monoterpenos)
C <sub>15</sub>	Quinze unidades de “carbono” (Sesquiterpenos)
C <sub>20</sub>	Vinte unidades de “carbono” (Diterpenos)
C <sub>30</sub>	Trinta unidades de “carbono” (Triterpenos)
C <sub>40</sub>	Quarenta unidades de “carbono” (Tetraterpenos)
C5	Carbono de posição 5 na cadeia principal de hidrocarboneto
CA	Canais de água
Caltech	<i>California Institute of Technology</i>
CA-MRSA	<i>Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> ou <i>S. aureus</i> resistente à metilina adquirido na comunidade
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	Carvacrol
CAZ	Ceftazidima
CAZ/CLA	Ceftazidima-clavulanato
CBC	<i>Costerton Biofilm Center</i>
CC	Concentração citotóxica a 50%
CCT	Coleção de Culturas Tropical (Microbianas)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFO	Cefoxitina
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>

CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> ou microscopia confocal de varredura à laser
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Covid-19	Doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2
CP	Célula planctônica
CR	<i>Carbapenem-resistant</i> ou resistente à carbapenêmico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTX/CLA	Cefotaxima-clavulanato
Cu	Cobre
D-ala	Alanina
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> ou 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DIU	Dispositivo intrauterino
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> ou espalhamento dinâmico de luz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ou meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	N, N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Composto natural com modificação semissintética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> ou DNA de fita dupla
DTT	Ditiotreitol
EAEC 042	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa ou <i>Enteraggregative E. coli</i> 042
EDX	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> ou espectroscopia de energia dispersiva
e.g.	<i>Exempli gratia</i> ou por exemplo
EPS	<i>Extracellular polymeric substance</i> ou substância polimérica extracelular
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ESALQ-USP	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo
ESBL	<i>Extended-spectrum betalactamase</i> ou betalactamase de espectro estendido
ESI	<i>Elementar spectroscopy imaging</i> ou imagem espectroscópica elementar

ESKAPEE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp. e Escherichia coli</i>
ETP	Ertapenem
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
FEP	Cefepima
FIC	<i>Fractional inhibitory concentration</i> ou concentração inibitória fracionada
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i> ou índice da concentração inibitória fracionária
FO	Fosfomicina
g	Unidade de força centrífuga relativa (FCR, ou força g)
g	Gramma
GEN	Gentamicina
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> ou geralmente reconhecido como seguro
h	Hora
HA-MRSA	<i>Hospital-acquired methicillin-resistant S. aureus</i> ou <i>S. aureus</i> resistente à metilina adquirido no hospital
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBM	<i>International Business Machines Corporation</i>
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPM	Imipenem
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> ou Organização Internacional de Padronização
IWGN	<i>Interagency Working Group on Nanotechnology</i>
kb	Kilobases (unidade de comprimento de ácido nucleico)
KPC	Enzima <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KPC-KP	Cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC
LA-MRSA	<i>Livestock-associated methicillin-resistant S. aureus</i> ou <i>S. aureus</i> resistente à metilina associado à produção animal
LB	Caldo Luria-Bertani

log	Logaritmo decimal
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
m	Metro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAS	Ampicilina-sulbactam
MB	Mistura botânica
MBC	<i>Minimum bactericidal concentration</i>
MDA	Malondialdeído
MDR	<i>Multidrug-resistance</i> ou resistência a múltiplas drogas
<i>mecA</i>	Marcador molecular (gene) de resistência à meticilina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
MHB	<i>Mueller-Hinton broth</i> ou caldo Mueller Hinton
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
min	Minuto
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MRSA	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i> ou <i>S. aureus</i> resistente à meticilina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Citrato de sódio
NaBH <sub>4</sub>	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NAL	<i>Nalidixic acid</i> ou ácido nalidíxico
NBIC	<i>National Biofilms Innovation Center</i>
NC	Não citotóxico
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
ng	Nanograma
NIP	Núcleo Integrado de Pesquisa

NIT	Nitrofurantoína
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
NOR	Norfloxacino
NR	Não reportado
OD <sub>550</sub>	Densidade óptica medida a 550 nm
OD <sub>570</sub>	Densidade óptica medida a 570 nm
OD <sub>595</sub>	Densidade óptica medida a 595 nm
OEO	Óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
OsO <sub>4</sub>	Tetróxido de ósmio
p-	Radical que indica a posição “para” (1–4) de duas ramificações em cadeia de hidrocarboneto
p<0.05	Probabilidade menor que 5%
p>0.05	Probabilidade maior que 5%
PB	Polimixina B
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i> ou proteína de ligação à penicilina
PBP2'	Proteína de ligação à penicilina alterada
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ou tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
PDR	<i>Pandrug resistance</i> ou Pan-resistência
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico de uma solução
pMG101	Plasmídeo
ppm	Parte por milhão
PUBMED	Base de dado que compreende literatura biomédica
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
R	Resistente
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> ou unidade de fluorescência relativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ou espécie reativa de oxigênio

rpm	Rotação por minuto
RTCA	<i>Real time cell analysis</i> ou análise celular em tempo real
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> ou transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	Sensível
s	Segundo (unidade de tempo)
S	Medicamento totalmente sintético
S*	Medicamento sintético contendo farmacóforo natural
S*/MN	Medicamento parcialmente sintético que mimetiza molécula natural
S/MN	Medicamento totalmente sintético que mimetiza molécula natural
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> ou cassete cromossômico estafilocócico mec
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> ou microscopia eletrônica de varredura
Sil	Proteína de resistência à prata
SMIC	<i>Sessile minimal inhibitory concentration</i> ou concentração inibitória mínima de células sésseis
SMIC <sub>100</sub>	Concentração inibitória mínima que inibe 100% das células sésseis
SMIC <sub>≥95</sub>	Concentração inibitória mínima que inibe no mínimo 95% das células sésseis
SMIC <sub>≥90</sub>	Concentração inibitória mínima que inibe no mínimo 90% das células sésseis
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> ou DNA fita simples
STR	Estreptomicina
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> ou ácido tiobarbitúrico
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> ou microscopia eletrônica de transmissão
TET	Tetraciclina
Thy	<i>Thymol</i> ou timol
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio
UCPH	Universidade de Copenhague
UFC	Unidade formadora de colônia
UniSA	Universidade do Sul da Austrália
UTI	Unidade de terapia intensiva

UV	Radiação ultravioleta
UV-A	Radiação ultravioleta (320 – 400 nm)
UV-B	Radiação ultravioleta (280 – 320 nm)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V	Volts
v/v	Porcentagem em volume (volume/volume) – unidade de concentração
VRSA	<i>Vancomycin-resistant S. aureus</i> ou <i>S. aureus</i> resistente à vancomicina
w/v	<i>Weight/volume percentage</i> ou porcentagem em massa (unidade de concentração)
WHO	<i>World Health Organization</i> ou Organização Mundial da Saúde
XRD	<i>X-ray diffraction</i> ou difração de raios-X
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>30</b>
3.1	ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	30
3.2	PATÓGENOS ESKAPEE .....	39
3.3	BIOFILME MICROBIANO .....	44
3.3.1	Vida Microbiana em Comunidade: Estrutura, Vantagens e Histórico .....	44
3.3.2	Problemas Causados por Biofilme .....	50
3.3.3	Biofilme e Resistência aos Antimicrobianos .....	55
3.3.4	Biofilme: Etapas de Formação e Métodos de Estudo .....	61
3.4	ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DA RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	66
3.5	ANTIMICROBIANOS NATURAIS .....	68
3.5.1	Antimicrobianos Derivados de Plantas .....	71
3.5.2	Óleos Essenciais de Plantas .....	81
3.5.2.1	Óleos essenciais: obtenção e comércio .....	81
3.5.2.2	Óleos essenciais: composição e atividade antimicrobiana .....	86
3.5.2.3	Óleo essencial de orégano e seus bioativos .....	93
3.6	NANOTECNOLOGIA .....	114
3.6.1	Nanopartículas Metálicas .....	123
3.6.2	Nanopartículas de Prata .....	125
3.6.2.1	Nanoprata: histórico e aplicações antimicrobianas .....	125
3.6.2.2	Síntese de nanopartículas de prata (AgNP) .....	128
3.6.2.3	Atividade antibacteriana de AgNP .....	139
3.7	COMBINAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS .....	151
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>157</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>191</b>

5.1	ARTIGO 1: ANTIBACTERIAL COMBINATIONS COMPOSED OF OREGANO DERIVATIVES AND BIOGENIC SILVER NANOPARTICLES: EFFECT AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT STRAINS AND MECHANISM OF ACTION AGAINST <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	192
5.2	ARTIGO 2: ANTIBIOFILM EFFECT OF COMBINATIONS COMPOSED OF OREGANO DERIVATIVES AND BIOGENIC SILVER NANOPARTICLES AGAINST ENTEROAGGREGATIVE <i>ESCHERICHIA COLI</i> AND CARBAPENEM-RESISTANT <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....	248
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	300
	<b>ANEXOS</b> .....	301
	ANEXO A .....	301
	ANEXO B .....	302
	ANEXO C .....	303
	ANEXO D .....	304
	ANEXO E .....	305
	ANEXO F .....	306
	ANEXO G.....	307

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos convencionais é um grave problema de saúde pública de abrangência mundial. Infecções por microrganismos multirresistentes prolongam o tempo de internação de pacientes, causam surtos hospitalares, elevam os custos econômicos para assistência à saúde e causam alta morbidade e mortalidade.

Bactérias patogênicas podem exibir diversos mecanismos de resistência, como inativação enzimática do medicamento (e.g., cepas de Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases), modificação do alvo do antibiótico (e.g., *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e redução do acúmulo intracelular do agente antimicrobiano (e.g., redução da permeabilidade celular ou aumento de efluxo do agente). Além disso, podem formar biofilmes que conferem maior tolerância a antimicrobianos e desinfetantes, e causam grande impacto negativo na indústria de alimentos, agricultura, veterinária e saúde humana. Bactérias multirresistentes não são restritas ao ambiente hospitalar, uma vez que são encontradas no âmbito comunitário e no meio ambiente.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, novos fármacos precisam ser desenvolvidos urgentemente para combater bactérias altamente resistentes (e.g., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae), porque estamos ficando sem opções de medicamentos. Se nenhuma atitude for tomada, estima-se daqui 30 anos, 10 milhões de pessoas vão morrer anualmente devido a infecções causadas por microrganismos multirresistentes, causando um imenso impacto na sociedade humana. Diante da necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos, os pesquisadores vêm investigando compostos provenientes de fontes naturais, o emprego da nanotecnologia, a combinações estratégicas de compostos, entre outros.

Moléculas derivadas de plantas representam uma fonte riquíssima de bioativos com propriedades antibióticas. Os compostos fenólicos, como o óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) (OEO) e seus componentes majoritários, carvacrol (CAR) e timol (Thy), se destacam pela excelente atividade antibacteriana, em baixa concentração e curto tempo de ação, inclusive contra cepas multirresistentes.

A nanotecnologia vem beneficiando grandemente os setores

biomédicos. Nanometais são explorados para combater diversos patógenos, pois apresentam elevada área superficial, alto potencial de redução e outras características particulares que lhes proporcionam ótima atividade antimicrobiana. Dentre eles, as nanopartículas de prata (AgNP) se destacam, uma vez que apresentam amplo espectro de ação, além de já serem incorporadas em diversos produtos do nosso cotidiano. AgNP sintetizadas biologicamente são mais ecológicas, apresentam alta estabilidade e, em geral, são menos cito/genotóxicas do que as nanopartículas sintetizadas por rotas químicas tradicionais.

Apesar da excelente ação antimicrobiana dos terpenoides derivados de orégano e das AgNP, os primeiros exibem aroma e sabor marcantes, e a resistência bacteriana à prata iônica e AgNP químicas já é relatada; todavia, a combinação de ambos é uma estratégia para lidar com esses inconvenientes, como também viabiliza diminuir a citotoxicidade do derivado vegetal. As associações de antimicrobianos são utilizadas com o propósito de minimizar a seleção de cepas resistentes ou atenuar outros efeitos indesejáveis (como toxicidade, efeitos organolépticos ou custos com tratamento).

Sabe-se que AgNP, sintetizadas extracelularmente com o fungo *Fusarium oxysporum*, e o OEO atuam sinergicamente contra células bacterianas planctônicas de diversas espécies, inclusive cepas multirresistentes. No entanto, alguns aspectos dessa associação faltam ser esclarecidos, tais como mecanismo de ação antibacteriana, efeito antibiofilme, potencial de prevenir emergência de resistência, bem como o efeito antibacteriano de combinações contendo os componentes majoritários do OEO, CAR e Thy, visando ampliar o conhecimento sobre a atividade antibacteriana e expandir o potencial de aplicação dessas composições.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de compostos fenólicos derivados do orégano, óleo essencial de orégano (OEO), carvacrol (CAR) e timol (Thy), combinados a nanopartículas de prata biogênicas (bioAgNP) frente a cepas Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive multirresistentes e produtoras de biofilme.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar biologicamente e caracterizar as nanopartículas de prata.
- Determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de cada composto separadamente frente a células planctônicas.
- Determinar a interação antibacteriana entre dois compostos em quatro combinações diferentes: OEO/bioAgNP, CAR/bioAgNP, Thy/bioAgNP e CAR/Thy.
- Avaliar o efeito dos compostos, separados e combinados, sobre a cinética de crescimento bacteriano na forma de célula planctônica.
- Verificar as alterações morfológicas e estruturais bacterianas, provocadas pelos compostos separados e combinados, em células planctônicas.
- Avaliar o estresse oxidativo em células planctônicas expostas aos antimicrobianos isolados e combinados.
- Quantificar conteúdo citoplasmático (proteínas, DNA, RNA e ATP) extravasado de células planctônicas tratadas com os antimicrobianos isolados e combinados.
- Investigar o efeito dos antimicrobianos, isolados e combinados, na produção de biomassa aderente e na atividade metabólica de biofilmes pré-formados e em estágio de formação.
- Verificar as alterações estruturais em biofilmes pré-formados tratados com os antimicrobianos isolados e combinados.
- Verificar o efeito *anti-quorum sensing* dos compostos, isolados e combinados,

na produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*.

- Investigar o impacto dos compostos separados e combinados na prevenção de emergência de cepas bacterianas resistentes.
- Avaliar a toxicidade dos compostos isolados e combinados para eritrócitos humanos.

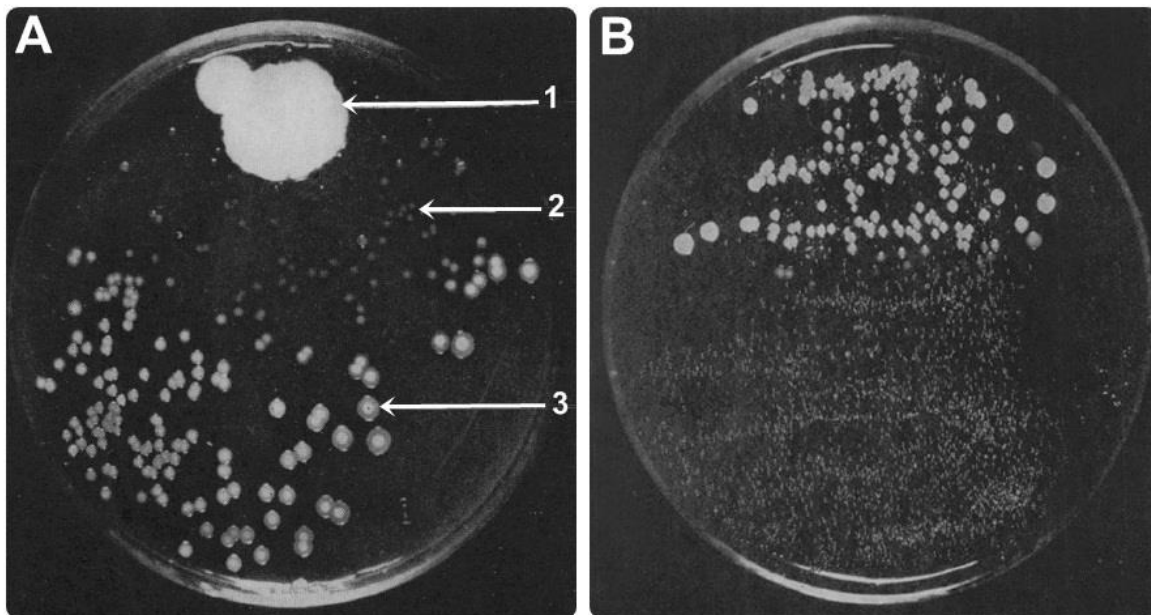
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA

Antes do início do século XX, as doenças infecciosas causaram alta morbidade e mortalidade no mundo todo. Sem antibióticos e vacinas, doenças causadas por bactérias e vírus, como tuberculose, pneumonia, tifo, sífilis, varíola e cólera, destinavam as pessoas à morte e assombravam cidades inteiras. A era dos antibióticos foi um dos acontecimentos que revolucionou o prognóstico das infecções humanas (ADEDEJI, 2016; RUNCIE, 2015).

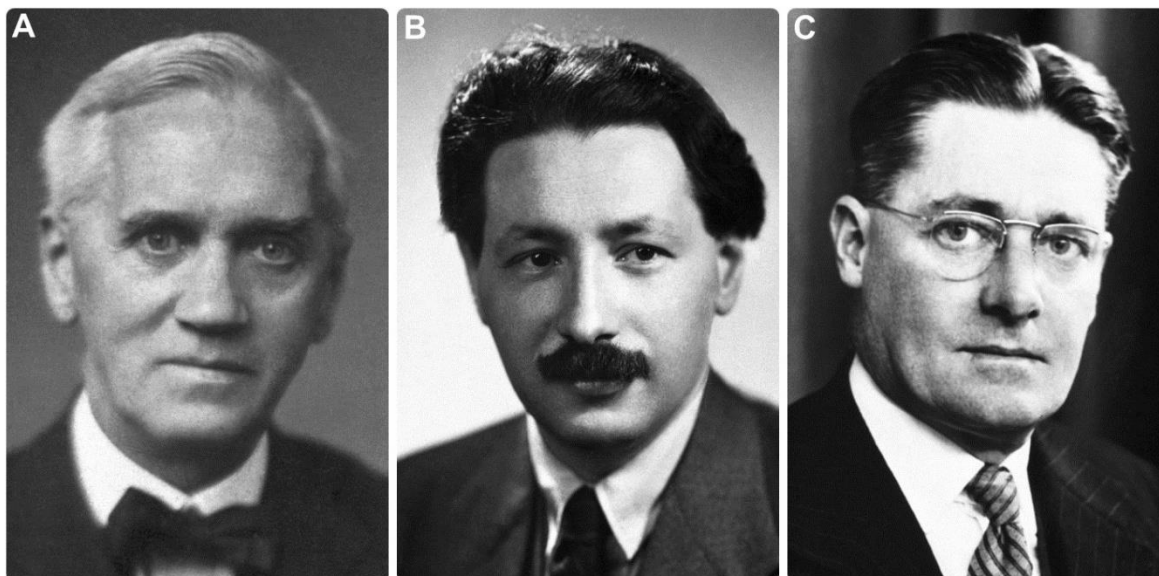
A descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming (1881 – 1955), em 1928, marcou o início da era dos antibióticos (Figura 01) (FLEMING, 1929). Em 1942, Ernst Boris Chain (1906–1979) e Howard Walter Florey (1898–1968) purificaram a primeira penicilina (penicilina G), que foi usada pelas forças armadas na Segunda Guerra Mundial (LIGON et al., 2004). Em 1945, a penicilina tornou-se disponível para a população (ADEDEJI, 2016; LIGON et al., 2004; QUINN, 2013). O período de 1950 – 1970 é conhecido como a era de ouro da descoberta de novos antibióticos, e desde então novos antimicrobianos têm sido desenvolvidos principalmente pela modificação na estrutura química dos antibióticos já existentes (AMINOV, 2010). A figura 02 mostra três dos cientistas, Fleming, Chain e Florey, que contribuíram grandemente para a ciência dos antimicrobianos.

Uma sociedade sem antibiótico torna-se vulnerável a diversas situações corriqueiras do cotidiano. Pequenos incidentes, como cortes na pele (mesmo que menores) por algum objeto contaminado ou feridas causadas por mordidas de animais podem resultar em quadros de infecção gravíssimos (KI; ROTSTEIN, 2008; NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018). A doação de órgão, um procedimento que salva muitas vidas, seria de extremo risco se os antibióticos não existissem para tratamento e prevenção de infecção em transplantados, que estão mais vulneráveis a processos infecciosos devido a uso de imunossupressores (CHAN et al., 2018). Cirurgias e partos seriam procedimentos menos bem sucedidos; na Inglaterra e país de Gales da década de 30, era comum mulheres morrerem logo após o parto, atualmente esse risco é cerca de 50 vezes menor principalmente devido ao uso de antibióticos e disponibilidade de transfusão de



**Figura 01 – Fotografias originais dos experimentos de Alexander Fleming mostrando a descoberta da penicilina. (A)** Inibição do crescimento de *Staphylococcus* ao redor da colônia de *Penicillium*. Os números na imagem indicam: colônia de *Penicillium* (1), *Staphylococcus* em processo de lise (2) e colônia normal de *Staphylococcus* (3). **(B)** Fotografia de uma placa de cultura (meio Fildes) que havia sido inoculada com uma mistura de *Staphylococcus* e bacilo de Pfeiffer (atualmente conhecida por *Haemophilus influenza*). Seis gotas de penicilina foram espalhadas sobre a metade inferior da placa. Observe a inibição completa dos estafilococos na área tratada com penicilina, restando apenas cultura pura de *H. influenza*.

**Fonte:** adaptado de Fleming (1929).



**Figura 02 – Laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1945, pela descoberta da penicilina e seus efeitos contra várias doenças infecciosas. (A)** Sir Alexander Fleming (1881–1955). **(B)** Ernst Boris Chain (1906–1979). **(C)** Sir Howard Walter Florey (1898–1968).

**Fonte:** NobelPrize.org (2020).

sangue (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2011; CHAMBERLAIN, 2006; CRADER; VARACALLO, 2020; LOUDON, 2000).

A era dos antibióticos é um dos fatores responsáveis pelo aumento na expectativa e qualidade de vida da população (ADEDEJI, 2016; AMINOV, 2010; (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020a). Segundo o IBGE, a expectativa de vida dos brasileiros em 1940 era em média de 45,5 anos. Já em 2018, a expectativa de vida passou a ser de 76,3 anos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA, 2018, 2019).

Apesar dos benefícios inquestionáveis que a era dos antibióticos têm trazido para a sociedade humana, a resistência microbiana a esses fármacos tem se tornado uma ameaça, uma vez que diminui a vida útil desses medicamentos e configura-se atualmente como um grande problema de saúde pública. Infecções por microrganismos resistentes prolongam o tempo de internação de pacientes, causam surtos hospitalares, elevam os custos econômicos para assistência à saúde e estão associadas a alta morbidade e mortalidade de pacientes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020b, 2020c; COLOMB-COTINAT et al., 2016; O'NEILL, 2014; PETERS et al., 2019).

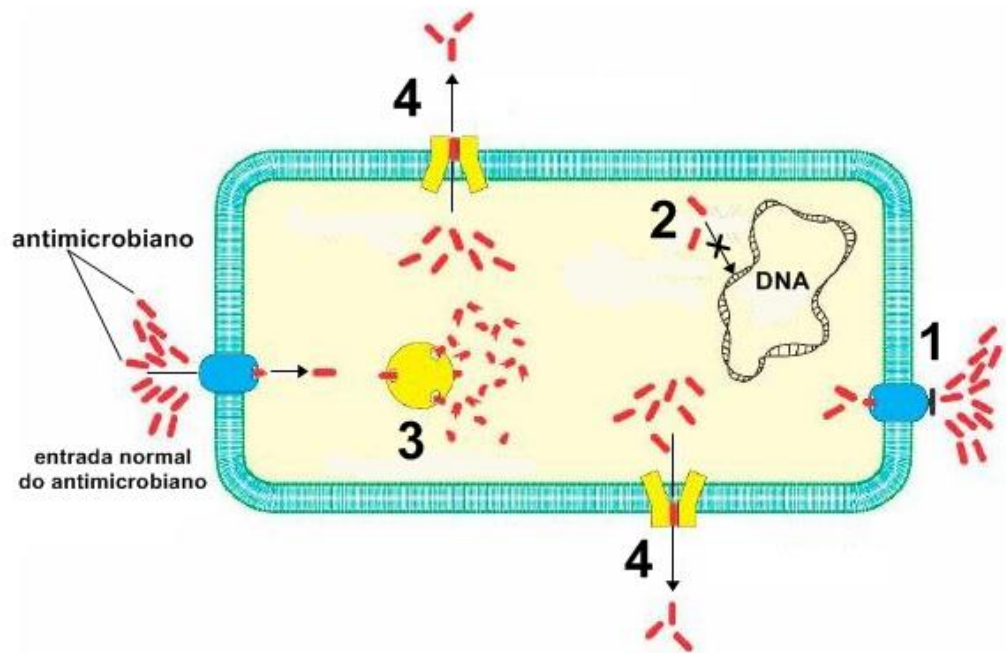
A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública de abrangência mundial, que atualmente resulta em 700 mil mortes por ano (O'NEILL, 2016). Apenas nos Estados Unidos da América (EUA), anualmente são reportadas 2,8 milhões de infecções resistentes a antimicrobianos, levando mais de 35 mil pessoas a óbito (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020b). O número de mortes por ano chega a 25 mil na União Europeia e 38 mil na Tailândia. Na Índia, mais de 58 mil bebês vão a óbito devido a infecções por bactérias resistentes geralmente transmitidas pela própria mãe (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Apesar do Brasil fazer parte do grupo de países, conhecido como BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), que faz alto uso de antimicrobianos, ação esta que contribui para ocorrência desse problema de saúde pública, nosso país tem como meta a implantação de medidas que visam o uso racional de antimicrobianos (INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2018).

Atualmente há 129 antibacterianos registrados pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Esta lista exclui os fármacos de uso exclusivo hospitalar, ainda assim há escassez de medicamentos

efetivos para combater patógenos resistentes. Um dos maiores desafios que os profissionais de saúde encontram é a resistência de bactérias a diversos antimicrobianos, sendo comum a ocorrência de infecções hospitalares com pouca ou até nenhuma opção terapêutica. Desta forma, com base na resistência aos antimicrobianos convencionais, os microrganismos são classificados em “multirresistentes” (MDR, *multidrug-resistant*) quando são resistentes a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos, “extensamente resistentes” (XDR- *extensively drug-resistant*) quando são resistentes a pelo menos um agente de praticamente todas as categorias de antimicrobianos, exceto duas ou menos categorias, e “pan-resistentes” (PDR, *pandrug-resistant*) quando apresentam resistência a todos antimicrobianos de todas as classes disponíveis (MAGIORAKOS et al., 2011).

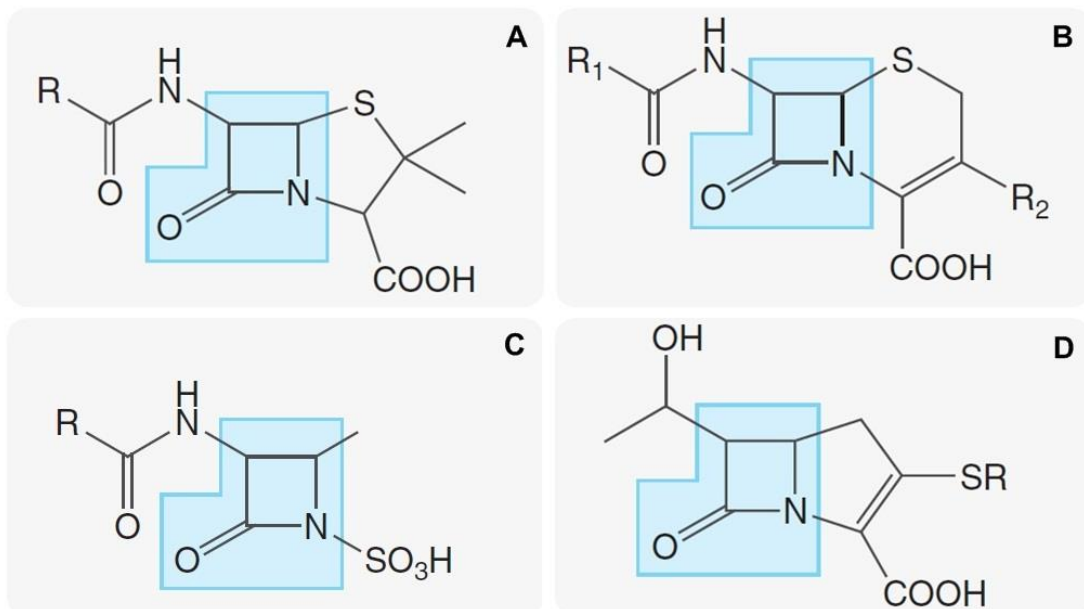
De maneira geral, os principais mecanismos de resistência a antibacterianos incluem: (i) alteração de permeabilidade da superfície bacteriana e consequente redução da entrada do antimicrobiano na célula, (ii) a alteração do alvo bacteriano do medicamento (como composição da peptidoglicana, ribossomo, RNA polimerase, transpeptidases, etc), (iii) inativação do antimicrobiano por enzimas bacterianas, (iv) sistemas de efluxo (bombas de efluxo) que expulsam o medicamento da célula (Figura 03). As bactérias Gram-negativas usam todos os quatro mecanismos principais; enquanto as bactérias Gram-positivas não possuem uma membrana externa em sua parede celular para modular a penetrabilidade dos antimicrobianos na célula, e também não possuem alguns mecanismos de efluxo que são amplamente distribuídos em Gram-negativas (REYGAERT, 2018).

Betalactâmicos representam mais de 30 fármacos, constituindo quatro grupos de antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos), que apesar de apresentarem variados espectros de ação, compartilham o mesmo mecanismo de ação, uma vez que possuem em comum o anel betalactâmico em suas estruturas (Figura 04). Os betalactâmicos inibem a síntese da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por interferirem na etapa de transpeptidação (KASMAR; HOOPER, 2009; PANDEY; CASCELLA, 2020). Durante essa etapa, transpeptidases bacterianas catalisam a ligação cruzada entre cadeias peptídicas conectadas à porção glicana. Essas enzimas atacam o resíduo D-alá-D-alá da extremidade terminal de um pentapeptídeo, resultando no deslocamento



**Figura 03 – Esquema destacando os principais mecanismos gerais de resistência aos antimicrobianos.** (1) Redução da entrada do antimicrobiano devido à limitação de permeabilidade da membrana externa (alteração de porinas). (2) Alteração no alvo do antimicrobiano, como estruturas e biomoléculas (parede celular, ribossomo, enzimas, etc). (3) Inibição enzimática (betalactamases por exemplo) do antibacteriano. (4). Expulsão do fármaco da célula por bombas de efluxo.

Fonte: adaptado de Rocha et al. (2019).



**Figura 04 – Estrutura química dos betalactâmicos.** Os agentes antibacterianos betalactâmicos diferem entre si nos seus grupos R, mas o anel betalactâmico (boxes em azul) é comum a todos os fármacos desse grupo e é responsável pela atividade antibacteriana. (A) Penicilinas. (B) Cefalosporinas. (C) Monobactâmicos. (D) Carbapenêmicos.

Fonte: adaptado de Kasmar e Hooper (2009).

de uma unidade D-ala e formação do intermediário transpeptidase-D-alanina-peptideoglicana. A extremidade amino de um outro peptídeo ataca o componente intermediário, a transpeptidase é liberada e ocorre ligação cruzada. O anel betalactâmico é um análogo estrutural do resíduo D-ala-D-ala, portanto, responsável pelo mecanismo de ação desses antibióticos. As transpeptidases bacterianas se ligam ao betalactâmico ao invés de se ligarem ao substrato natural e realizar a etapa de transpeptidação (KASMAR; HOOPER, 2009).

Em Gram-positivas, um dos mecanismos comuns de resistência aos betalactâmicos é a ocorrência de mutação no gene da transpeptidase, alterando o sítio de ação do antimicrobiano. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) carregam o gene *mecA*, em um elemento genético móvel chamado cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec), que codifica transpeptidases que apresentam baixa afinidade pelos betalactâmicos. MRSA apresenta proteínas de ligação a penicilina (PBP) normais, ou seja, transpeptidases que continuam se ligando ao betalactâmico, e PBP adicionais e alteradas (chamadas de PBP2') que não se ligam ao antimicrobiano, mas sim ao resíduo D-ala-D-ala, realizam a síntese de parede bacteriana e permitem a sobrevivência da bactéria (FOSTER, 2017; MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

No espaço periplasmático de Gram-negativas, é comum a concentração de enzimas que inativam os betalactâmicos, as chamadas betalactamases, por reação de hidrólise que resulta no ácido peniciloico (desprovido de atividade antibacteriana). Bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases se destacam entre os patógenos para os quais há pouco ou nenhum tratamento. Ambas enzimas, por meio de suas hidroxilas livres, atacam o anel betalactâmico e inativam o antimicrobiano. ESBL degradam penicilinas, maioria das cefalosporinas e monobactâmicos, portanto os carbapenêmicos são medicamentos de escolha para combater infecções causadas por cepas produtoras de ESBL (RAHMAN et al., 2018; SILVA; LINCOPAN, 2012). No entanto, as carbapenemases reduzem as opções de tratamento, uma vez que são capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e inclusive os carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Dentre as enzimas que degradam os carbapenêmicos, as do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) se destacam. Essas enzimas estão presentes em diversos patógenos Gram-negativos; embora tenham sido identificadas inicialmente em *K. pneumoniae*, outras espécies de Enterobacteriaceae

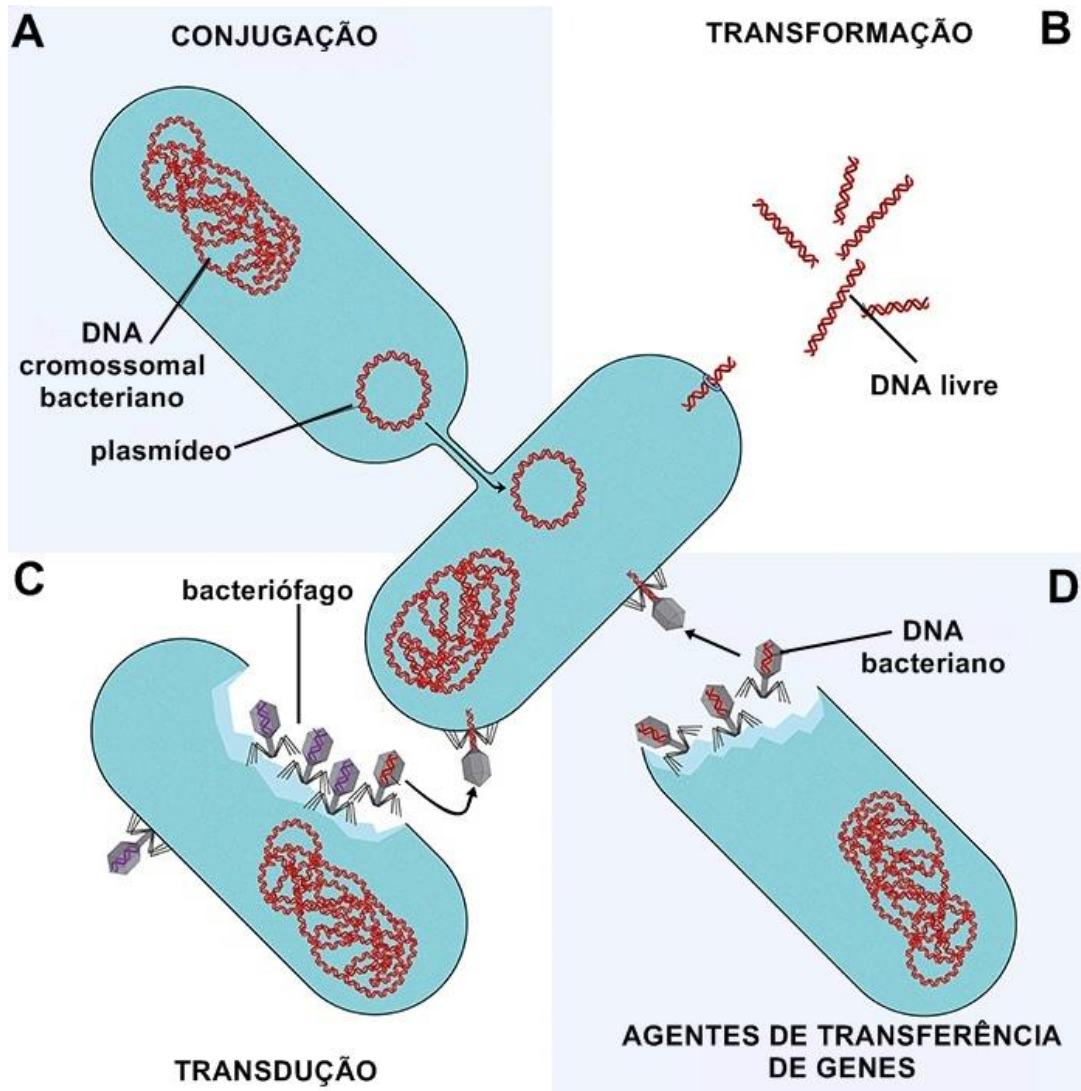
produtoras de KPC têm causado epidemias em muitas áreas do mundo (BUSH, 2018).

A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural é uma característica intrínseca do microrganismo, integrada ao seu cromossomo, que inclusive auxilia os profissionais de saúde no tratamento empírico de infecções. A resistência intrínseca pode ser definida como uma característica compartilhada universalmente dentro de uma espécie bacteriana, independente da exposição prévia a antibióticos e não está relacionada à transferência horizontal de genes (REYGAERT, 2018). Por exemplo, *Mycoplasma* spp. não possuem parede celular, portanto são naturalmente resistentes à ação dos betalactâmicos. Outro exemplo, é a presença de membrana externa com baixa permeabilidade em patógenos Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BÉBÉAR; PEREYRE, 2005; FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

A resistência adquirida quase sempre envolve microrganismo originalmente susceptível que se torna resistente após incorporar material genético extracromossômico (plasmídeos, transposons, integrons, DNA livre, etc) ou como resultado de mutação (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A transferência horizontal de gene é uma das principais rotas pelas quais as bactérias adquirem genes de resistência a agentes antimicrobianos. A disseminação de resistência entre diferentes espécies e gêneros de bactérias é um fenômeno comum, pois esses microrganismos trocam informação genética (Figura 05) por meio de transferência de elementos genéticos pela conjugação, transformação ou transdução (REYGAERT, 2018).

A resistência microbiana tem origem multifatorial, mas a corrida evolutiva dos microrganismos, que envolve produção de antibiótico e defesa contra antibióticos externos, é a responsável direta pela existência desse fenômeno. Na natureza, os microrganismos são naturalmente expostos a diversas moléculas com atividade antimicrobiana que causam pressão seletiva sobre os mesmos, sendo assim, a resistência é uma resposta de sobrevivência em ambiente competitivo. Além disso, as bactérias disseminam e adquirem diferentes genes de resistência de outras bactérias que estão no ambiente, e esse processo impulsiona a evolução das espécies microbianas e conseqüentemente colabora para emergência de múltipla resistência aos antibióticos (WIEDENBECK; COHAN, 2011).

Apesar da resistência microbiana ser um fenômeno natural (D’COSTA et al., 2011), o extensivo uso dos antibióticos intensifica a pressão seletiva sobre os microrganismos e conseqüentemente agrava o problema da resistência. A utilização



**Figura 05 – Principais mecanismos bacterianos de transferência horizontal de genes, incluindo genes de resistência a antimicrobianos. (A)** A conjugação é um processo que requer contato célula a célula via *pili* ou adesinas da superfície celular, através dos quais o DNA é transferido da célula doadora para a célula receptora. **(B)** Transformação é a captação, integração e expressão funcional de fragmentos livres de DNA extracelular. **(C)** Por meio de transdução generalizada ou especializada, bacteriófagos podem transferir DNA bacteriano de uma célula doadora infectada anteriormente para uma célula receptora. Durante a transdução generalizada, o DNA bacteriano pode ser acidentalmente carregado na cabeça do fago. Durante a transdução especializada, o DNA genômico vizinho ao DNA do profago é co-excisado e carregado em um novo fago. **(D)** Os agentes de transferência gênica são partículas como os bacteriófagos, que carregam partes aleatórias do genoma da célula bacteriana. Esses agentes podem ser liberados através da lise celular e transferem os genes para célula receptora. **Fonte:** von Wintersdorff et al. (2016).

excessiva desses medicamentos, na clínica humana e veterinária, assim como na produção de animais, interrupção do tratamento antimicrobiano de maneira indevida, entre outros, são alguns dos exemplos de uso não racional de antimicrobianos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020c; O'NEILL, 2016).

Mecanismos de resistência, como produção de enzimas que inativam

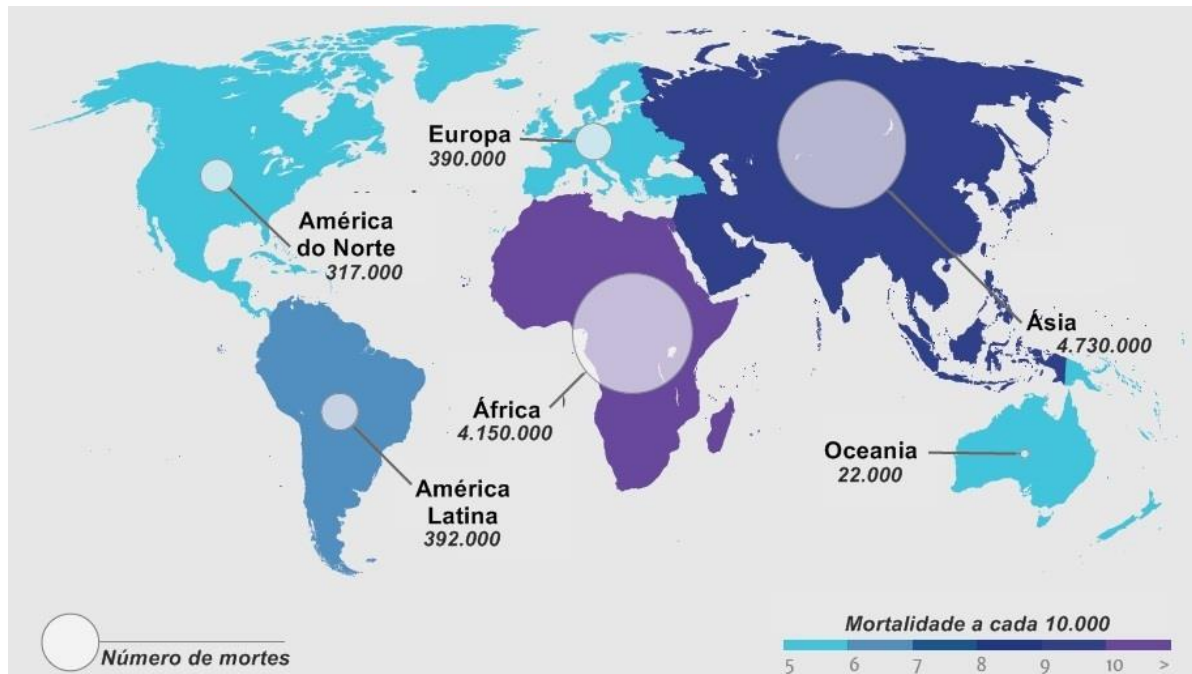
antimicrobianos (e.g., carbapenemases) ou alteração do alvo (e.g., gene *mecA*), são codificados por genes presentes em elementos genéticos móveis, que por sua vez também podem carrear resistência a outros antimicrobianos não betalactâmicos (BUSH, 2018; FOSTER, 2017; TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011) e colaborar para a emergência de bactérias MDR. Sendo assim, a disseminação da resistência é agravada pela transferência horizontal de genes e pela rapidez na reprodução bacteriana (NORBERG et al., 2011).

Bactérias MDR desafiam as equipes de controle de infecção hospitalar, muitas vezes causando surtos que comprometem o funcionamento de hospitais, bem como agravam a condição de saúde de muitos pacientes e os levam à óbito (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020b, 2020c). No entanto, não são restritas ao ambiente hospitalar, pois podem afetar a comunidade e nosso meio ambiente, já que têm sido encontradas colonizando pessoas não hospitalizadas e também como contaminantes de alimentos para consumo humano, efluentes domésticos, industriais e hospitalares, rios e lagos urbanos (ADAM, 2018; DE CAMPOS et al., 2018; DELGADO-GARDEA et al., 2016; DHAWDE et al., 2018; KOGA et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2020; VIVAS; CAICEDO; CASTILLO, 2019).

Se nenhuma atitude for tomada, estima-se que 10 milhões de pessoas vão morrer por ano devido a infecções causadas por microrganismos MDR, causando um imenso impacto na sociedade humana (Figura 06) (O'NEILL, 2016). Daqui 30 anos a resistência bacteriana pode ser responsável por uma morte a cada três segundos, representando um cenário pior que mortes atuais por trânsito (1,2 milhões/ano), câncer (8,2 milhões/ano) (O'NEILL, 2014, 2016) ou até a pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, agente causador da Covid-19 (mais de 937 mil mortes em oito meses) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

O Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram preocupação com o aumento de infecções por microrganismos resistentes, que além de acometer pacientes hospitalizados, também colocam a comunidade em risco. Além de estimular o uso consciente dos antimicrobianos, bem como a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos, CDC e OMS destacam alguns patógenos bacterianos MDR que se disseminam rapidamente e representam ameaças graves e urgentes, como *Acinetobacter* spp. e cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos, Enterobacteriaceae produtoras de ESBL e *P. aeruginosa* MDR

(CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b).



**Figura 06 – Estima-se que 10 milhões de pessoas podem morrer anualmente em 2050 em decorrência de infecções por microrganismos multirresistentes.**  
 Fonte: O’Neil (2014).

### 3.2 PATÓGENOS ESKAPEE

O termo “ESKAPEE” se refere a sete patógenos causadores de infecções nosocomiais que são comumente resistentes a múltiplos antibacterianos, além de apresentarem inúmeros fatores de virulência. A sigla contém a inicial das seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, e *Enterobacter spp.* e *Escherichia coli* (PARTRIDGE et al., 2018). Patógenos resistentes do grupo ESKAPEE causam grande impacto econômico e clínico no mundo todo, sendo associados a alta mortalidade e oneração de sistemas de saúde (MULANI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

Em 2017, a OMS publicou uma lista com doze bactérias, incluindo os patógenos do grupo ESKAPEE, para as quais o desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgente. A Organização classifica os patógenos em três categorias (prioridade “média”, “alta” e “crítica”) de acordo com a urgência da necessidade de novos medicamentos. As bactérias Gram-positivas, *E. faecium* e *S. aureus*, ambas resistentes à vancomicina, são listadas no grupo de alta prioridade. Três grupos de

Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e Enterobacteriaceae, são listados como patógenos de prioridade crítica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017, 2020b).

O gênero *Enterococcus* spp. possui pelo menos 58 espécies, sendo *E. faecium* e *Enterococcus faecalis* as espécies mais frequentemente isoladas e de maior importância na clínica humana (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Como o próprio nome sugere, *E. faecium* é uma bactéria Gram-positiva entérica comumente isolada das fezes de humanos e outros animais (“*faecium*” significa “das fezes”); é considerado um comensal oportunista, uma vez que coloniza o trato gastrointestinal de humanos e outros animais, mas pode causar infecções de trato urinário, de feridas, peritonite, bacteremias e endocardite (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014). Apesar de não serem altamente virulentos, enterococos são importantes em infecções nosocomiais, principalmente em pacientes que usam cateteres urinários ou intravasculares e que estão hospitalizados por longo período de tempo e submetidos a antibioticoterapia de amplo espectro (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota normal da pele e superfícies mucosas de seres humanos. Como o nome sugere, as células de *S. aureus* se agrupam em formato de cacho (aspecto microscópico) e suas colônias apresentam coloração que variam do branco-porcelana ao amarelo-ouro (“*aureus*” significa dourado) (GNANAMANI; HARIHARAN; PAUL-SATYASEELA, 2017). MRSA foi identificada em 1961, como consequência do intenso uso de penicilina. A incidência de infecção por MRSA adquirida na comunidade (CA-MRSA, *community-acquired* MRSA) tem aumentado, muitas vezes causando epidemia, afetando diversos países, como EUA, Canadá, China e Sul da Europa (e.g., Portugal, Espanha, Itália e Grécia) (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; OLIVEIRA et al., 2020; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). CA-MRSA está tipicamente relacionada a infecção de pele e tecidos moles, MRSA adquirida em hospital (HA-MRSA, *hospital-acquired* MRSA) normalmente causa pneumonia e sepse (OLIVEIRA et al., 2020). MRSA também tem sido associada a pecuária (LA-MRSA, *livestock-associated* MRSA), encontrada em vacas, porcos e bezerras, e outros animais como cachorro, gato, ovelha, ave, coelho e cavalo. Esses animais representam reservatório de MRSA que pode causar infecções em humanos, além de cepas LA-MRSA implicar prejuízos econômicos no setor pecuário, causando mastite em vacas leiteiras por exemplo

(LAKHUNDI;ZHANG, 2018).

*Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, geralmente encapsulado, pertencente à família Enterobacteriaceae (BENGOECHEA; PESSOA, 2019). O nome do gênero é em homenagem ao microbiologista alemão Theodor Albrecht Edwin Klebs. Apesar de ser comensal, pode causar infecções oportunistas, como pneumonias (origem do nome da espécie), infecções do trato urinário e peritonite (ETYMOLOGIA..., 2010; MARTIN; BACHMAN,2018). Carbapenêmicos têm sido utilizados para tratar infecções nosocomiais sérias causadas por *K. pneumoniae* MDR, no entanto, a emergência de resistência a tais medicamentos, principalmente devido a produção de carbapenemases, constitui um sério problema em ambientes hospitalares, uma vez que as opções terapêuticas são reduzidas e medicamentos tóxicos acabam sendo utilizados (e.g., aminoglicosídeos e polimixinas) (OLIVEIRA et al., 2020).

*Acinetobacter. baumannii* é um cocobacilo, Gram-negativo, não fermentador e ubíquo (amplamente distribuído na natureza e no ambiente hospitalar) (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018). A origem etimológica do gênero remete ao fato de serem bastonetes sem flagelo (“*akinetos*” e “*bactrum*” significam “incapaz de mover-se” e “bastonetes” respectivamente). O nome da espécie é em homenagem ao microbiologista Paul Baumann (VÁZQUEZ-LÓPEZ et al., 2020). Apresenta-se como um patógeno oportunista que tipicamente causa infecções em pacientes hospitalizados sob tratamento com antimicrobianos de amplo espectro, em recuperação de cirurgia ou sob ventilação respiratória. Apesar de estar presente em ambientes úmidos, é capaz de sobreviver em superfícies secas como a pele e superfícies hospitalares. Pode causar infecções no trato respiratório, trato urinário, feridas e sepse, que são de difícil tratamento, uma vez que comumente *A. baumannii* é resistente aos antimicrobianos disponíveis, apresentando taxas de MDR quatro vezes maiores que *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018); OLIVEIRA et al., 2020; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Cepas de *A. baumannii* produtoras de metalo e serina-betalactamases, com potencial para inativar todos os betalactâmicos, têm sido reportadas(SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Globalmente, aproximadamente 45% das infecções causadas por *A. baumannii* são MDR, mas essa porcentagem sobe para 60% nos EUA, América Latina e Oriente Médio. Turquia e Grécia têm reportado taxas que excedem 90% (OLIVEIRA et al., 2020).

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo e não fermentador. O nome “Pseudomonas” se refere à aparência deste microrganismo após coloração de Gram, pois essa espécie se apresenta disposta aos pares, assemelhando-se a células únicas (“*pseudes*” significa falso, e “*monas*” significa uma unidade). O nome da espécie tem relação com a pigmentação das colônias resultante da produção de pioverdina, piocianina e piorrubina (“*aeruginosa*” significa cheio de ferrugem ou verde) (PALLERONI, 2010). Devido a suas exigências nutricionais simples, versatilidade metabólica e tolerância a uma ampla faixa de temperatura (4 – 42°C), são organismos ubíquos, amplamente distribuídos na natureza (solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação e água) e em ambientes hospitalares úmidos (pias, banheiros, equipamentos de ventilação mecânica e diálise, etc). É um patógeno oportunista que afeta pacientes com sistema imune comprometido ou aqueles que fazem uso de antimicrobiano de amplo espectro (STREETER; KATOULI, 2015).

*Pseudomonas aeruginosa* causa doenças pulmonares que podem variar em gravidade, desde uma traqueobronquite até uma grave broncopneumonia; cepas mucoides (devido à produção abundante de cápsula de polissacarídeo) comumente infectam pacientes com fibrose cística (OLIVEIRA et al., 2020; STREETER; KATOULI, 2015). Pode causar uma série de infecções de pele, principalmente em pacientes queimados. É a causa mais comum de osteocondrite (inflamação de ossos e cartilagens) após ferimento penetrante (e.g., pisar em prego), além de causar infecções do trato urinário, principalmente em pacientes com cateteres urinários de longa permanência, infecções auriculares, oculares, bacteremia e endocardite (STREETER; KATOULI, 2015).

*Pseudomonas aeruginosa* produz vários fatores de virulência como enzimas e toxinas, e são ótimos formadores de biofilme, exibindo capacidade de se proteger de desinfetantes, antibióticos e mecanismos de defesa do hospedeiro (STREETER; KATOULI, 2015). Essa espécie é naturalmente resistente a muitos antibióticos, e podem adquirir resistência a muitos outros fármacos durante o tratamento, principalmente devido a produção de carbapenemases (do tipo KPC ou metalobetalactamase) e perda de porinas (OLIVEIRA et al., 2020; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; STREETER; KATOULI, 2015).

O gênero *Enterobacter* inclui 22 espécies de bacilos Gram-negativo pertencentes à família Enterobacteriaceae. *Enterobacter* spp. estão associados a uma

variedade de habitats, solo, água, como fitopatógenos ou endofíticos, bem como microbiota intestinal de humanos e outros animais. *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter hormaechei* representam as espécies mais frequentemente associadas a infecções hospitalares, especialmente em pacientes imunocomprometidos e internados em unidade de terapia intensiva (UTI), devido à adaptação dessas espécies a antimicrobianos e ao comportamento como patógenos oportunistas (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈ, 2019). Espécies de *Enterobacter* MDR, principalmente resistentes a carbapenêmicos, ou até resistentes à colistina, são um sério problema em infecções hospitalares adquiridas (OLIVEIRA et al., 2020).

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, também pertencente à família Enterobacteriaceae, faz parte da microbiota intestinal de humanos e outros animais de sangue quente. Normalmente, *E. coli* e seu hospedeiro coexistem em boas condições de saúde e com benefício mútuo. As cepas comensais raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais normais são rompidas (peritonite, por exemplo). No entanto, existem cepas de *E. coli* patogênicas, com genes de virulência que conferem capacidade de adaptação a novos nichos e lhes permitem causar um amplo espectro de doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; VILA et al., 2016). *E. coli* MDR foi recentemente adicionada ao grupo ESKAPE (agora chamado ESKAPEE), pois é uma das principais causas de infecção da corrente sanguínea e do trato urinário na comunidade e setores hospitalares mundialmente (PARTRIDGE et al., 2018). Além disso, pode causar gastroenterite, meningites e sepses (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; OLIVEIRA et al., 2020).

Como visto, patógenos ESKAPEE podem exibir diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, como inativação enzimática do medicamento, modificação do alvo do antibiótico e redução do acúmulo intracelular do medicamento (por redução de permeabilidade da superfície celular ou aumento de efluxo do composto) (MULANI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; PARTRIDGE et al., 2018; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Além disso, podem formar biofilmes que fisicamente conferem maior tolerância aos antimicrobianos, desinfetantes e sistema imune dos hospedeiros, além de causar grande impacto negativo na indústria de alimentos, agricultura, veterinária e saúde humana (FLEMMING; WUERTZ, 2019; FLEMMING et al., 2016).

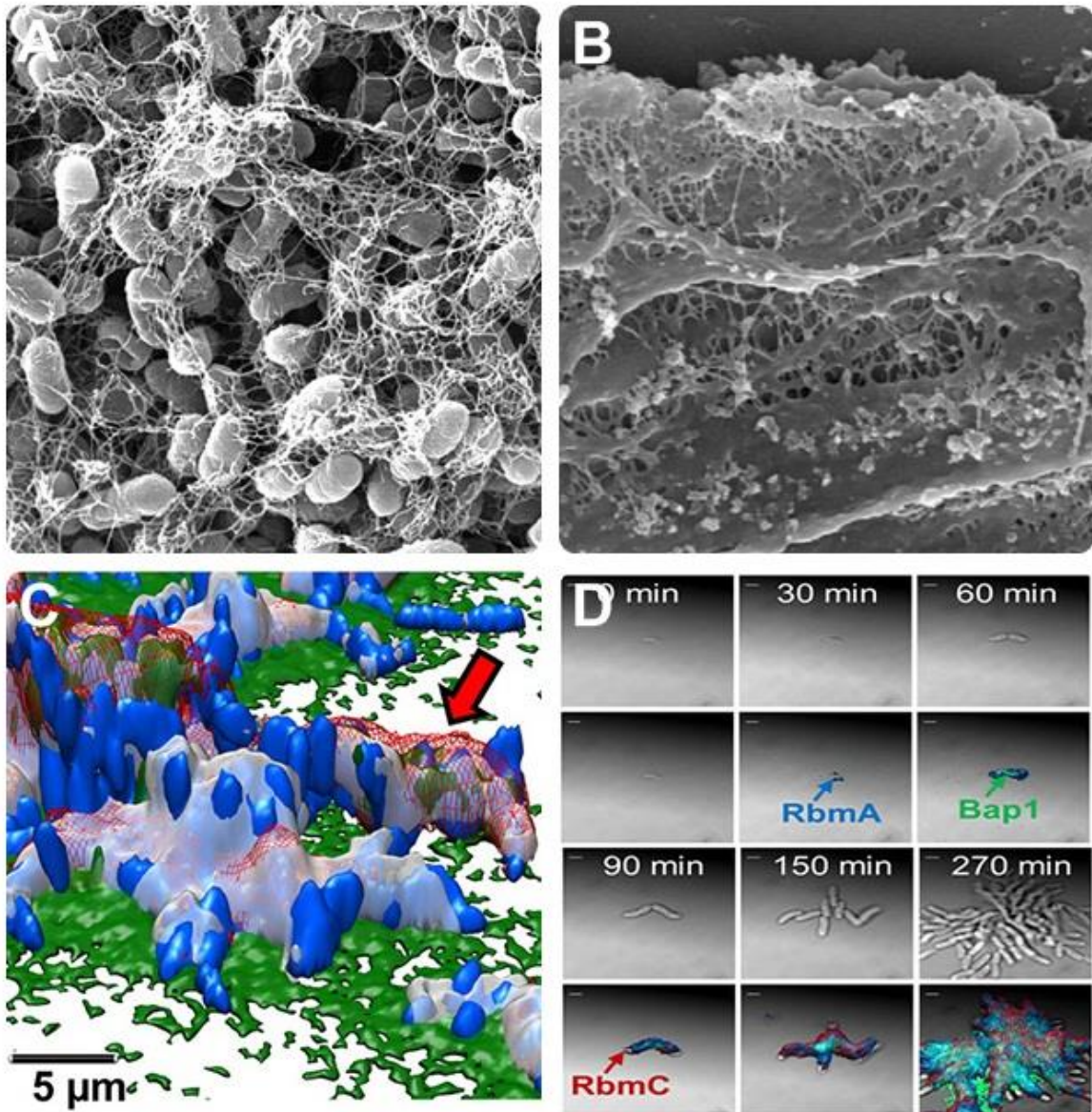
### 3.3 BIOFILME MICROBIANO

#### 3.3.1 Vida Microbiana em Comunidade: Estrutura, Vantagens e Histórico

Biofilmes são sistemas biológicos complexos, nos quais os microrganismos estão organizados em comunidade de maneira funcional e coordenada. Esses sistemas são constituídos por agregados celulares microbianos, normalmente aderidos a superfícies (bióticas ou abióticas), envolvidos por uma matriz secretada pelos próprios microrganismos (Figura 07). A matriz é constituída por substâncias poliméricas extracelulares (EPS, *extracellular polymeric substances*), como polissacarídeos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, entre outras (FLEMMING; WUERTZ, 2019; FLEMMING et al., 2016; GUPTA et al., 2016). Apesar de biofilmes microbianos serem constituídos por alta densidade celular, apenas 10% de seu peso seco é representado por célula, sendo o restante composto por matriz. A matriz é constituída, em sua menor parte, por polímeros, que são essenciais para estrutura e funcionamento do biofilme; 97% da sua composição é feita de água, que é a grande responsável pelo fluxo de nutrientes e substância tóxicas (FLEMMING et al., 2016; GUPTA et al., 2016).

Biofilmes microbianos podem ser constituídos por uma única espécie (monoespécie), principalmente em condições laboratoriais; mas na natureza, no geral, são comunidades heterogêneas que compreendem várias espécies (biofilmes multiespécies) ou comunidade de fungos e bactérias, com diversas interações ecológicas, entre elas mutualísticas e comensalísticas (COSTA-ORLANDI et al., 2017; FLEMMING; WUERTZ, 2019; FLEMMING et al., 2016).

São amplamente distribuídos na natureza, aderidos a rochas de lagos, ao interior de canos de água, equipamentos industriais e hospitalares. Em ambiente natural, os microrganismos raramente existem como colônias separadas, como visualizamos em laboratório; estima-se que 99% das bactérias existam na forma de biofilme (FLEMMING; WUERTZ, 2019; WATNICK, 2000). Em sua grande maioria, bactérias naturalmente ocupam nichos associados à superfície; águas de fluxo corrente das rochas Alpinas, por exemplo, contêm 8 a 12 bactérias a cada mililitro, já aderidas às rochas há  $5 \times 10^8$  bactérias por  $\text{cm}^2$  (COSTERTON, 1999; FLEMMING; WUERTZ, 2019).



**Figura 07 – Micrografias de biofilmes microbianos.** (A) Imagem (aumento de 10.000x), obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de biofilme de *Escherichia coli* O157:H7, com produção de fímbria, formado em membrana de nylon por 24 h (Lee et al., 2011). (B) Imagem (aumento de 10.000x), obtida por MEV, de biofilme composto por matriz que se adere à superfície de tubo endotraqueal (Gil-Perotin et al., 2012). (C) Reconstrução em 3D de biofilme de *Vibrio cholerae* mostrando a função de quatro componentes da matriz (marcadores fluorescentes específicos) na sua arquitetura. As células bacterianas (azul) aderidas à superfície por uma proteína conhecida por Bap1 (verde) e outra proteína chamada RbmA (cinza) que participa da adesão célula-célula. Os aglomerados bacterianos são envolvidos por material (vermelho) composto de proteínas, por exemplo a RbmC, e moléculas de açúcar. As três proteínas (RbmA, RbmC, and Bap1) possuem domínio de ligação a carboidratos (Berck et al., 2012). (D) Imagens obtida por microscopia confocal (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) que mostram a expressão e distribuição das proteínas de matriz (RbmA, RbmC, and Bap1) durante o desenvolvimento do biofilme de *V. cholerae* com o decorrer do tempo (0 a 270 min) (Berck et al., 2012). **Fonte:** adaptado de Lee (2011), Gil-Perotin et al. (2012) e Berck et al. (2012).

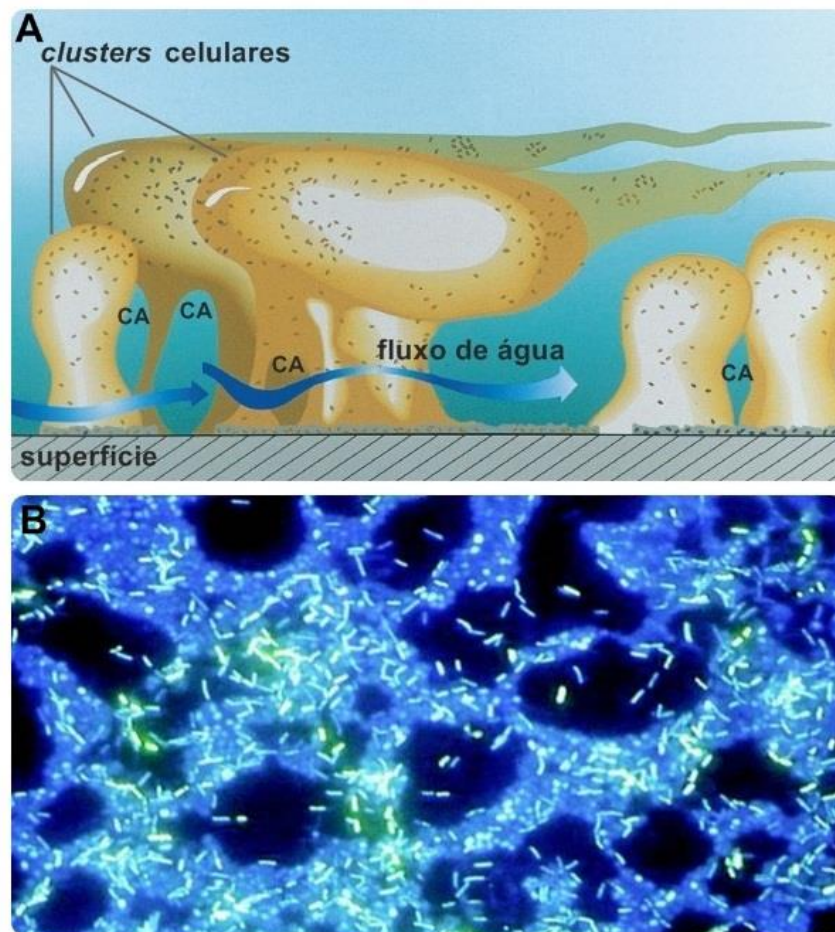
Na natureza, biofilmes estão instintivamente e naturalmente sobrevivendo aos raios ultravioletas (UV) e dessecação, é o “comportamento” natural dos microrganismos. Para bactérias, as vantagens da formação de biofilme

são numerosas e incluem proteção contra antimicrobianos, desinfetantes, baixo pH, incidência de UV, dessecação e defesas do sistema imune, escassez de nutrientes, entre outros (CHANDKI; BANTHIA; BANTHIA, 2011; COSTERTON, 1999; DONLAN, 2002; FLEMMING; WUERTZ, 2019).

Basicamente, o crescimento bacteriano na forma de biofilme confere três benefícios aos microrganismos: autodefesa, permanência em nicho favorável e “sistema circulatório primitivo”. Biofilmes são mecanismos de autodefesa microbianos, que resistem às intempéries físicas que podem remover as células não aderidas, resistem à fagocitose pelas células do sistema imune e dificultam a penetração e ação de moléculas tóxicas, como os antibióticos e desinfetantes. Biofilmes permitem às células ficarem num nicho favorável, fixadas a superfícies abundantes em nutrientes ou onde são constantemente repostos, como tecidos animais ou rochas de um riacho. Nas regiões mais profundas do biofilme, os nutrientes não estão disponíveis (devido ao excesso de camadas de células). No entanto, o crescimento microbiano na forma de pilares constitui um sistema circulatório primitivo (Figura 08) que permite a formação de canais, através dos quais a água pode fluir para introduzir nutrientes e retirar resíduos (CHANDKI; BANTHIA; BANTHIA, 2011; FLEMMING et al., 2016).

A descoberta de biofilmes microbianos pode ser creditada a Antonie van Leeuwenhoek (Figura 09), que há 300 anos (século XVII), com auxílio de microscópios extremamente simples (de apenas uma lente), observou microrganismos em superfícies dentárias (CHANDKI; BANTHIA; BANTHIA, 2011; HØIBY, 2017). Antonie van Leeuwenhoek (Holanda, 1632–1723) foi o primeiro estudioso a empregar um microscópio na investigação da natureza. Suas observações microscópicas foram publicadas em cartas do período de setembro de 1683 a junho de 1708, os microrganismos aderidos a dentes foram chamados de “*animalcules*” (LANE, 2015). Mas o conhecimento da predominância de biofilme como forma natural de vida microbiana só teve início no final da década de 70.

Em 1971, Marshall e colaboradores forneceram evidências, com base em microscopia eletrônica de varredura (MEV), que bactérias se associam à superfície por meio de fibrilas poliméricas extracelulares (Figura 10) (MARSHALL; STOUT; MITCHELL, 1971). Bill Costerton e colaboradores fizeram a primeira definição de biofilme, cujo termo foi introduzido em 1985 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; HØIBY, 2017), na famosa e importante publicação científica intitulada “*How Bacteria Stick*” (Figura 11).

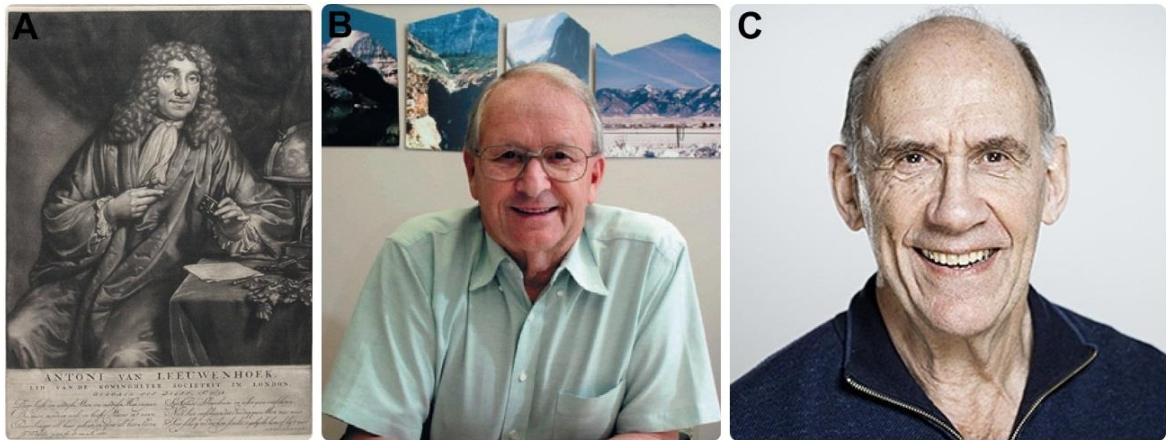


**Figura 08 – Sistema circulatório primitivo de biofilmes microbianos. (A)** Imagem esquemática que mostra como as correntes de água (setas azuis) se movem entre os pilares de células (*clusters celulares*), aderidos à superfície, pelos canais de água (indicados por “CA”). Esse sistema circulatório permite que as células tenham acesso de maneira eficiente aos nutrientes, além de promover a remoção de produtos residuais. **(B)** Fotomicrografia de biofilme marcado com a sonda fluorescente DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), formado em uma tubulação de aço inoxidável. Os canais de água aparecem como regiões escuras arredondadas entre a biomassa microbiana marcada em azul fluorescente (sonda liga-se ao DNA microbiano).

**Fonte:** adaptado de Donlan e Costerton (2002); Madigan et al. (2010).

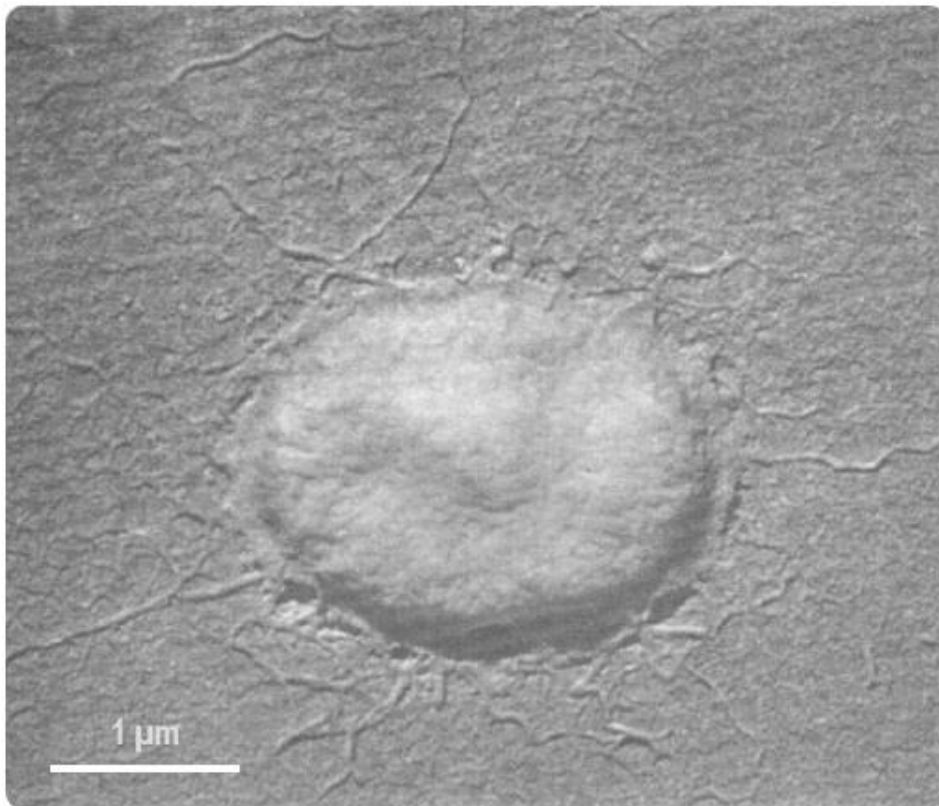
O conhecimento sobre a importância médica de biofilmes microbianos veio à tona com a microbiologia odontológica. Em 1981, Jendresen e colaboradores associaram a agregação de bactérias à superfície dentária com o desenvolvimento de cárie e outras infecções orais, como a periodontite (JENDRESEN et al., 1981; JENDRESEN; GLANTZ, 1981). Posteriormente, biofilme foi relacionado à infecção bacteriana crônica associada a fibrose cística. Na década de 70 (1970–1977) mostrou-se a presença de agregados de *P. aeruginosa* no escarro e tecido pulmonar de pacientes infectados cronicamente. Niels Høiby (Figura 09) relacionou a etiologia de uma infecção persistente (crônica) a agregados de bactérias (HØIBY, 2017; HØIBY;

AXELSEN, 1973).



**Figura 09 – Cientistas que contribuíram com o conhecimento que temos hoje acerca de biofilmes microbianos. (A)** Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723) fez as primeiras descrições microscópicas de células microbianas aderidas (Lane, 2015). **(B)** John William Bill Costerton (1934–2012), o “Pai do Biofilme”, introduziu o termo “biofilme”, descreveu sua estrutura, ubiquidade e importância nas mais vastas áreas (Shirtiliff, 2012). **(C)** Niels Høiby (1941) relacionou a formação de biofilme com infecção persistente em pacientes com fibrose cística (tv2lorry.dk).

**Fonte:** adaptado de Shirtiliff (2012), Lane (2015) e tv2lorry.dk.



**Figura 10 – Primeiras evidências da associação de bactérias à superfície por meio de finas fibrilas poliméricas extracelulares.** Micrografia, obtida por microscopia eletrônica de varredura, de bactérias aderidas à grade de níquel, publicada em 1971 na revista *Journal of General Microbiology*, no artigo intitulado “*Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces*”.

**Fonte:** adaptado de Marshall et al. (1971).

# How Bacteria Stick

*In nature (but not in laboratory cultures) bacteria are covered by a "glycocalyx" of fibers that adhere to surfaces and to other cells. Adhesion might be prevented by a new kind of antibiotic*

by J. W. Costerton, G. G. Geesey and K.-J. Cheng

**B**acteria stick, tenaciously and often with exquisite specificity, to surfaces ranging from the human tooth or lung and the intestine of a cow to a rock submerged in a fast-moving stream. They do so by means of a mass of tangled fibers of polysaccharides, or branching sugar molecules, that extend from the bacterial surface and form a feltlike "glycocalyx" surrounding an individual cell or a colony of cells. The adhesion mediated by the glycocalyx determines particular locations of bacteria in most natural environments;

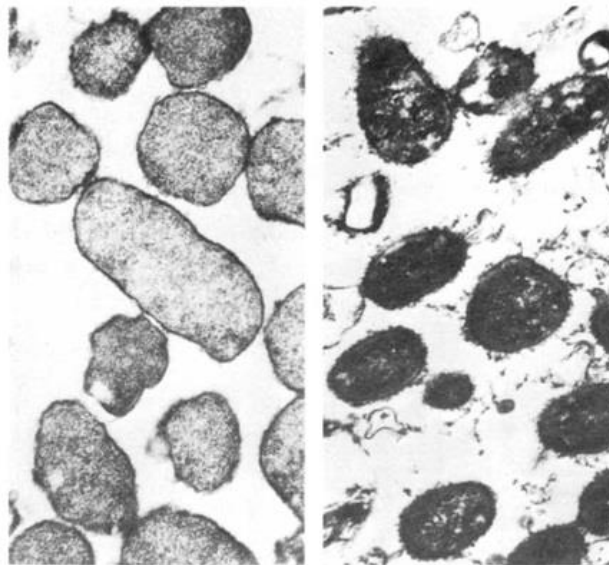
more specifically, it is a major determinant in the initiation and progression of bacterial diseases ranging from dental caries to pneumonia.

These major—and, with the benefit of hindsight, rather obvious—facts about the bacterial cell surface have become known only within the past decade. Ironically the main reason for the late discovery of the bacterial glycocalyx and its functions was the long reliance by microbiologists on an otherwise eminently effective investigative system: the pure laboratory culture of an individual

bacterial strain. To generate and maintain a glycocalyx a bacterial cell must expend energy, and in the protected environment of a pure culture the glycocalyx is a metabolically expensive luxury conferring no selective advantage; cells that fabricate these elaborate coatings are usually eliminated from pure cultures by uncoated mutants that can devote more of their energy budget to proliferation. Microbiologists have largely studied such naked mutants.

In a competitive natural environment populated by several kinds of bacteria, on the other hand, selection favors cells that are protected, and enabled to adhere to a desirable surface, by a glycocalyx. It was only in 1969 that Ivan L. Roth of the University of Georgia demonstrated carbohydrate fibers surrounding bacteria in an aquatic system and Ian W. Sutherland of the University of Edinburgh Medical School characterized the surface polysaccharides of bacteria taken from natural environments, thus drawing attention to the universality of what we now know as the glycocalyx. Since then studies in our laboratories at the University of Calgary and at the Agriculture Canada Research Station at Lethbridge in Alberta, and in a number of other laboratories, have made it clear that the glycocalyx is essential to the biological success of most bacteria in most of the varied natural environments in which they are observed.

The polysaccharide-coated surface is not a peculiarity of the bacterial cell. The more rigid polysaccharide cell wall of higher plants was among the first microscopic structures described by Robert Hooke in 1665. The analogous surface of animal cells—a glycocalyx like that of bacteria—was described only in 1971, by Vincent T. Marchesi and his colleagues at the National Institute of Arthritis, Metabolism, and Digestive Diseases. They isolated and identified glycoproteins arrayed in the membrane of animal cells and showed that the polysaccharide fibers they bear extend outward from the membrane to form



**NAKED BACTERIA** (left) are from a typical pure laboratory culture of *Escherichia coli*; the glycocalyx-coated bacteria (right) are *Pseudomonas* cells from an infected human bladder. In both preparations the cells were stained with ruthenium red, which is taken up by any polysaccharide glycocalyx fibers that are present. The bacterial glycocalyx was ignored until recently because the familiar pure laboratory strains do not need it and therefore do not fabricate it.

86

© 1977 SCIENTIFIC AMERICAN, INC

**Figura 11 – Estudo científico que apresentou a teoria do glicocálice para explicar como as bactérias se aderem a superfícies de materiais vivos e inanimados.** O artigo intitulado "How Bacteria Stick" foi publicado em 1978 por Costerton e outros cientistas na revista *Scientific American*.  
**Fonte:** adaptado de Costerton et al. (1978).

Dr. John William (Bill) Costerton (1934–2012, figura 09) estudou biofilmes microbianos por mais de 40 anos, colaborando com publicações nas mais variadas áreas, como microbiologia médica, ecologia microbiana, microbiologia

industrial e biorremediação. Por conta disso, é conhecido na comunidade científica como “*The Father of Biofilm*” (O Pai do Biofilme) e “*The King of Slime*” (O Rei do Biofilme) (SHIRTLIFF, 2012). Ele se atentou ao fato de bactérias serem infectantes por duas maneiras, seu estado planctônico e biofilme. Seus estudos colaboraram com avanços nas áreas médicas, sendo confirmado que biofilmes causam inúmeras condições crônicas (infecções do ouvido médio, pedras nos rins), e ecológicas, já que biofilmes são úteis nos tratamentos de esgotos, resíduos industriais e solo poluído (COSTERTON, 1999; SHIRTLIFF, 2012). Desde então, com o avanço das técnicas de microscopia, biofilmes microbianos têm sido estudados nos mais variados segmentos; e mesmo assim, diante da complexidade e riqueza de informação que esse campo engloba, tal forma de vida ainda precisa de muita investigação.

### 3.3.2 Problemas Causados por Biofilme

Biofilmes representam um sério problema na indústria alimentícia, principalmente no setor de laticínios. Contaminam alimentos e suas embalagens, que, podem veicular microrganismos causadores de doenças em humanos, deterioram o produto, reduzem a eficiência da produção e causam danos em equipamentos (e.g., obstruindo canos) devido a falhas nos procedimentos de higiene (GALIÉ et al., 2018; GRIGORE-GURGU et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020c). *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* e *S. aureus* são alguns patógenos que afetam a qualidade e segurança de alimentos (GALIÉ et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020c).

Mais de 200 doenças podem ser causadas por alimentos contaminados por microrganismos, afetando uma em cada dez pessoas no mundo todo e causando 420 mil mortes a cada ano. Aproximadamente 40% dessas doenças afetam crianças com menos de cinco anos de idade e causa 125 mil mortes infantis anualmente. As doenças transmitidas por alimentos são responsáveis por má nutrição, afetam bebês, crianças, idosos e pacientes com sistema imune comprometido. Além disso, impactam negativamente no desenvolvimento socioeconômico, sobrecarregam os sistemas de saúde, prejudicam a economia nacional, o turismo e o comércio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020c).

Biofilmes bacterianos causam grandes impactos negativos no campo

veterinário, implicando enormes perdas econômicas principalmente na indústria pecuária. Bactérias formadoras de biofilme são responsáveis por doenças em aves e ruminantes, além de deixar os *pets* doentes, como gatos e cachorros. Entre tais doenças e os respectivos agentes etiológicos estão: mastite (*Streptococcus agalactiae* e *S. aureus*), paratuberculose ou doença de Johne (*Mycobacterium avium paratuberculosis*) e linfadenite caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) em ruminantes, pneumonia (*Pasteurella multocida*) em aves e ruminantes, abscesso no fígado de ruminantes causado por *Fusobacterium necrophorum*, infecções em feridas de cavalos (*S. aureus* e *Pseudomonas* spp.), enterite em animais domésticos (*E. coli* e *S. enterica*), infecção do trato urinário (*E. coli*) em cães e doença periodontal (*Staphylococcus* spp.) em gatos e cães (ABDULLAHI et al., 2016).

Os biofilmes também podem causar infecções persistentes em plantas. *Acidovorax citrulli* causa necrose em Cucurbitaceae (e.g., melão, melancia), *Xylella fastidiosa* é o agente causador da doença de Pierce (bloqueio de vasos condutores de seiva) em plantações de uva, *Agrobacterium tumefaciens* induz a formação de tumor vegetal e *Xanthomonas axonopodis* causa doença dos citros (infecção das folhas) (BOGINO et al., 2013; FLEMMING et al., 2016).

Biofilmes bacterianos são responsáveis por várias infecções crônicas nos tecidos e infecções associadas a aparatos médicos, contribuindo para cerca de 80% das infecções microbianas em humanos (Tabela 01) (GUPTA et al., 2016; VESTBY et al., 2020). Muitas infecções hospitalares são relacionadas a dispositivos médicos e próteses, que são superfícies abióticas onde frequentemente biofilmes se estabelecem, como marcapassos, cateteres de hemodiálise, urinários e venosos centrais, próteses articulares ou implantes de válvulas cardíacas, dentaduras, lentes de contato, etc. As bactérias também formam biofilmes em feridas, principalmente em pacientes queimados. Biofilmes bacterianos também causam placa dentária e infecções crônicas nos seios da face e no ouvido médio. Podem causar endocardite, periodontite, osteomielite, rinosinusite e várias outras doenças (GUPTA et al., 2016; JOHNJULIO et al., 2012; RABIN et al., 2015; VESTBY et al., 2020).

A placa dental é a clássica representação de biofilme microbiano em humanos (Figura 12). Maior consumo de carboidratos implica aumento na produção e secreção de ácidos orgânicos pelas bactérias que compõem a placa dentária. A acidificação elevada leva à desmineralização do esmalte e à formação de cárie dentária (MARSH; ZAURA, 2017).

**Tabela 01** – Exemplos de infecções e doenças humanas associadas a biofilmes, indicando alguns dos microrganismos relacionados

(continua)

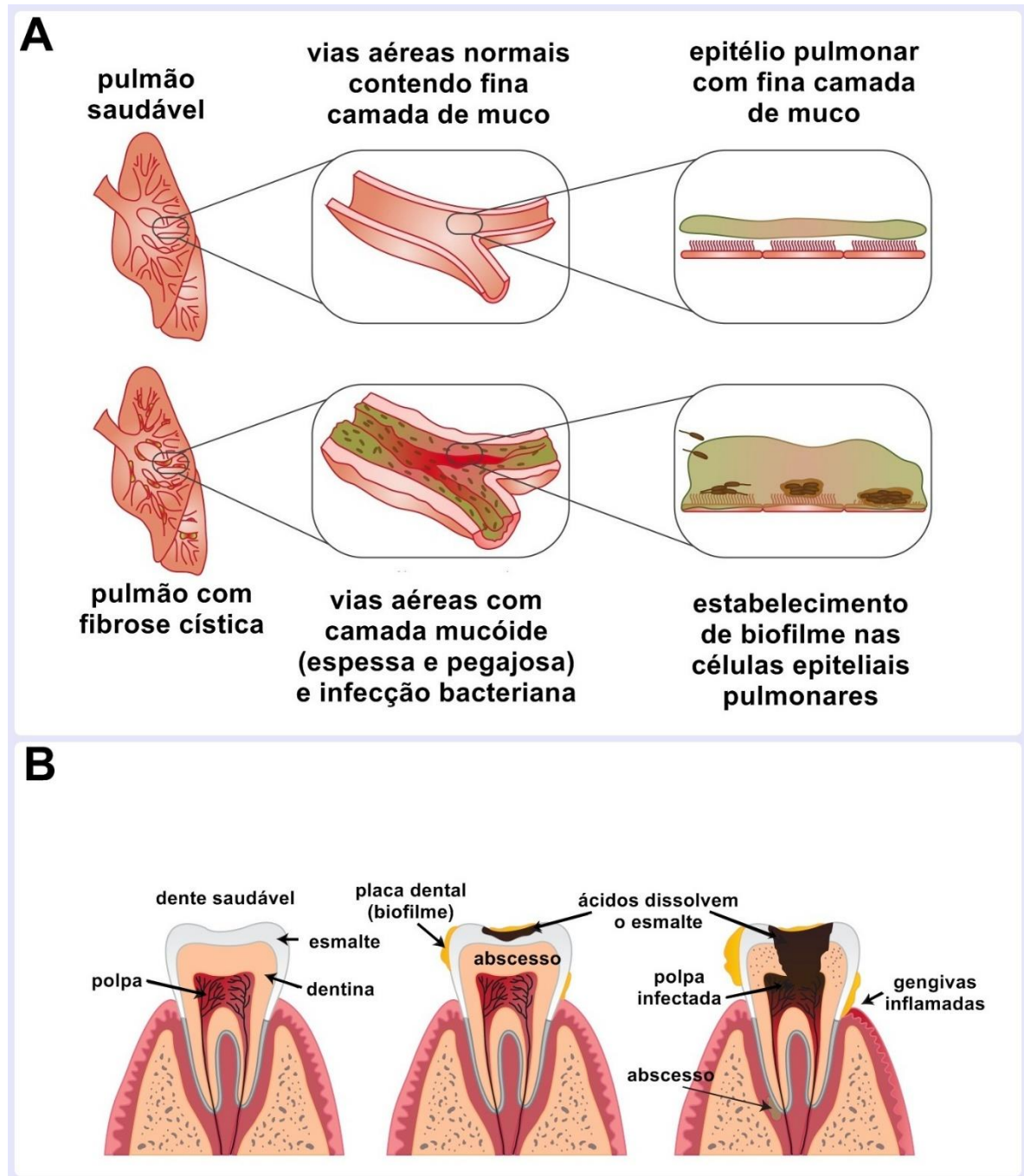
Infecção ou doença	Microrganismos
Cárie dentária	Cocos Gram-positivos acidogênicos (ex. <i>Streptococcus</i> spp.)
Endocardite protética ou de valva nativa	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., alguns bacilos Gram-negativos, <i>Candida</i> spp.
Infecção associada à cateter venoso central	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Infecção associada a dispositivo intrauterinos (DIU)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Enterococcus</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>C. albicans</i>
Infecção associada a lente de contato	<i>S. epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> spp.
Infecção associada ou não a cateter urinário	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Infecção crônica da vesícula biliar	<i>Salmonella</i> Typhi
Infecção do trato biliar	Bactérias entéricas como <i>E. coli</i>
Infecções associadas a <i>shunt</i> arteriovenoso	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Infecções associadas a suturas	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Infecções em feridas	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.
Infecções musculoesqueléticas	Cocos Gram-positivos (ex. <i>Staphylococcus</i> spp.)

**Tabela 01** – Exemplos de infecções e doenças humanas associadas a biofilmes, indicando alguns dos microrganismos relacionados

Infecção ou doença	Microrganismos
Melioidose	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Osteomielite	<i>S. aureus</i> e outras espécies bacterianas
Otite média	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Periodontite	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Pseudomonas aerobicus</i>
Peritonite associada à diálise peritoneal	Várias espécies bacterianas e fungos
Pneumonia associada a fibrose cística	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenza</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Pneumonia em unidade de terapia intensiva	Bacilos Gram-negativos
Prostatite	<i>E. coli</i> e outras bactérias Gram-negativas
Prostatite bacteriana crônica	<i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>E. faecalis</i>
Rinossinusite	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenza</i>
Vaginose bacteriana	<i>Gardnerella vaginalis</i>

**Fonte:** Adaptado de Vestby et al. (2019), Gupta et al. (2016) e Costerton (1999).

Dentre os diversos impactos negativos que biofilmes microbianos causam na saúde humana, destacamos os pacientes com fibrose cística que são susceptíveis a sofrerem infecções persistentes por bactérias formadoras de biofilme. A fibrose cística é uma doença genética crônica que se manifesta em ambos os sexos, causa anormalidade nas glândulas que produzem muco, suor ou enzimas pancreáticas, mas afeta principalmente o sistema respiratório. O muco lubrifica o sistema respiratório, evita a secagem dos tecidos e protege-os de infecções. Em pacientes com fibrose cística, o muco é mais espesso e desidratado (por conta de uma alteração no transporte de íons através das membranas celulares), o que torna sua remoção via fluxo ascendente mais difícil, assim ele fica retido nas vias aéreas e pode ser colonizado por bactérias. A doença pulmonar é a causa frequente de morte



**Figura 12 – Representações esquemáticas de pulmão com fibrose cística e placa dental. (A)** Em um pulmão saudável, as células epiteliais das vias aéreas são cobertas por uma fina camada de muco; enquanto as vias aéreas de um pulmão de paciente com fibrose cística contêm um muco espesso e pegajoso, favorecendo a formação de biofilmes bacterianos. **(B)** A placa bacteriana é formada na superfície dos dentes, onde o ácido produzido pela bactéria dissolve o esmalte dentário, causando infecções e cárie dentária.

Fonte: adaptado de Hollmann et al. [20--?].

na maioria dos pacientes (Figura 12). Cepas de *P. aeruginosa* mucoides (produtoras de alginato), e formadoras de biofilme, causam infecções pulmonares crônicas e persistentes em pacientes com fibrose cística. O polissacarídeo alginato, principal componente da matriz desse biofilme, confere às células bacterianas maior tolerância

a antibióticos e resistência à fagocitose (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010; HOLLMANN; PERKINS; WALSH, [20--?]).

### 3.3.3 Biofilme e Resistência aos Antimicrobianos

Bactérias possuem vários mecanismos de resistência a antimicrobianos, impedem a entrada ou permanência do medicamento na célula microbiana, inativam-no, alteram seu alvo de ação (Figura 03), e também podem formar biofilme, que é uma condição fisiológica de resistência a esses fármacos (OLIVEIRA et al., 2020; SINGH et al., 2017).

As bactérias formam biofilme na natureza, ambientes industriais ou hospitalares, bem como em processos infecciosos, ou seja, é uma forma de vida predominante. Bill Costerton e seus sucessores têm alertado e enfatizado que microrganismos devem ser estudados e combatidos tanto no seu estado livre como agregado, pois ambos são importantes no desenvolvimento da infecção; o biofilme é um reservatório de células planctônicas que são liberadas de seu estágio sésil e colaboram para a persistência da infecção (COSTERTON, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010).

Mas na prática clínica, o tratamento mais adequado para o paciente é determinado após testes de sensibilidade antimicrobiana serem realizados com células bacterianas planctônicas (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015), não existe regulamentação para que os testes sejam feitos também para biofilme (devido a uma série de limitações). Mas a concentração de antimicrobiano necessária para combater biofilme pode ser de 10 a 10.000 vezes maior que a dose eficiente para eliminar célula planctônica (JOHNJULIO et al., 2012; NAZZARO et al., 2019), isso contribui para resultados de falsa sensibilidade e colabora para a seleção de cepas bacterianas resistentes. A tabela 02 mostra a diferença de sensibilidade, a agentes antimicrobianos, entre biofilme e sua respectiva célula planctônica.

O perfil de resistência intrínseca do biofilme (Tabela 03) combinado a outros mecanismos de resistência (Figura 3) pode resultar em bactérias resistentes a todas as classes de antimicrobianos disponíveis (cepas PDR) (GUPTA et al., 2016; MAGIORAKOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2020; SINGH et al., 2017). Além do mais,

**Tabela 02** – Susceptibilidade de célula planctônica e séssil (biofilme) de diversas espécies bacterianas a diferentes antimicrobianos, com base na concentração inibitória mínima em µg/mL (CIM)

(continua)

Bactéria	Antimicrobianos	CIM do antimicrobiano (µg/mL)		Referência
		Célula planctônica	Biofilme <sup>a</sup>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ampicilina	2	>1024	Ceri et al. (1999)
	Cefazolina	1	>1024	
	Cefotaxima	0,06	256	
	Ciprofloxacina	0,004	8	
	Gentamicina	2	16	
	Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,06/1,14	32/608	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Amicacina	2	16	Ceri et al. (1999)
	Aztreonam	2	>1024	
	Ceftazidima	1	>1024	
	Imipenem	1	>1024	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Cefazolina	0,5	>1024	Ceri et al. (1999)
	Ciprofloxacina	0,25	512	
	Clindamicina	0,12	256	
	Oxacilina	0,12	>1024	
	Vancomicina	1	>1024	
<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4	Vancomicina	2	20	Donlan e Costerton (2002)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Imipenem	1	>1024	Donlan e Costerton (2002)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ampicilina	2	512	Donlan e Costerton (2002)

**Tabela 02** – Susceptibilidade de célula planctônica e sésil (biofilme) de diferentes espécies bacterianas a diferentes antimicrobianos, com base na concentração inibitória mínima em µg/mL (CIM)

(continuação)

Bactéria	Antimicrobianos	CIM do antimicrobiano (µg/mL)		Referência
		Célula planctônica	Biofilme <sup>a</sup>	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Ceftazidima	8	800	Donlan e Costerton (2002)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Doxiciclina	0,063	3,15	Donlan e Costerton (2002)
<i>S. aureus</i>	Penicilina G	2	>1024	Olson et al. (2002)
	Estreptomicina	128	>1024	
	Tetraciclina	<2	256	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Penicilina G	<2	>1024	Olson et al. (2002)
	Tetraciclina	<2	>1024	
	Ampicilina	<2	>1024	
<i>Burkholderia multivorans</i>	Aztreonam	2	2048	Caraher et al. (2006)
	Meropenem	2	128	
	Piperacillin-Tazobactam	4	1024	
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Aztreonam	64	2048	Caraher et al. (2006)
<i>Burkholderia dolosa</i>	Meropenem	32	256	Caraher et al. (2006)
	Piperacillin-Tazobactam	8	2048	

**Tabela 02** – Susceptibilidade de célula planctônica e sésil (biofilme) de diferentes espécies bacterianas a diferentes antimicrobianos, com base na concentração inibitória mínima em µg/mL (CIM)

(conclusão)

Bactéria	Antimicrobianos	CIM do antimicrobiano (µg/mL)		Referência
		Célula planctônica	Biofilme <sup>a</sup>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B5055	Ciprofloxacina	0,5	512	Singla et al. (2013)
	Amicacina	16	512	
	Piperacilina	16	>1024	
<i>P. aeruginosa</i>	Aztreopnam	4	1024	Macià et al. (2014)
	Ceftazidima	1-2	>1024	
	Imipinem	1-2	>1024	
	Ciprofloxacina	0,125-1	4	
	Colistina	2	128	
<i>E. coli</i>	Ácido peracético (ppm)	700	>14700	et al. (2017)
<i>P. aeruginosa</i>	Ácido peracético (ppm)	1800	7400	Chylkova et al. (2017)
<i>Salmonella</i> Senftenberg	Ácido peracético (ppm)	7400	14700	Chylkova et al. (2017)
<i>Salmonella</i> Ohio	Ácido peracético (ppm)	6400	>14700	Chylkova et al. (2017)
<i>E. coli</i>	Ácido peracético (ppm)	700	>14700	Chylkova et al. (2017)
<i>Streptococcus mutans</i>	Eritrosina	0.02	2,5	Gong et al. (2019)

<sup>a</sup> Concentração necessária para causar pelo menos 99% de redução do biofilme.

**Fonte:** Próprio autor (2020). O levantamento de dados foi realizado no período de 2016 a 2020.

**Tabela 03 – Mecanismos gerais de resistência de biofilmes microbianos aos antimicrobianos**

<b>Mecanismo</b>	<b>Observação</b>
Cápsula ou glicocálice	A matriz polissacarídica é uma barreira física à difusão dos antimicrobianos. Glicoproteínas, polissacarídeos e outras biomoléculas da matriz também agem como sítios de adsorção, impedindo o acesso do fármaco às células das camadas mais profundas do biofilme.
Neutralização enzimática	A matriz extracelular é um sistema de digestão repleto de enzimas que inativam os antimicrobianos.
Metabolismo heterogêneo	O biofilme é um ambiente heterogêneo com microambientes aeróbicos e anaeróbicos, e regiões com maior ou menor disponibilidade de nutrientes. As células das camadas mais superficiais são mais ativas metabolicamente, e nas camadas mais profundas são menos ativas e resistentes aos antimicrobianos que afetam processos celulares sintéticos.
Alta atividade de bombas de efluxo	Sistemas de efluxo são importantes na formação do biofilme para secreção de componentes de matriz ou moléculas de sinalização, mas também expulsam moléculas tóxicas a células, como os antimicrobianos.
Células persistentes	São células com baixa atividade metabólica, presentes principalmente durante a fase estacionária, resistentes aos antimicrobianos e responsáveis por infecções crônicas.
Transferência de genes de resistência	A alta densidade e proximidade de células nos biofilmes potencializam as trocas genéticas, incluindo genes de resistência aos antimicrobianos. Biofilmes são considerados reservatórios de genes de resistência.

**Fonte:** Adaptado de Flemming et al. (2016) e Singh et al. (2017).

a alta densidade celular e a proximidade das células no biofilme favorecem a troca de genes de resistência, incluindo transferência entre diferentes espécies (BALCÁZAR; SUBIRATS; BORREGO, 2015; OLIVEIRA et al., 2020).

O antimicrobiano encontra dificuldade em atingir as células microbianas porque sua difusão é limitada pela estrutura do biofilme. O EPS age como barreira física, dificultando a penetração e o acesso desses agentes às células

localizadas nas camadas profundas do biofilme. Além disso, os fármacos interagem quimicamente com os componentes da matriz, o que colabora para que a penetração seja mais lenta (FLEMMING et al., 2016; GUPTA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020; SINGH et al., 2017). Por exemplo, *P. aeruginosa* mucoides secretam alginato durante infecções crônicas e isso tem sido associado a alta resistência a antibióticos (BAHAR et al., 2015; HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010; MORADALI; GHODS; REHM, 2017). *P. aeruginosa* que produz altas quantidades de alginato são mais resistentes à tobramicina do que cepas não mucoides da mesma espécie (HENTZER et al., 2001). Cotton, Graham e Lee (2009) mostraram que a enzima alginato-liase combinada com gentamicina e ciprofloxacino causa maior morte de *P. aeruginosa* mucóide em comparação aos dois antibióticos isoladamente, indicando que o alginato tem papel importante na resistência do biofilme à gentamicina e ciprofloxacino.

Além disso, enzimas que degradam ou inativam agentes antimicrobianos se acumulam no glicocálice (FLEMMING et al., 2016). Essa neutralização enzimática de fármacos é um fator que colabora para ocorrência de infecções persistentes por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, a superprodução de enzimas cefalosporinase AmpC, por exemplo, é responsável pela resistência a diferentes antibióticos (CHALHOUB et al., 2018).

Outro fator relevante é o fato de biofilmes serem sistemas heterogêneos, com imensa diversidade metabólica influenciada pela disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Existe um gradiente de oxigênio e nutrientes no ambiente desta forma de vida microbiana que resulta em células metabolicamente ativas nas camadas superficiais, e células anaeróbias ou menos ativas nas camadas inferiores (GUPTA; LASKAR; KADOURI, 2016; SINGH et al., 2017). Muitos antibacterianos possuem seus mecanismos de ação dependentes do crescimento da bactéria, ou seja, apresentam efeito contra células que vivem em estágio metabólico ativo, uma vez que inibem processos sintéticos de proteínas (e.g., aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, lincomicina, clindamicina, macrolídeos), parede celular (e.g., betalactâmicos) e ácidos nucleicos, como o DNA (e.g., quinolonas) e RNA (e.g., rifampicina, rifamicina) (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). Desta forma, as células das camadas mais profundas do biofilme são mais resistentes por pelo menos duas razões, a matriz dificulta o acesso do fármaco às células microbianas, mas estas também são menos sensíveis (apresentam taxa metabólica mais lenta) a muitos antimicrobianos, cujos mecanismos de ação dependem de processos sintéticos

(FLEMMING et al., 2016; GUPTA et al., 2016; GUPTA; LASKAR; KADOURI, 2016; SINGH et al., 2017).

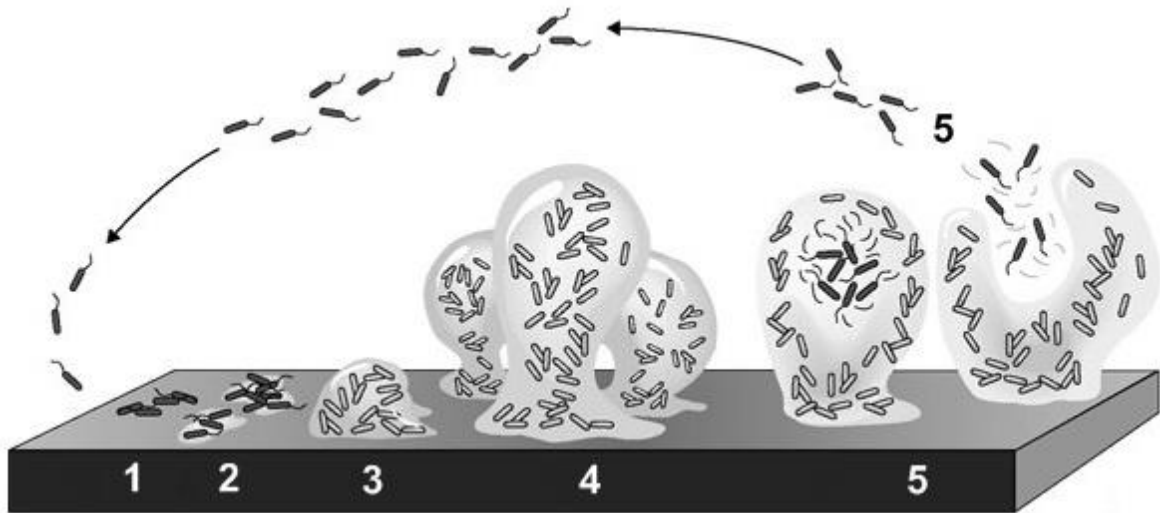
Os biofilmes são formas de vida que dependem de funcionamento de bombas de efluxo para secreção de componentes de matriz (EPS) e moléculas importantes para *quorum sensing*. Adicionalmente esses sistemas de efluxo expulsam moléculas nocivas, como antibióticos e metabólitos secundários, de dentro da célula para o ambiente externo (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018; SINGH et al., 2017). A superexpressão de bombas de efluxo é um dos fatores responsáveis pela multirresistência a antimicrobianos em biofilmes de *P. aeruginosa* (MORADALI; GHODS; REHM, 2017; SINGH et al., 2017).

Outro fator que colabora para biofilmes bacterianos serem altamente resistentes a antimicrobianos, é alteração e redução de porinas como consequência do estresse osmótico. Porinas não funcionais, alteradas ou em menor quantidade limitam o transporte de substâncias pela célula, tornando a bactéria menos permeável e menos susceptível a antimicrobianos (SINGH et al., 2017; STEWART; COSTERTON, 2001). Em *P. aeruginosa*, por exemplo, a perda de porinas OprD leva à resistência ao imipenem (CODJOE; DONKOR, 2017).

### 3.3.4 Biofilme: Etapas de Formação e Métodos de Estudo

A formação do biofilme se inicia com adesão reversível das células planctônicas à superfície. As bactérias se organizam numa monocamada, se unem irreversivelmente e começam a secretar EPS. Em decorrência dos processos de divisão e agregação celular, há formação de microcolônias e aparecimento de multicamadas. No estágio de maturação do biofilme, há intensa secreção de polissacarídeos e formação de estruturas características que parecem “cogumelo”, resultando no desenvolvimento de uma estrutura tridimensional, organizada e funcional que caracteriza o biofilme como comunidade. Finalmente, o biofilme atinge uma massa crítica, é quando algumas células começam a se destacar, assumem o estado planctônico e se dispersam para colonizar outras superfícies. Inicialmente, as bactérias se aproximam de uma superfície, o suficiente para reduzir a motilidade celular, e ocorre uma conexão reversível entre o microrganismo e a superfície (CHANDKI; BANTHIA; BANTHIA, 2011; FLEMMING; WUERTZ, 2019; OTTO, 2018; PAHARIK; HORSWILL, 2016; RASAMIRAVAKA et al., 2015). A figura 13 mostra as

principais etapas do ciclo de vida de biofilmes microbianos.



**Figura 13 – Esquema mostrando o ciclo de vida de biofilmes bacterianos.** No estágio 1, as células bacterianas se ligam reversivelmente à superfície. No estágio 2, as células se ligam irreversivelmente a essa superfície, um passo mediado principalmente por substâncias exopoliméricas, e perdem sua motilidade induzida por flagelos. No próximo estágio (3), é alcançada a primeira fase de maturação, na qual há desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. A segunda fase de maturação é alcançada no estágio 4, quando os biofilmes se tornam totalmente maduros, com arquitetura complexa. No estágio de dispersão (5), as células móveis (células escuras) se dispersam das microcolônias.

**Fonte:** adaptado de Sauer (2003).

O crescimento do biofilme é governado por vários processos físicos, químicos e biológicos. O processo de adesão é crucial para o estabelecimento do biofilme. A adesão reversível dos microrganismos à superfície é norteadada por forças físicas, como Força de van der Waals, ligações covalentes, interações estéricas e eletrostáticas, que dependem de características do substrato (e.g., textura, rugosidade e hidrofobicidade) e do fluido do ambiente (e.g., velocidade de fluxo, temperatura, pH, cátions, antimicrobianos). Além disso, as características dos microrganismos (e.g., fímbrias, adesinas, flagelo, EPS) influenciam no processo de ligação da célula ao substrato (DONLAN, 2002; FLEMMING et al., 2016; GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

As bactérias utilizam moléculas de sinalização para coordenar suas atividades em grupo, regulando diversos processos celulares, como expressão de fatores de virulência (e.g., toxinas, adesinas, flagelos, cápsulas, sideróforos, entre outros), bioluminescência, esporulação, e inclusive formação de biofilme. Esse mecanismo de comunicação é baseado na detecção de *quorum* (grupo), no qual bactérias usam moléculas sinalizadoras para detectar a densidade populacional de si

mesmas e de outras espécies microbianas (ABISADO et al., 2018; LEE; YOON, 2017; WILSON et al., 2011). As células liberam e detectam moléculas sinalização dentro de uma população, e o acúmulo de determinada molécula regula atividades específicas que envolvem uma comunidade de células microbianas, por conta disso, esse fenômeno da comunicação bacteriana é chamado de *quorum sensing* (ABISADO et al., 2018).

Os sistemas *quorum sensing* contam com pequenas moléculas de sinalização: lactonas-N-acil-homoserina para bactérias Gram-negativas, oligopeptídeos para bactérias Gram-positivas e autoindutor-2 (AI-2) para ambos grupos (MONNET; GARDAN, 2015; PAPENFORT; BASSLER, 2016; WILSON et al., 2011). Durante a formação de biofilme bacteriano, várias etapas são coordenadas via *quorum sensing*, como produção de glicocálice e matriz, a taxa de divisão celular bacteriana, formação de canais aquáticos, dispersão de células planctônicas e regulação de genes diversos na comunidade (KIEVIT; IGLEWSKI, 2009; PARSEK; GREENBERG, 2005). O *quorum sensing* é alvo de investigação em estudo que buscam tratamentos para doenças infecciosas. Biofilmes mutantes em sistema *quorum sensing* apresentam menor estabilidade estrutural (são facilmente eliminados por desinfetantes), são mais sensíveis a antimicrobianos, apresentam adesão deficiente ou são biofilmes mais delgados (JIANG et al., 2019; TOMLIN et al., 2005).

Toda a complexidade estrutural e funcional dos biofilmes o tornam tão interessantes e de difícil compreensão, provavelmente esta é uma das razões porque testes clínicos de sensibilidade a antimicrobianos são padronizados para células planctônicas (JOHNJULIO et al., 2012). Os estudos de biofilme requerem a combinação de vários métodos de investigação (Tabela 04), pois cada metodologia tem suas vantagens e limitações, e fornece informações importantes sobre aspectos e fases específicos do crescimento de biofilme (AZEREDO et al., 2017; HANNIG et al., 2010). Os métodos podem ser diretos ou indiretos, os primeiros baseiam-se na observação direta do biofilme sobre a superfície, e nos outros faz-se a retirada dos microrganismos da superfície antes de mensurá-los e investigá-los. As técnicas mais simples são adequadas para triagem, tanto de fármacos com efeito antibiofilme como também de cepas formadoras de biofilme dentro de uma população (e.g., contagem de células viáveis ou métodos colorimétricos para detecção de biomassa total ou de atividade metabólica). Outras técnicas, mais elaboradas e onerosas, permitem o estudo detalhado estrutural e molecular do biofilme, bem como a investigação de

mecanismo de ação de fármacos com ação antibiofilme (e.g., microscopia eletrônica, microscopia de fluorescência, PCR em tempo real) (AZEREDO et al., 2017).

**Tabela 04** – Alguns métodos, materiais e modelos utilizados no estudo de biofilme microbiano

(continua)

<b>Método</b>	<b>Princípio</b>
Cristal violeta ou safranina	São corantes básicos, que se ligam a moléculas do biofilme carregadas negativamente, e permitem a detecção quantitativa de sua biomassa total com auxílio de espectrofotômetro.
XTT ou MTT	Células microbianas viáveis reduzem os sais de tetrazólio (XTT ou MTT) a cristais de formazan que podem ser mensurados por espectrofotometria e indicar a atividade metabólica do biofilme.
Ensaio de ATP	Os níveis de ATP do biofilme são mensurados utilizando-se o sistema enzimático luciferina/luciferase e espectroscopia de fluorescência.
Contagem de colônias (UFC)	Detecção da viabilidade do biofilme com base em subcultivos de suas populações microbianas.
RT-PCR	Quantificação de fragmentos de DNA que estão sendo expressos (permite estudar o biofilme a nível molecular).
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Permite avaliar a topografia do biofilme, mostrando suas células, matriz extracelular e organização estrutural. Essa técnica permitiu a primeira descrição de biofilme.
Microscopia de fluorescência (CLSM)	Sondas moleculares fluorescentes são empregadas para diferenciar moléculas e estruturas específicas do biofilme, como componentes de matriz e a própria célula. As diferentes técnicas de fluorescência são de extrema importância no avanço dos estudos na área de biofilme.

**Tabela 04** – Alguns métodos, materiais e modelos utilizados no estudo de biofilme microbiano

Métodos	Princípio
Tecnologia de impedância (RTCA)	Permite o monitoramento da proliferação celular, tamanho, morfologia, adesão e migração das células, utilizando microeletrodos dispostos em microplacas. A técnica RTCA fornece continuamente os dados em intervalos curtos (minutos a horas) ou longos (dias a semanas), permitindo uma análise do biofilme em tempo real.
Placas de microtitulação	Utilizadas em ensaios de cristal violeta e MTT para <i>screening</i> de microrganismos formadores de biofilme ou compostos com atividade antibiofilme.
Dispositivo de biofilme de Calgary	Esse dispositivo é uma microplaca de 96 poços de fundo chato e com tampas adaptadas para formação de biofilme. Cada tampa contém 96 pinos ( <i>pegs</i> ) que se encaixam nos poços da microplaca e servem como superfície de adesão para o microrganismo.
Reatores de fluxo	São sistemas ligados a bomba peristáltica de fluxo, que permite o fluxo contínuo e controlado de nutrientes e resíduos pela câmara. É bastante útil para análise fisiológica de biofilmes em tempo real utilizando lamínulas para observação em microscópio.
Esferas de alginato	Comercialmente conhecidas como <i>alginate beads</i> , são utilizadas para estudo com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e são testáveis em modelos em animais. É possível imobilizar as bactérias nessas esferas e introduzi-las em ratos.

XTT: 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida.

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio.

ATP: Adenosina trifosfato.

UFC: Unidade formadora de colônia.

RT-PCR: Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase ou *reverse transcription-polymerase chain reaction*.

CLSM: Microscopia confocal de varredura à laser ou *confocal laser scanning microscopy*.

RTCA: Análise celular em tempo real ou *real time cell analysis*.

**Fonte:** Adaptado de Azeredo et al. (2017).

Biofilmes microbianos, apesar de sua complexidade, não devem ser negligenciados dentre os estudos que visam trazer soluções para a resistência aos antimicrobianos. É importante destacar que, assim como existe para célula planctônica, é necessário haver regulamentação e padronização para testar ação de antimicrobianos contra biofilme, isso permitirá conclusões mais confiáveis e representativas da realidade (AZEREDO et al., 2017; HANEY et al., 2018).

#### 3.4 ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

Atualmente e nas próximas décadas, a resistência bacteriana a antimicrobianos representa uma das maiores ameaças à saúde da humanidade. Combater esse problema é essencial para prevenir uma futura pandemia, por exemplo (O'NEILL, 2016). O risco é ainda maior em países com infraestrutura sanitária inadequada. Se uma criança que vive em situação de pobreza extrema, na Índia ou Bangladesh por exemplo, adoece devido a infecções bacterianas comuns, há mais de 50% de chance do tratamento com antimicrobianos falhar, mesmo considerando fármacos aos quais essas crianças nunca foram expostas clinicamente antes (LAXMINARAYAN; CHAUDHURY, 2016). De acordo com a OMS, melhorias no saneamento de água e no gerenciamento de águas residuais em todos os setores são elementos críticos para prevenir infecções e reduzir a propagação da resistência antimicrobiana (WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2020).

Genes de resistência a antimicrobianos estão se acumulando nos locais mais remotos, lugares que nem sequer possuem enfermarias, como os solos de Kongsfjorden (uma enseada na costa oeste de Spitsbergen, ilha esta, que faz parte do arquipélago Svalbard, no Oceano Ártico) (MCCANN et al., 2019). Evidências sugerem que além do uso excessivo desses agentes farmacológicos nos setores clínicos e veterinários, fatores ambientais, antropológicos e socioeconômicos contribuem para a resistência antimicrobiana global (COLLIGNON et al., 2018). Portanto, combater esse problema de saúde pública é uma tarefa que envolve um conjunto de medidas que colocam o uso consciente dos antimicrobianos como fator crucial.

O Programa *Antimicrobial Stewardship* vem trabalhando para

promover o uso mais consciente dos antimicrobianos em ambientes hospitalares. Mas é necessária uma abordagem holística, que é chamada de “Saúde Única” (*One Health*), com cooperação integrada entre ciência, engenharia, medicina, ação social e governança para reduzir a disseminação da resistência entre pessoas, outros animais e meio ambiente (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

É preciso tomar medidas em várias frentes, com estratégias para melhorar saneamento básico, adotar práticas de higiene, aumentar o acesso de pessoas à água potável, conscientizar a população (pois a automedicação favorece a resistência a antimicrobianos), promover o uso mais consciente de antimicrobianos na clínica humana, veterinária e produção animal (para proteger os fármacos que temos pelo uso racional), desenvolver métodos de diagnóstico rápido que auxiliem na prescrição de medicamentos mais específicos e se evite a terapia empírica, desenvolvimento de vacinas e outros fármacos antimicrobianos, investir financeiramente em setores de pesquisa, desenvolvimento de estratégias e assistência à saúde, entre outras ações (O’NEILL, 2016).

Como visto, biofilme é a forma microbiana prevalente na natureza, portanto as pesquisas envolvendo resistência a antimicrobianos não devem focar apenas em células planctônicas. Felizmente, atualmente existem centros de pesquisa específicos para estudo de biofilme, com objetivo de avaliar seus efeitos positivos, entender sua importância em doenças e inclusive achar tratamentos. A Universidade de Copenhague (UCPH, Dinamarca) e a Universidade do Sul da Austrália (*UniSA*, em Adelaide - Austrália) contam com o programa conhecido como *Biofilm Test Facility*, cujo objetivo é melhorar o tratamento e a prevenção de doenças associadas ao biofilme, fornecendo métodos de teste adequados à comunidade de pesquisa biomédica (UNIVERSITY OF COPENHAGEN, 2020; UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA, 2020). A UCPH, na Dinamarca, ainda conta com um centro de pesquisa interdisciplinar, o *Costerton Biofilm Center* (CBC), cujo objetivo é explorar o campo de infecções bacterianas crônicas que são um grande desafio à saúde e trazem grandes implicações econômicas e sociais globais (UNIVERSITY OF COPENHAGEN, 2020). O *National Biofilms Innovation Center* é um centro de pesquisa e inovação com objetivo de conectar cientistas especialistas em biofilme em todo o Reino Unido, facilitando o intercâmbio de problemas, soluções e ideias no setor de biofilmes (NATIONAL BIOFILMS INNOVATION CENTRE, 2020).

No combate à resistência microbiana, uma ação importantíssima é a

pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Segundo a OMS, é importante concentrar o investimento público e privado no desenvolvimento de tratamentos eficazes contra bactérias altamente resistentes, porque estamos ficando sem opções de medicamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). Novos antimicrobianos precisam ser desenvolvidos com objetivo de combater infecções com pouca ou nenhuma opção de tratamento, minimizar a seleção de cepas resistentes e encontrar substitutos antimicrobianos para aplicação na clínica veterinária e produção animal, especialmente para preservar opções terapêuticas aos seres humanos. Diante disso, para descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos, as pesquisas têm sido direcionadas para compostos de origem natural, nanotecnologia, combinações de compostos, entre outros.

### 3.5 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Civilizações antigas usavam uma variedade de produtos naturais para tratar doenças, incluindo as infecciosas. O registro farmacêutico mais antigo, conhecido por Papiro Ebers, escrito no Antigo Egito e datado de aproximadamente 1500 a.C., documenta cerca de 700 medicamentos (principalmente plantas) e inclui fórmulas, como gargarejos, infusões, pílulas e pomadas, com cerveja, leite, vinho e mel sendo comumente usados como veículos. Documentações antigas chinesas e indianas também reportam o uso de produtos naturais na medicina da época. Os gregos contribuíram substancialmente para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos; *Historia Plantarum* do filósofo e cientista natural Teofrasto é um dos principais livros que reporta as qualidades medicinais das ervas (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Os egípcios e outros povos antigos pressionavam pão embolorado contra feridas para tratar e prevenir infecções (GOULD, 2016; SIPOS et al., 2004). Nas prescrições egípcias para tratamento de feridas, fezes também eram aplicadas em combinação com outros materiais vegetais, animais ou minerais (SIPOS et al., 2004). Por suas propriedades antimicrobiana e cicatrizante, o mel também era empregado topicamente para o tratamento de ulcerações tópicas por egípcios, chineses, gregos e romanos (ZUMLA; LULAT, 1989). Muitas civilizações antigas e da Idade Média também usavam mirra e menta, assim como outros produtos vegetais, como antissépticos para feridas (HAJAR, 2012).

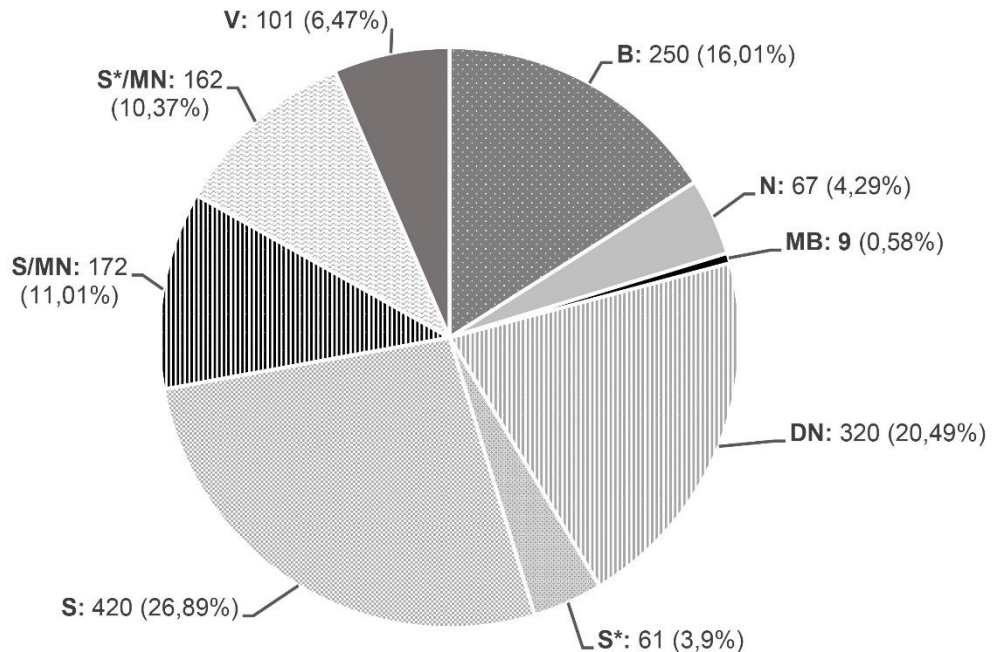
A natureza tem sido fonte de produtos medicinais há milhares de anos, e continua sendo investigada na busca de tratamento para diversas patologias (PISOSCHI et al., 2017). Os compostos naturais fornecem diversidade estrutural única em comparação à química combinatória padrão. Além do mais, apenas uma pequena parcela da biodiversidade de plantas, microrganismos, ambiente marinho e animais é conhecida, assim a natureza continua sendo uma fonte inesgotável de novos compostos bioativos (CRAGG; NEWMAN, 2005; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Entre 1981 e 2014, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou 1.562 medicamentos, sendo que 707 destes são produtos naturais inalterados, derivados de fontes biológicas ou são compostos sintéticos contendo farmacóforos naturais (Figura 14). Dentre esses medicamentos, 140 são antibacterianos, dos quais pelo menos 84 (60%) deles tinham origem biológica, total ou parcial (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Na busca de novos antimicrobianos, diversas áreas da natureza são investigadas, como fauna, flora, vida microbiana, tanto ambientes mais acessíveis como ambientes extremos e inóspitos para seres humanos. Como resultado dessa investigação, conhecem-se os peptídeos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) que representam um grupo de moléculas naturais encontradas em uma ampla variedade de formas de vida, desde microrganismos até seres humanos. AMPs, também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, são sequências curtas de aminoácidos geralmente carregadas positivamente (MAHLAPUU et al., 2016).

Diversos produtos e compostos de origem animal são avaliados quanto a suas propriedades antibióticas. O mel, cuja atividade antimicrobiana é relatada nos escritos científicos mais antigos, atualmente é estudado como alternativa para combater patógenos MDR (CLÉBIS et al., 2019; NISHIO et al., 2016a, 2016b).

O muco é um conjunto de polissacarídeos e proteínas que exibe uma gama diversificada de propriedades, de acordo com as necessidades específicas do organismo. A secreção cutânea de anfíbios possui substâncias farmacologicamente ativas, muitas delas com atividade antimicrobiana comprovada (GOVENDER et al., 2012; LI et al., 2019). Secreção de muco é muito difundida entre os invertebrados, fornecendo além de proteção mecânica e osmótica, a proteção contra predadores, já que pode conter moléculas de sabor amargo, venenosas ou irritantes; diversos invertebrados marinhos, tais como tunicados, quelicerados, crustáceos e moluscos, produzem substâncias que são estudadas na pesquisa de novos antibióticos,

principalmente os AMPs (BAKSHANI et al., 2018; OTERO-GONZALEZ et al., 2010; TINCU; TAYLOR, 2004).



**Figura 14 – Medicamentos aprovados pelo FDA, entre 1981 e 2014, classificados de acordo com a origem (natural ou sintético).** Os 1.562 medicamentos aprovados são distribuídos em nove categorias (B, N, MB, DN, S\*, S, S/MN, S\*/MN e V). O gráfico indica a porcentagem (em relação ao total) e o número de medicamentos aprovados por categoria. **B:** macromoléculas biológicas isoladas de organismo, linhagem celular ou produzidas por técnicas biotecnológicas. **N:** produto natural com estrutura inalterada. **MB:** medicamento botânico definido como mistura. **DN:** derivado de produto natural com modificação semissintética. **S\*:** medicamento sintético, mas contendo farmacóforos derivados de produtos naturais. **S:** medicamento totalmente sintético. **S\*/MN:** medicamento sintético que imita molécula natural, cujo mecanismo de ação pode ser via competição por substratos biológicos. **S\*/MN:** medicamento sintético que imita molécula natural e contém farmacóforo derivado de fontes naturais. **V:** vacinas.

**Fonte:** adaptado de Newman e Cragg (2016).

O fundo do mar é um local promissor para estudo de moléculas com propriedades medicinais. Muitos compostos derivados de invertebrados e macroalgas marinhos, bem como de microrganismos encontrados nas profundidades dos oceanos mostram atividade antimicrobiana (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016; TORTORELLA; TEDESCO; ESPOSITO, 2018).

Os seres microbianos produzem inúmeras substâncias que utilizamos no nosso cotidiano. Penicilina G e natamicina são exemplos clássicos de compostos com atividade antimicrobiana, produzidos por microrganismos, e utilizados, pelo homem, farmacologicamente ou em diferentes itens alimentares para evitar deterioração e contaminação por organismos patogênicos (THOMAS; DELVES-

BROUGHTON, 2001; VERMA et al., 2016). Os cogumelos, que são organismos utilizados há séculos, representam não só uma fonte de alimento, mas também de produtos medicinais. Volcão et al. (2019) reportaram a atividade antibacteriana de cogumelos do sul do Brasil, como *Auricularia auricula*, *Lactarius deliciosus* e outros, contra várias espécies bacterianas de importância clínica, como por exemplo *A. baumannii*.

Além dos animais e seres microbianos, a diversidade vegetal representa uma fonte riquíssima de bioativos com propriedades antibióticas. A lista de antimicrobianos derivados de plantas é vasta, incluindo compostos ativos contra patógenos MDR (SUBRAMANI, 2017).

### 3.5.1 Antimicrobianos Derivados de Plantas

Desde os tempos antigos, as plantas são utilizadas como conservantes ou intensificadores de sabores em alimentos. Também se destacam na medicina popular, já que uma diversidade de extratos vegetais são empregadas para fins profiláticos e terapêuticos no controle de doenças (Upadhyay et al., 2014).

Estima-se que haja 500.000 espécies de plantas terrestres (angiospermas, gimnospermas, samambaias, licófitas e briófitas), cuja diversidade é fortemente concentrada nos trópicos úmidos, mas a maior parte das espécies ainda é desconhecida pela ciência (CORLETT, 2016). Os vegetais produzem compostos estruturalmente únicos, diversificados e complexos, que representam uma fonte promissora para a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos e substâncias que visam combater patógenos MDR (SUBRAMANI, 2017).

Várias espécies vegetais apresentam a atividade antimicrobiana comprovada (Tabela 05). Entre 2005 e 2015, pelo menos 110 compostos bioativos purificados e 60 extratos de plantas, derivados de um total de 112 plantas estudadas, exibiram efeitos antimicrobianos significativos. Essas 112 plantas pertencem a 70 famílias diferentes, sendo 99% delas angiospermas. Dentre as 70 famílias, Apocynaceae, Lamiaceae e Asteraceae mostraram atividades antibacteriana, antituberculose e antimalárica; enquanto plantas de Acanthaceae, Lythraceae e Euphorbiaceae exibiram atividades antibacterianas e antituberculose. As famílias e Meliaceae exibiram efeito antibacteriano e atividade antimalárica; mas plantas pertencentes a Celastraceae, Rutaceae, Hypericaceae e Zingiberaceae mostraram

**Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada**

(continua)		
<b>Nome comum da planta</b>	<b>Nome científico da planta</b>	<b>Microrganismo <sup>1</sup></b>
Açafrão-da-terra	<i>Curcuma longa</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Protozoa
Açoro	<i>Acorus calamus</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> <sup>2</sup>	Geral
Alecrim-da-chapada	<i>Lippia gracillis</i> <sup>3</sup>	Bacteria, Fungi
Alecrim-pimenta	<i>Lippia sidoides</i> <sup>3</sup>	Bacteria, Fungi
Alfafa	<i>Medicago sativa</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva
Algaroba	<i>Prosopis juliflora</i> <sup>2</sup>	Geral
Alho	<i>Allium sativum</i> <sup>2</sup>	Geral
Arnica	<i>Arnica montana</i> <sup>2</sup>	Geral
Aroeira-vermelha	<i>Schinus terebinthifolius</i> <sup>2</sup>	Geral
Arruda-síria	<i>Peganum harmala</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Árvore-nagi	<i>Podocarpus nagi</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva
Ashwagandha	<i>Withania somniferum</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Aspérula-odorífera	<i>Galium odoratum</i> <sup>2</sup>	Geral
Avelós	<i>Euphorbia tirucalli</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva

Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada

(continuação)		
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismo <sup>1</sup>
Babosa	<i>Aloe barbadensis</i> , <i>Aloe vera</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva
Bardana	<i>Arctium lappa</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Bastardo-teca	<i>Butea monosperma</i> <sup>4</sup>	Gram-positiva
Batata-inglesa	<i>Solanum tuberosum</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Berberis	<i>Berberis vulgaris</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Protozoa
Bétele	<i>Piper betel</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Burrito	<i>Aloysia polystachya</i> <sup>3</sup>	Bacteria
Calamondina	<i>Citrus microcarpa</i> <sup>5</sup>	Bacteria
Camará	<i>Lantana camara</i> <sup>2,3,4</sup>	Geral
Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Caneleira-verdadeira	<i>Cinnamomum verum</i> <sup>2</sup>	Geral
Cânhamo	<i>Cannabis sativa</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Cascara-sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Cebola	<i>Allium cepa</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Chá-verde	<i>Camellia sinensis</i> <sup>2</sup>	Geral

**Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada**

			(continuação)
<b>Nome comum da planta</b>	<b>Nome científico da planta</b>	<b>Microrganismo <sup>1</sup></b>	
Chaparral	<i>Larrea tridentata</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva	
Chapéu-de-Napoleão	<i>Thevetia peruviana</i> <sup>2</sup>	Protozoa	
Cidra	<i>Citrus medica</i> <sup>5</sup>	Bacteria	
Coca	<i>Erythroxylum coca</i> <sup>2</sup>	Bacteria	
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi	
Cominho	<i>Carum carvi</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi	
Cravo-da-Índia	<i>Syzygium aromaticum</i> <sup>2</sup>	Geral	
Dente-de-leão	<i>Taraxacum officinale</i> <sup>2</sup>	Fungi	
Chaparral	<i>Larrea tridentata</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva	
Endro	<i>Anethum graveolens</i> <sup>2</sup>	Bacteria	
Equinácea	<i>Echinaceae angustifolia</i> <sup>2</sup>	Geral	
Erva (japonesa)	<i>Rabdosia trichocarpa</i> <sup>2</sup>	Gram-negativa	
Erva-cidreira	<i>Melissa officinalis</i> <sup>6</sup>	Bacteria, Fungi	
Erva-de-nossa-senhora	<i>Aloysia gratissima</i> <sup>3</sup>	Bacteria, Fungi	

**Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada**

			(continuação)
<b>Nome comum da planta</b>	<b>Nome científico da planta</b>	<b>Microrganismo <sup>1</sup></b>	
Erva-de-São-João	<i>Hypericum perforatum</i> <sup>2</sup>	Geral	
Erva-doce-asteca	<i>Phyla dulcis</i> <sup>3</sup>	Bacteria	
Erva-Luísa	<i>Aloysia triphylla</i> <sup>2,3</sup>	Bacteria, Fungi	
Estragão	<i>Artemisia dracuncululus</i> <sup>7</sup>	Bacteria	
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i> <sup>2</sup>	Bacteria	
Falsa-melissa	<i>Lippia alba</i> <sup>3</sup>	Bacteria, Fungi	
Feijão-fava	<i>Vicia faba</i> <sup>2</sup>	Bacteria	
Flor-de-palha-japonesa	<i>Achyranthes japonica</i> <sup>4</sup>	Gram-positiva	
Garupá	<i>Aloysia sellowii</i> <sup>3</sup>	Fungi	
Ginseng	<i>Panax notoginseng</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi	
Gloriosa	<i>Gloriosa superba</i> <sup>2</sup>	Geral	
Goji	<i>Lycium chinense</i> <sup>4</sup>	Gram-positiva	
Gotu-Kola	<i>Centella asiatica</i> <sup>8</sup>	Gram-positiva, Fungi	
Gualtéria	<i>Gaultheria procumbens</i> <sup>2</sup>	Geral	

Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada

(continuação)

Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismo <sup>1</sup>
Harmal	<i>Rhazya stricta</i> <sup>4</sup>	MRSA
Hena	<i>Lawsonia inermis</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva
Hidraste	<i>Hydrastis Canadensis</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i> <sup>2</sup>	Geral
Lantana-rasteira	<i>Lantana montevidensis</i> <sup>3</sup>	Bacteria
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> <sup>2,5</sup>	Bacteria, Fungi
Lima-comum	<i>Citrus aurantifolia</i> <sup>5</sup>	Bacteria
Limão	<i>Citrus limon</i> <sup>9</sup>	Bacteria
Limão-áspero	<i>Citrus jambhir</i> <sup>5</sup>	Bacteria
Loureiro	<i>Laurus nobilis</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Lúpulo	<i>Humulus lupulus</i> <sup>2</sup>	Geral
Maçã	<i>Malus domestica, Malus sylvestris</i> <sup>2,9</sup>	Geral
Mamão	<i>Carica papaya</i> <sup>2</sup>	Geral
Mamona	<i>Ricinus communis</i> <sup>2</sup>	Geral
Manjeriço-de-folha-larga	<i>Ocimum basilicum</i> <sup>2</sup>	Bacteria

Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada

		(continuação)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismo <sup>1</sup>
Margarida	<i>Calendula officinalis</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Marula	<i>Sclerocarya birrea</i> <sup>4</sup>	Gram-positiva
Melão-de-São-Caetano	<i>Momordica charantia</i> <sup>2</sup>	Geral
Mil-folhas	<i>Achillea millefolium</i> <sup>10</sup>	Bacteria, Fungi
Mirobalano-preto	<i>Terminalia chebula</i> <sup>4</sup>	Bacteria
Mirtilo	<i>Vaccinium spp.</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Mogno	<i>Swietenia mahagoni</i> <sup>4</sup>	Bacteria
Morango	<i>Fragaria ananassa</i> <sup>9</sup>	Bacteria
Moscadeira	<i>Myristica fragrans</i> <sup>2</sup>	Geral
Oliveira	<i>Olea europaea</i> <sup>2,4</sup>	Geral
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> <sup>11,12,13,14,15</sup>	Geral
Pau-lixia	<i>Aloysia virgata</i> <sup>3</sup>	Bacteria
Peiote	<i>Lophophora williamsii</i> <sup>2</sup>	Geral
Pimenta-da-Jamaica	<i>Pimenta dioica</i> <sup>2</sup>	Geral
Pimentão	<i>Capsicum annuum</i> <sup>2</sup>	Bacteria

Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada

		(continuação)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismo <sup>1</sup>
Pimenta-preta	<i>Piper nigrum</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Pinhão-roxo	<i>Jatropha gossyphiifolia</i> <sup>2</sup>	Geral
Pinho-comum	<i>Pinus elliottii</i> <sup>4</sup>	Gram-positiva
Quinino	<i>Cinchona</i> sp. <sup>2</sup>	Protozoa
Rábano-rústico	<i>Armoracia rusticana</i> <sup>2</sup>	Geral
Raiz-de-cobra-indiana	<i>Rauwolfia serpentine</i> <sup>2</sup>	Geral
Ranúnculo-bulboso	<i>Ranunculus bulbosus</i> <sup>2</sup>	Geral
Regaliz	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva, Protozoa
Romã	<i>Punica granatum</i> <sup>4</sup>	Gram-positiva
<i>Poleo</i>	<i>Lippia turbinata</i> <sup>3</sup>	Bacteria
Salva-do-marajó	<i>Lippia origanoides</i> <sup>3</sup>	Bacteria, Fungi
Sanfeno	<i>Onobrychis viciifolia</i> <sup>2</sup>	Bacteria
Santolina	<i>Santolina chamaecyparissus</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva, Fungi
Segurelha-das-montanhas	<i>Satureja montana</i> <sup>2</sup>	Geral
Sene	<i>Cassia angustifolia</i> <sup>2</sup>	Gram-positiva

**Tabela 05 – Plantas com atividade antimicrobiana comprovada**

		(conclusão)
Nome comum da planta	Nome científico da planta	Microrganismo <sup>1</sup>
Sete-cascas	<i>Hydrangea arborescens</i> <sup>2</sup>	Geral
Sumagre	<i>Rhus coriaria</i> <sup>4</sup>	Gram-negativa
Tangerina	<i>Citrus reticulata</i> <sup>5</sup>	Bacteria
Tomilho	<i>Thymus vulgari</i> <sup>2</sup>	Bacteria, Fungi
Toranja	<i>Citrus paradisi</i> <sup>2</sup>	Fungi
Turbicorina	<i>Rivea corymbosa</i> <sup>2</sup>	Geral
Tussilagem	<i>Tussilago farfara</i> <sup>2</sup>	Geral
Uva-do-Oregon	<i>Mahonia aquifolia</i> <sup>2</sup>	Geral
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i> <sup>2</sup>	Geral
Vinca	<i>Vinca minor</i> <sup>2</sup>	Geral

<sup>1</sup> Exemplos de alguns microrganismos sensíveis à planta correspondente.

“Bacteria” indica bactérias Gram-positiva e Gram-negativas.

“Fungi” indica fungos leveduriformes e/ou filamentosos.

“Geral” indica atividade contra microrganismos membros de três grupos (Bacteria, Fungi e Protozoa).

Referências: <sup>2</sup> Cowan (1999), <sup>3</sup> Zamora et al. (2018), <sup>4</sup> Subramani et al. (2017), <sup>5</sup> Afroja et al. (2017), <sup>6</sup> Mimica-Dukic et al. (2004), <sup>7</sup> Raeisi et al. (2012), <sup>8</sup> Idris et al. (2017), <sup>9</sup> Liya e Siddique (2018), <sup>10</sup> El-Kalamouni et al. (2017), <sup>11</sup> Scandorieiro et al. (2016), <sup>12</sup> Couto et al. (2015), <sup>13</sup> Cleff et al. (2010), <sup>14</sup> Kocić-Tanackov et al. (2012) e <sup>15</sup> Monzote et al. (2012).

**Fonte:** próprio autor (2020). O levantamento de dados foi realizado no período de 2016 a 2020.

atividades antituberculose e antimalárica (SUBRAMANI, 2017).

O Brasil possui umas das floras mais ricas do mundo, com 4.754 espécies de algas, 1.568 espécies de biófitas, 1.330 espécies de samambaias e licófitas, 30 espécies de gimnospermas e 33.099 espécies de angiospermas (BRAZIL FLORA GROUP, 2018; MORENO; COSTA-ISSA; RAJCA-FERREIRA, 2014). A ampla variedade climática e geomorfológica encontrada no país é responsável pela presença de diferentes biomas e ecossistemas (MORENO; COSTA-ISSA; RAJCA-FERREIRA, 2014). Diversas plantas brasileiras já tiveram atividade antimicrobiana relatada, desde espécies vegetais amazônicas (SUFFREDINI et al., 2006) e oriundas da Mata Atlântica (AGRIPINO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2012), que são biomas de riquíssima diversidade, até plantas do cerrado (VIOLANTE et al., 2012), Caatinga (ALMEIDA et al., 2012), Pantanal (BRIGHENTI et al., 2014) e Pampa (ÁVILA, 2018).

Plantas produzem uma variedade de metabólitos secundários (bioativos), como quinonas, terpenoides, alcaloides, taninos, flavonoides e outros polifenóis, como mecanismos de defesa contra a predação, por insetos e herbívoros, e infecção por microrganismos (PAGARE et al., 2016). Diversos bioativos vegetais com ação antimicrobiana vêm sendo identificados e utilizados em produtos do nosso cotidiano, como cosméticos, produtos de higiene pessoal e limpeza geral, e alimentos. O metileugenol (derivado do eugenol) é constituinte de mais de 350 espécies de planta, incluindo citronela, manjeriço e louro, e tem sido introduzido em geleias, assados, bebidas não alcoólicas, gomas de mascar, balas, pudins, condimentos, sorvete, perfumes, produtos de higiene pessoal e detergentes (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2013; TAN; NISHIDA, 2012). O eugenol, um dos principais componentes e responsáveis pela fragrância do cravo, tem sido amplamente utilizado na odontologia devido ao seu efeito antibacteriano (XU et al., 2013). Pelo menos 200.000 bioativos de plantas são conhecidos, e esse montante ainda representa apenas uma fração dos compostos produzidos pela espécies vegetais da Terra (SUBRAMANI, 2017).

Os mecanismos antibacterianos de diversos produtos derivados de plantas não são totalmente esclarecidos. Mas modos de ação vem sendo relatados, como rompimento da membrana celular bacteriana, aumento da suscetibilidade a antibióticos em bactérias resistentes, atenuação da virulência bacteriana (e.g., ação antibiofilme, interferência na produção de cápsula, redução na síntese de toxinas), entre outros (UPADHYAY et al., 2014). O modo de ação antimicrobiana é semelhante

entre as quinonas (interferência na adesão, inativação de enzimas e formação de complexos com a parede celular microbiana) e flavonóides (interferem na adesão e forma m complexos com a parede celular). Contudo, outros bioativos variam em seu modo de ação, tais como polifenóis e taninos (inibição enzimática, rompimento de membrana celular e complexação a íons metálicos), terpenoides (rompimento da membrana) e alcaloides (intercalam com a parede celular) (SUBRAMANI, 2017).

Os produtos com ação antimicrobiana são extraídos das mais variadas partes vegetais, tais como folhas, hastes, raízes, sementes, frutos, flores, cascas de frutos e troncos. Podem ser extratos parcialmente purificados ou brutos, ou ainda compostos bioativos purificados (MORENO; COSTA-ISSA; RAJCA-FERREIRA, 2014; SUBRAMANI, 2017). Dentre os derivados de planta, os óleos essenciais e seus principais componentes se destacam como alternativas para o combate de microrganismos resistentes. Devido à volatilidade, tais óleos apresentam uma vantagem em relação aos extratos de planta, pois em fase de vapor mostram ótima atividade antimicrobiana e permitem o tratamento de grandes áreas sem exigir contato direto com superfícies; isso os torna adequados para serem aplicados como desinfetante de ambientes e como descontaminantes do ar (LAIRD; PHILLIPS, 2011).

### 3.5.2 Óleos Essenciais de Plantas

#### 3.5.2.1 Óleos essenciais: obtenção e comércio

Os óleos essenciais são misturas lipofílicas, voláteis, odoríferas, incolores ou variando do amarelo pálido ao marrom. São comumente líquidos à temperatura ambiente, mas a densidade pode variar e alguns óleos serem até resinosos (RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020; SIMÕES et al., 2001).

Esses óleos são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas e podem participar da propagação de espécies vegetais, atraindo alguns insetos que promovem dispersão de pólenes e sementes, ou conferir proteção contra predadores, outros animais indesejáveis e infecções microbianas (NAZZARO et al., 2019; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020; SIMÕES et al., 2020).

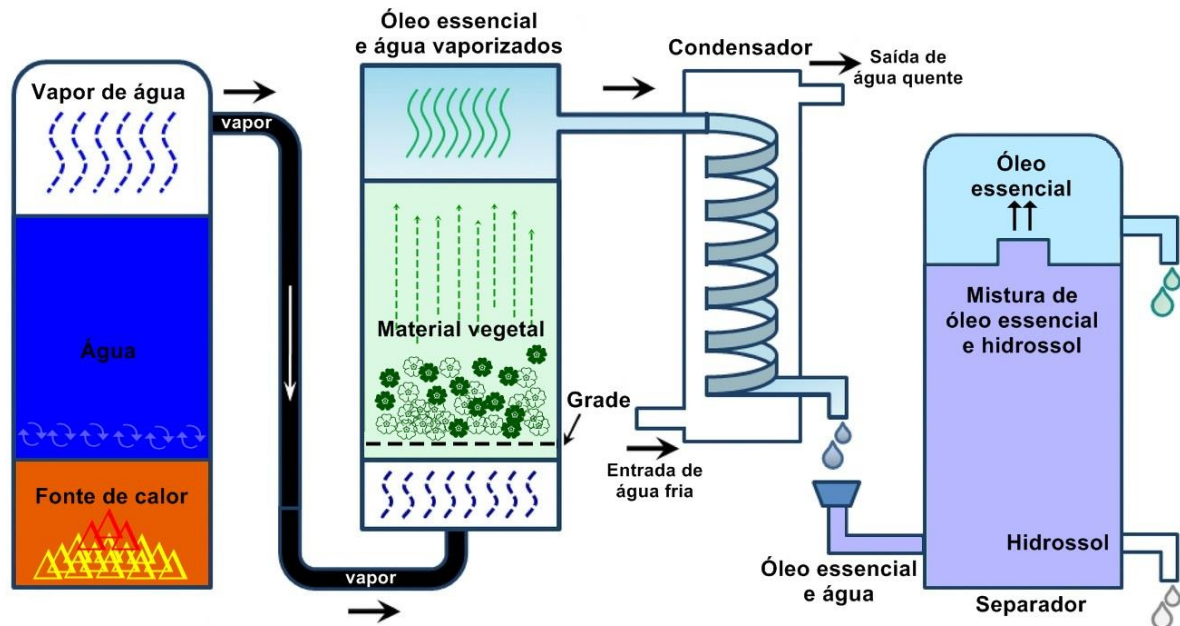
Suas propriedades antissépticas, antioxidantes e anestésicas são conhecidas desde a antiguidade (RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020). A antiga civilização egípcia extraia óleos essenciais por infusão de plantas aromáticas e

utilizava-os em massagens, perfumes e embalsamamentos (SIPOS et al., 2004). Mas apenas na década de 1950 foram feitas as primeiras análises e confirmações científicas dessas propriedades, quando Guenther e Boyle descreveram em detalhes a atividade “conservante natural” que alguns óleos essenciais derivados de especiarias e outras plantas apresentavam, bem como, os processos de extração dos mesmos (BOYLE, 1955; GUENTHER, 1948).

Diversos métodos são empregados para extração de óleos essenciais, entre eles destacam-se a destilação por arraste a vapor (Figura 15) e a hidrodestilação (Figura 16), técnicas já empregadas em tempos remotos (Figura 17) e que continuam sendo amplamente utilizadas. A Organização Internacional de Normalização (ISO, *International Organization for Standardization*) define óleo essencial como produto extraído de material vegetal, por hidrodestilação, destilação a vapor ou processo mecânico (prensagem de frutos), após separação da fase aquosa (ISO 9235:2013). Outras técnicas também são empregadas, como o CO<sub>2</sub> supercrítico e o uso de solventes orgânicos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; NAZZARO et al., 2019; SANTOS et al., 2004). A técnica de extração influencia na composição do óleo, uma vez que estes são susceptíveis à alterações advindas de oxidação, isomerização, polimerização e desidrogenação. Moléculas químicas que constituem os óleos essenciais são muitas vezes sensíveis à variação de temperatura, luz, disponibilidade de oxigênio e presença de impurezas (RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas partes da planta, já que são sintetizados por todos os órgãos vegetais aromáticos, tais como flores (e.g., óleo essencial de rosas), folhas (e.g., óleos de eucalipto, orégano, manjerona), cascas (e.g., canela), rizomas (e.g., gengibre) e frutos (e.g., laranja) entre outros (Tabela 06) (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020). Estão localizados e armazenados em células, cavidades ou canais secretórios, célula epidérmicas ou pêlos glandulares. A composição química dos óleos varia, dependendo do órgão de onde é extraído; por exemplo, óleos extraídos de sálvia (*Salvia officinalis*) possuem cânfora a 19,5% (folha) e 3,5% (flores), e  $\alpha$ -tujona a 30% (folhas) e 18% (flores), em diferentes órgãos vegetais (RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020). Além disso, para uma mesma espécie de planta, o rendimento e a composição química do óleo essencial são muito variáveis, pois estão sob a influência de vários parâmetros, como crescimento e condições de desenvolvimento da planta, local de origem, condições climáticas (e.g., temperatura, precipitação,

umidade, intensidade da luz), local de cultura (e.g., composição do solo, acidez, poluição, disponibilidade de mineral), tempo de colheita e colonização radicular por microrganismos simbióticos (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020).

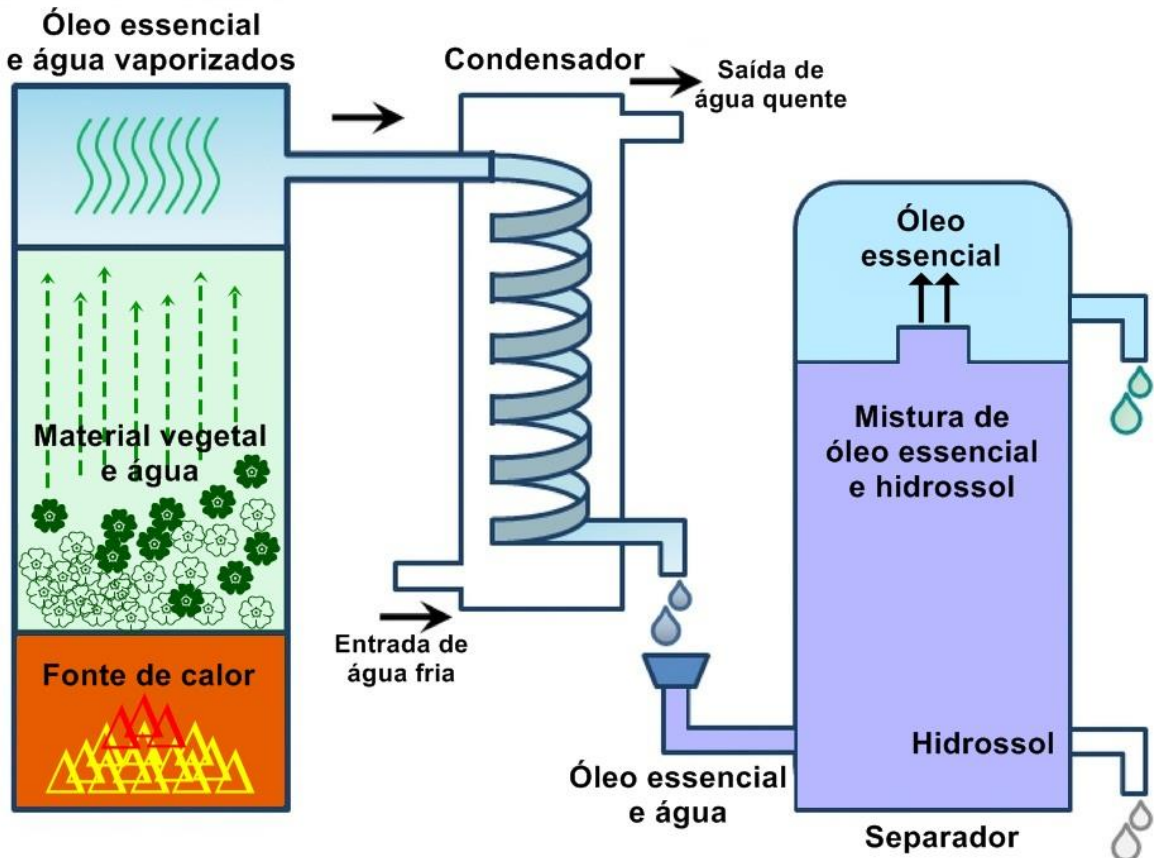


**Figura 15 – Ilustração do método de destilação por arraste a vapor para extração de óleos essenciais.** É uma das técnicas mais comuns para extração de óleo essencial de folhas vegetais, como por exemplo o óleo de *Origanum vulgare* (orégano). Envolve um sistema composto por fonte geradora de calor, recipiente que comporta a água que será aquecida, recipiente para comportar o material vegetal do qual o óleo será extraído, condensador, vaso separador e coletor. Durante a destilação por arraste a vapor, o material vegetal (folhas de orégano, por exemplo) não fica em contato direto com a água. As partes da planta ficam sobre uma placa perfurada no interior de uma dorna, e entram em contato apenas com vapor de água. A alta temperatura rompe as células vegetais e consequentemente o óleo essencial é liberado. O óleo volatilizado e o vapor de água vão para o condensador, onde são resfriados. A mistura condensada de água e óleo flui para o vaso separador (ou decantador) que permite a separação do óleo pela diferença de densidade, o óleo (menos denso que a água) é coletado na parte superior do vaso e a água é recolhida na parte inferior.

**Fonte:** adaptado de Tongnuanchan e Benjakul (2014).

Atualmente, mais de 3.000 óleos essenciais são identificados e conhecidos (NAZZARO et al., 2019). Constituem uma fonte importante de compostos biologicamente ativos, com ação antibacteriana (TARIQ et al., 2019; PUŠKÁROVÁ et al., 2017), antifúngica (TARIQ et al., 2019; PUŠKÁROVÁ et al., 2017), antiviral (TARIQ et al., 2019; DA SILVA et al., 2020), nematocida (ANDRÉS et al., 2012), antiprotozoária (MONZOTE; ALARCÓN; SETZER, 2012), inseticida (AHL; HIKAL; TKACHENKO, 2017), herbicida (TWORKOSKI, 2002), antioxidante e anti-inflamatória (MIGUEL, 2010). Mais de 300 deles são comercializados e freqüentemente utilizados em cosméticos, produtos de higiene pessoal, aromaterapia e como flavorizantes nas

indústrias de alimentos (GRAND VIEW RESEARCH, 2020; NAZZARO et al., 2019; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020).



**Figura 16 – Ilustração do método de hidrodestilação para extração de óleos essenciais.** Essa técnica envolve um sistema composto por fonte geradora de calor, recipiente que comporta a água e o material vegetal que serão aquecidos, condensador, vaso separador e coletor. Durante a hidrodestilação, o material vegetal fica em contato direto com a água, o restante do processo acontece de forma similar ao método de destilação por arraste a vapor.

**Fonte:** adaptado de Tongnuanchan e Benjakul (2014).

A busca por cosméticos, alimentos e bebidas mais saudáveis, bem como, produzidos de maneira ecologicamente sustentável, tem despertado o interesse da população por ingredientes vegetais, como os óleos derivados de plantas (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). O mercado de óleos essenciais atende diversas áreas para inúmeras aplicações, tais como: medicina (produtos farmacêuticos e nutracêuticos), indústria de alimentos e bebidas (e.g., padaria, confeitaria, laticínios, refeições prontas ou "*food ready-to-eat*", bebidas, carnes, aves, frutos do mar, lanches ou "*snack*"), *spa*, setor estético e de higiene pessoal (e.g., aromaterapia, massagens com óleos, cosméticos, sabonete, shampoo, produtos de higiene bucal, perfumes, desodorantes) e setor de limpeza (desinfetante de cozinha, pisos, banheiro e para lavagem de tecidos) (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).



**Figura 17 – Antigas destilarias (em campo aberto) de flores de lavanda, no Sul da França.**  
Fonte: Guenther (1948).

**Tabela 06** – Principal parte vegetal utilizada para extração de alguns óleos essenciais conhecidos

<b>Parte da planta</b>	<b>Óleos essenciais</b>
Folhas	Manjeriçã, louro, canela, sálvia, eucalipto, capim-limã, citronela, melaleuca, hortelã, orégano, hortelã-pimenta, pinheiro, alecrim, tomilho, louro, cipreste
Sementes	Amêndoa, anis, cardamomo, cominho, cenoura, aipo, coentro, noz-moscada, salsa, erva-doce
Madeira	Madeira-de-cedro-do-atlas, madeira-de-cedro-do-Himalaia, cânfora, pau-rosa, sândalo, murta, madeira-de-guáico
Casca do caule	Cássia, canela, sassafrás, katrafay
Baga	Pimenta-da-Jamaica, zimbro
Resina	Incenso, mirra
Flores	Tansy-azul, camomila, sálvia, cravo, cominho, gerânio, jasmim, lavanda, manuka, manjerona, laranja, rosa
Casca do fruto	Bergamota, toranja, limã, laranja, tangerina, lima
Raiz	Gengibre, açafã, valeriana, vetiver, nardo, angélica
Fruto	Noz-moscada, pimenta-preta

**Fonte:** Tongnuanchan e Benjakul (2014).

Comercialmente, o óleo de laranja, cujo componente principal é o limoneno, se destaca, é o óleo com maior demanda no mercado norte americano. É utilizado no tratamento de acne, cicatrizes e estrias, além de possuir propriedades antissépticas que são aplicadas a diversos produtos. Mas a lista de óleos comercializados é vasta, alguns exemplos são hortelã-pimenta, melaleuca, lavanda, eucalipto, alecrim, canela, orégano, palma rosa, laranja, capim-limã, gerânio, limã, cravo, menta, jasmim, citronela, entre outros (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2019; GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

### 3.5.2.2 Óleos essenciais: composição e atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem compreender 20 a 60 (ou mais) substâncias diferentes na sua composição, nas mais variadas concentrações. Em muitos casos, até três componentes principais são

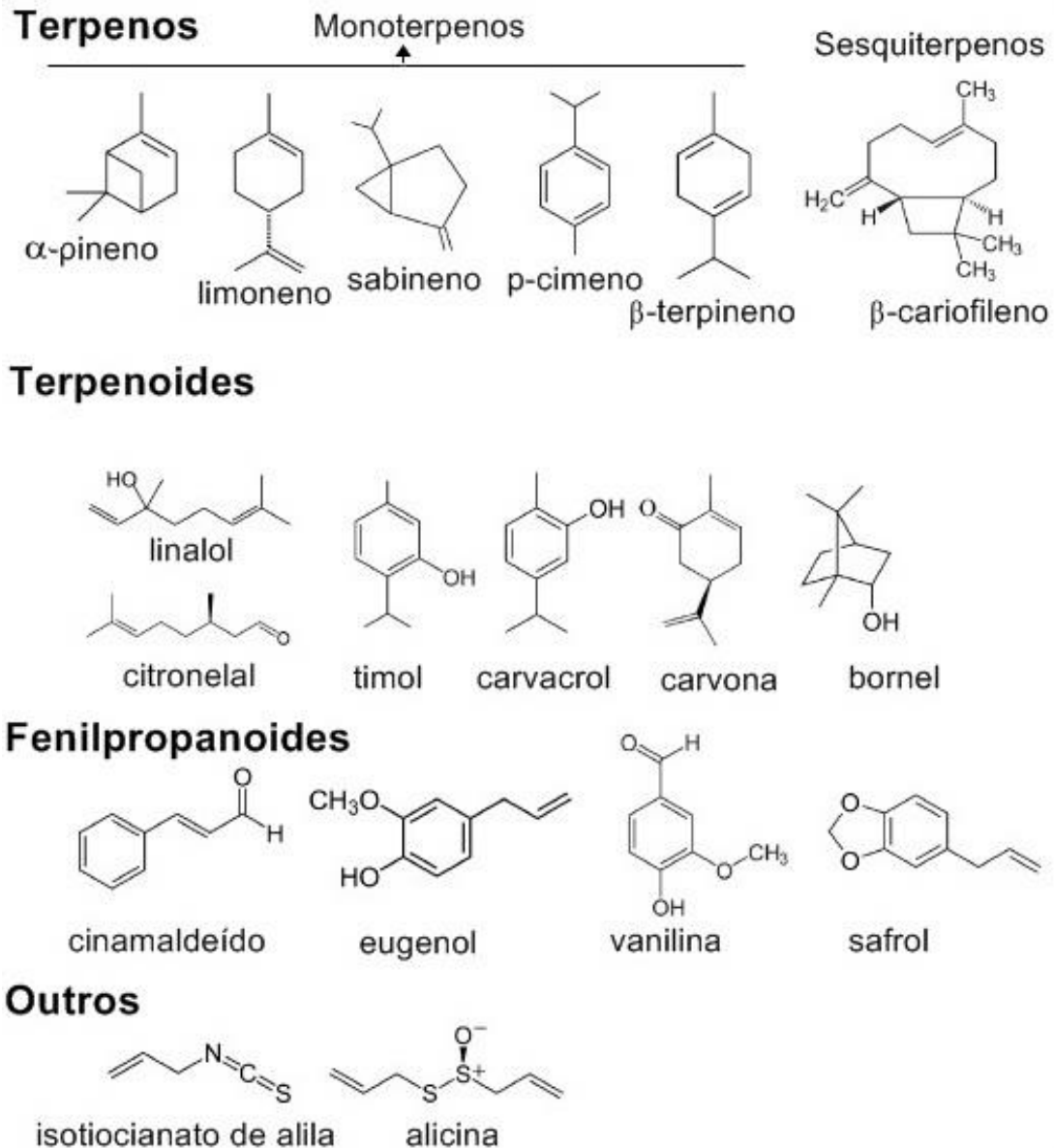
caracterizados em uma concentração relativamente alta, em comparação às outras substâncias minoritárias. Por exemplo, a hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) pode ser composta por até 59% de mentol e 19% de mentona (RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020).

Os componentes dos óleos essenciais podem ser divididos em dois grandes grupos: os terpenos e os compostos oxigenados. Os terpenos, constituídos por unidades de isopreno, representam a classe mais comum de compostos químicos encontrados nos óleos essenciais, principalmente os monoterpenos (C<sub>10</sub>) e sesquiterpenos (C<sub>15</sub>). Os diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) são encontrados em menor concentração. Terpenoides (terpenos contendo oxigênio) também são encontrados. Outros compostos oxigenados, que ocorrem menos que terpenos, compõem os óleos essenciais, como álcoois, fenóis, aldeídos, ésteres, peróxidos, cetonas e éteres (NAZZARO et al., 2013; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). A figura 18 mostra a estrutura química de alguns constituintes de óleos essenciais.

Os óleos essenciais podem ser classificados de acordo com o constituinte químico contido em maior concentração, por exemplo: (1) óleos essenciais com predominância de monoterpenos ou sesquiterpenos (e.g., limoneno em *Citrus* spp.; cariofileno em *Syzygium aromaticum*, o cravo-da-Índia), (2) óleos com prevalência de aldeídos (e.g., cinamaldeído em *Cinnamomum verum*, a caneleira-verdadeira; bezaldeído em *Prunus dulcis*, a amendoeira), (3) óleos contendo predominantemente alcoóis (e.g., geraniol em *Geranium* spp.; linalol em *Coriandrum sativum*, o coentro), (4) óleos com alto teor de cetonas (e.g., carvona em *Carum carvi*, o cominho; tujona em *Artemisia* spp., coníferas *Thuja* spp. e na sálvia-comum, *S. officinalis*), (5) com predominância de fenóis (e.g., eugenol em *Dianthus caryophyllus*, o craveiro, e *S. aromaticum*; carvacrol em *Satureja* spp. e outras Lamiaceae), (6) óleos com prevalência de compostos sulfurados (e.g., bissulfeto e dialil dissulfeto em *Allium* spp.), (7) teor prevalente de ésteres e alcóois (e.g., linalol e acetato de linalil em *Lavandula angustifolia*) e (8) predominância de peróxidos (e.g., ascaridol em *Chenopodium* spp.) (NAZZARO et al., 2019). A variação de composição entre os óleos permitem que os mesmos exibam diferentes atividade biológicas (Tabela 07).

Os seus principais componentes são frequentemente responsáveis pelas propriedades biológicas. Os terpenos (e.g., limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e outros) possuem atividade antimicrobiana moderada. Os terpenoides (e.g., carvacrol – CAR,

timol – Thy e mentol) e fenilpropanos (e.g., eugenol e cinamaldeído) possuem excelente ação contra diferentes microrganismos (NAZZARO et al., 2019; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020).



**Figura 18 – Estrutura química de alguns constituintes de óleos essenciais.**  
 Fonte: adaptado de Hyldgaard et al. (2012).

O aproveitamento do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais é promissor. Diversos estudos sugerem variadas aplicações para esses compostos aromáticos, como panificação, cosméticos, produtos de higiene pessoal e limpeza, fitoterápicos, entre outros (Tabela 08).

Considerando que um óleo essencial é uma mistura complexa, é bem provável que a ação antimicrobiana não se deve a um único mecanismo. Geralmente,

**Tabela 07** – Publicações relacionadas a diversas atividades biológicas exibidas por óleos essenciais

<b>Atividade</b>	<b>Número de publicações <sup>1</sup></b>
Antimicrobiana	2.671
Antioxidante	1.186
Anti-inflamatória	587
Analgésica	388
Anticancerígena	108
Sedativa	102
Espasmolítica	73
Cicatrização de feridas	44
Imunomoduladora	34
Antialérgica	22
Gastroprotetora	13
Antienvelhecimento	5
Antidepressiva	5
Alívio de dor	4

<sup>1</sup> Número baseado em pesquisa feita no PUBMED, em 2016, utilizando como palavras-chave o “nome da atividade” e “óleo essencial”.

**Fonte:** Sakkas e Papadopoulou (2017).

uma série de reações afetam a célula microbiana, já que os óleos contêm muitos grupos químicos que agem de maneiras diferentes. Seus efeitos contra os patógenos podem se dar devido a sinergismo entre seus principais componentes, mas também resulta de interações entre seus constituintes majoritários e minoritários (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; BURT, 2004; HYLDGAARD et al., 2012; NAZZARO et al., 2013, 2020). Por serem lipofílicos, podem interagir com os lipídeos e proteínas da membrana celular bacteriana, perturbando sua estrutura e funcionamento, principalmente sua permeabilidade (levando à perda de metabólitos e íons citoplasmáticos). Também podem causar redução da força próton-motriz, afetar o mecanismo de síntese de ATP, danificar a parede celular, interferir com mecanismos de *quorum sensing*, afetar formação de biofilme, entre outros (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013, 2020).

**Tabela 08** – Estudos mostrando diferentes aplicações de óleos essenciais ou seus bioativos como antimicrobianos

(continua)

<b>Óleo ou bioativo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Combinação de óleos essenciais	Bacteria	Enxaguante bucal comercial (LISTERINE®)	Alshehri et al. (2018)
<i>Lippia graveolens</i> (orégano-mexicano)	Bacteria	Filmes comestíveis, contendo óleo essencial, para embalar alimentos	Alvarez et al. (2014)
Timol <sup>1</sup>	<i>Eimeria labbeana</i>	Aditivo alimentar em ração de pombo eficaz contra coccidiose	Arafa et al. (2020)
Cinamaldeído e timol ( <i>blend</i> ) <sup>1</sup>	Bacteria e Fungi (modulou positivamente a microbiota do intestino e evitou a contaminação da ração)	Ração para animais monogástricos de produção	Bento et al. (2013)
<i>Thymbra capitata</i> (tomilho-de-Creta)	Gram-negativa	Sanitizantes contendo óleo essencial para superfícies de contato com alimentos	Falcó et al. (2018)
<i>Adenocalymma alliaceum</i> (cipó-alho)	Fungos filamentosos	Conservante de produtos de panificação	Gavahian et al. (2018)
<i>Anthemis nobilis</i> (camomila-romana)			
<i>Carum carvi</i> (cominho)			

**Tabela 08** – Estudos mostrando diferentes aplicações de óleos essenciais ou seus bioativos como antimicrobianos

(continuação)

<b>Óleo ou bioativo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (mastruz)	Fungos filamentosos	Conservante de produtos de panificação	Gavahian et al. (2018)
<i>Cinnamomum verum</i> (caneleira-verdadeira)			
<i>Cymbopogon nardus</i> (citronela)			
<i>Cymbopogon</i> spp. (capim-limão)			
<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto-comum)			
<i>Lavandula stoechas</i> (rosmaninho)			
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)			
<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-Índia)			
<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)			
<i>Origanum dubium</i> (orégano-lavanda)	Gram-positiva	Pastas dentais contendo óleos essenciais	Karadaglioglu et al. (2019)
<i>Cinnamomum cassia</i> (canela-chinesa)			

**Tabela 08 – Estudos mostrando diferentes aplicações de óleos essenciais ou seus bioativos como antimicrobianos (conclusão)**

Óleo ou bioativo	Microrganismo	Aplicação	Referência
Carvacrol e timol <sup>1</sup>	Bacteria, Fungi	Conservante para frango fresco marinado	Karam et al. (2019)
Carvacrol <sup>1</sup>	Bacteria	Nanopartículas carregadas com carvacrol para tratamento de feridas tópicas infectadas	Mir et al. (2020)
<i>O. vulgare</i> (orégano)	Bacteria	Formulação de desodorante	Suzuki et al. (2015)
<i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	Biofilme de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	Soluções sanitizantes contendo óleos essenciais	Valeriano et al. (2012)
<i>Mentha piperita</i> (hortelã-pimenta)			
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	Redução de placa dental (teste <i>in vivo</i> )	Pasta dental contendo o óleo essencial	Valones et al. (2019)
<i>T. vulgaris</i> (tomilho)	Bacteria	Sanitização de salada, testado com rúcula ( <i>Eruca sativa</i> )	Veloso et al. (2019)

“Bacteria” indica bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

“Fungi” indica fungos leveduriformes e filamentosos.

<sup>1</sup> Bioativo extraído de óleo essencial cuja planta não é informada.

**Fonte:** próprio autor (2020). O levantamento de dados foi realizado no período de 2016 a 2020.

No geral, os óleos essenciais e seus principais componentes apresentam amplo espectro de atividade antibacteriana (Tabela 09). Geralmente, bactérias Gram-negativas são menos sensíveis à ação dos óleos essenciais em comparação a Gram-positivas. A parede celular de Gram-negativas contém a membrana externa composta por porinas, proteínas que formam canais hidrofílicos e consequentemente limitam o acesso de óleos essenciais e seus componentes à célula. Desta forma, alguns óleos, como o derivado de sândalo (*Santalum album*), manuka (*Leptospermum scoparium*) e vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), podem agir contra algumas bactérias Gram-positivas, mas são ineficazes contra Gram-negativas (NAZZARO et al., 2019).

Plantas com sabor e aroma acentuados são utilizadas há séculos no preparo de alimentos para aromatizar e conferir sabor. Também há documentações científicas do século 19 relatando as propriedades antimicrobianas de especiarias, ervas e seus componentes (AL-WABEL; FATHI, 2012). Dentre essas plantas aromáticas que exibem atividade contra microrganismos, e são conhecidas mundialmente, estão as especiais indianas, como cravo, canela, erva-do-bispo, pimenta, rabanete, cominho, tamarindo, sementes de romã, noz-moscada, alho, cebola, cravo, tomilho, canela e o orégano. O óleo essencial de orégano e seus principais componentes estão entre os óleos com maior atividade antimicrobiana (BURT, 2004; BURT; REINDERS, 2003; CHAFTAR et al., 2016; NAZZARO et al., 2019), principalmente devido ao amplo espectro de ação que ocorre em baixas doses e de forma rápida (BARROS et al., 2009; SCANDORIEIRO et al., 2016; SIM et al., 2019; WIJESUNDARA; RUPASINGHE, 2018).

### 3.5.2.3 Óleo essencial de orégano e seus bioativos

Orégano é o nome popular de uma variedade de plantas que compartilham sabor e odor específicos. Pelo menos 61 espécies de 17 gêneros, de seis famílias botânicas diferentes (Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae), são conhecidas como orégano. Verbenaceae e Lamiaceae são as famílias mais notáveis devido à importância econômica, a primeira compreende espécies ornamentais utilizadas no paisagismo e a segunda contém plantas cujos derivados são utilizados na culinária, em cosméticos e medicinalmente (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017; PADULOSI, 1996; ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018).

**Tabela 09** – Atividade antibacteriana, indicada pela concentração inibitória mínima (CIM), de óleos essenciais obtidos de diversas plantas

(continua)

Óleo essencial		CIM (mg/mL)	
Nome científico	Nome popular	Gram-positiva	Gram-negativa
<i>Baccharis dracunculifolia</i> <sup>1</sup>	Alecrim-do-campo	0,5 – 12,65	1,06 – 12,65
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> <sup>2</sup>	Caneleira-verdadeira	0,5 – 4	2 – 8
<i>Citrus sinensis</i> <sup>3</sup>	Laranjeira	> 4,00	> 0,8 – > 4
<i>Cymbopogon citratus</i> <sup>3</sup>	Capim-limão	1 – 2	0,4 – > 4
<i>Eucalyptus citriodora</i> <sup>4</sup>	Eucalipto-cidró	>10	>10
<i>Eucalyptus globulus</i> <sup>5</sup>	Eucalipto-comum	15,75 – 20,58	20,58 – 31,25
<i>E. globulus</i> <sup>3</sup>	Eucalipto-comum	>4,50	> 0,9 – > 4,5
<i>Eugenia caryophyllata</i> <sup>3</sup>	Cravo	0,005	0,002 – 0,005
<i>Lippia graveolens</i> <sup>6</sup>	Oregano-mexicano	0,24	0,24
<i>Mentha piperita</i> <sup>3</sup>	Hortelã-pimenta	2,25 – > 4,5	> 0,9 – 4,5
<i>M. piperita citrata</i> <sup>7</sup>	Hortelã-bergamota	1,6	1,6
<i>Mentha spicata</i> <sup>7</sup>	Hortelã-verde	0,8 – 6,4	0,8 – 1,6
<i>Myrtus communis</i> <sup>7</sup>	Murta-comum	3,2	6,4
<i>Nardostachys jatamansi</i> <sup>7</sup>	Espiganardo	0,5 – 6,4	NI

**Tabela 09** – Atividade antibacteriana, indicada pela concentração inibitória mínima (CIM), de óleos essenciais obtidos de diversas plantas

(continuação)

Óleo essencial		CIM (mg/mL)	
Nome científico	Nome popular	Gram-positiva	Gram-negativa
<i>Ocimum basilicum</i> <sup>8</sup>	Manjeriçãode-folha-larga	0,016	0,016 – 0,125
<i>O. basilicum</i> <sup>7</sup>	Manjeriçãode-folha-larga	1,6 – 6,4	3,2
<i>Ocimum canum</i> <sup>8</sup>	Alfavaca-do-campo	0,062	0,125 – 0,25
<i>Ocimum gratissimum</i> <sup>8</sup>	Manjeriçãocheroso	0,062	0,031 – 0,25
<i>Ocimum tenuiflorum</i> <sup>8</sup>	Manjeriçã ou tulsi	0,062	0,062 – 0,5
<i>Origanum majorana</i> <sup>7</sup>	Manjerona	0,4 – 0,8	0,4 – 0,8
<i>Origanum vulgare</i> <sup>7</sup>	Orégano	0,05 – 0,1	0,05 – 0,1
<i>O. vulgare</i> <sup>3</sup>	Orégano	1,13	0,12 – 0,3
<i>Pelargonium graveolens</i> <sup>7</sup>	Gerânio	0,2 – 1,6	0,8 – 3,2
<i>Picea abies</i> <sup>7</sup>	Abeto-falso	0,8 – 1,6	0,8 – 6,4
<i>Pimenta dioica</i> <sup>2</sup>	Pimenta-da-Jamaica	1 – 2,5	4 – 8
<i>Pinus mugo</i> <sup>7</sup>	Pinheiro-das-montanhas	1,6	NI
<i>Pinus sylvestris</i> <sup>7</sup>	Pinheiro-da-Escócia	0,4	NI
<i>Piper betle</i> <sup>2</sup>	Bétele	0,4 – 4	4 – 8

**Tabela 09** – Atividade antibacteriana, indicada pela concentração inibitória mínima (CIM), de óleos essenciais obtidos de diversas plantas

(conclusão)

Óleo essencial		CIM (mg/mL)	
Nome científico	Nome popular	Gram-positiva	Gram-negativa
<i>Piper nigrum</i> <sup>7</sup>	Pimenta-preta	0,1	NI
<i>Pogostemon cablin</i> <sup>7</sup>	Patchouli ou oriza	0,05 – 0,2	NI
<i>Psiadia argute</i> <sup>2</sup>	-	0,25 – 8	16
<i>Psiadia terebinthina</i> <sup>2</sup>	-	0,25 – 8	4 – 16
<i>Rosmarinus officinalis</i> <sup>5</sup>	Alecrim	<15,75 – 31,25	20,58 – 36,33
<i>R. officinalis</i> <sup>3</sup>	Alecrim	> 4,5	> 0,90 – > 4,5
<i>Ruta graveolens</i> <sup>3</sup>	Arruda	0,5 – 2	< 0,02 – > 4
<i>Salvia lavandulifolia</i> <sup>7</sup>	Sálvia-espanhola	0,8 – 6,4	6,4
<i>Salvia officinalis</i> <sup>7</sup>	Sálvia-comum	0,8	1,6
<i>Salvia sclarea</i> <sup>7</sup>	Sálvia-esclaréia	3,2	NI
<i>Santalum album</i> <sup>7</sup>	Sândalo	0,05	NI
<i>Syzygium aromaticum</i> <sup>7</sup>	Cravo-da-Índia	0,1 – 1,6	0,4 – 0,8
<i>Zingiber officinale</i> <sup>7</sup>	Gengibre	0,8	1,6

Referências: <sup>1</sup> Cazella et al. (2019); <sup>2</sup> Chouhan et al. (2017); <sup>3</sup> Chafar et al. (2016); <sup>4</sup> Luqman et al. (2008); <sup>5</sup> Mekonnen et al. (2016); <sup>6</sup> Alvarez et al. (2014); <sup>7</sup> Thielmann et al. (2019); <sup>8</sup> Saha et al. (2013). NI: Não informado.

**Fonte:** próprio autor (2020). O levantamento de dados foi realizado no período de 2016 a 2020.

Na família Verbenaceae, os gêneros *Lippia* e *Lantana* possuem espécies chamadas de orégano (e.g., *Lippia graveolens* – orégano mexicano, *Lantana glandulosissima* – orégano silvestre). Enquanto espécies de orégano pertencentes aos gêneros *Origanum* e *Hedeoma* fazem parte da família Lamiaceae (e.g., *Origanum onites* – orégano italiano, *Hedeoma patens* – orégano chiquito) (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017; 1996).

O gênero *Origanum* inclui várias espécies, com diversidade morfológica e química, e a maioria delas é nativa da região do Mediterrâneo (Tabela 10). Etimologicamente, o nome *Origanum* vem do grego e deriva das palavras “oros” (montanha) e “ganos” (brilho, beleza), uma vez que as plantas desse gênero crescem em altitudes de 400 a 1.800 m e lugares ensolarados (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017). São ervas perenes que crescem espontaneamente em solo calcário. Caracterizam-se pela presença de tricomas glandulares, cobrindo os órgãos aéreos, que secretam óleos essenciais com sabor e odor únicos (principalmente devido a seus principais componentes, como CAR, Thy e outros) (BOUYAHYA et al., 2016; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

Os membros do gênero *Origanum* são amplamente utilizados para aromatizar e dar sabor a alimentos e bebidas. E a espécie *Origanum vulgare* é um dos representantes mais notáveis, principalmente no aspecto comercial, sendo um dos principais ingredientes da gastronomia grega e italiana (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017). A figura 19 mostra a morfologia macroscópica do *O. vulgare* e a tabela 11 apresenta sua classificação taxonômica. *O. vulgare* é uma espécie nativa da região do Mediterrâneo, encontrada naturalmente em vários países da Europa, África e Ásia; mas foi introduzida nas Américas, principalmente em determinadas regiões dos EUA, Canadá, México e Venezuela (Figura 20).

O rendimento de óleo essencial a partir de *O. vulgare* varia de  $\leq 1$  a 8% (mL de óleo/100g de massa vegetal seca), e seus principais componentes são os isômeros fenólicos CAR e Thy (Figura 21), além de monoterpenos precursores p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno em uma proporção mais baixa (GOUNARIS, 2002; KOKKINI et al., 1997; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017). No entanto, a composição (conteúdo de CAR, Thy e outros constituintes) e o rendimento do óleo essencial variam entre *O. vulgare* de diferentes origens e diferentes subespécies, conforme pode ser observado na tabela 12. Geralmente essas variações dependem não só da subespécie e sua posição geográfica, mas também da época de colheita da planta, do método de

extração do óleo e da parte vegetal utilizada (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

**Tabela 10** – Distribuição geográfica nativa de espécies vegetais representantes do gênero *Origanum*

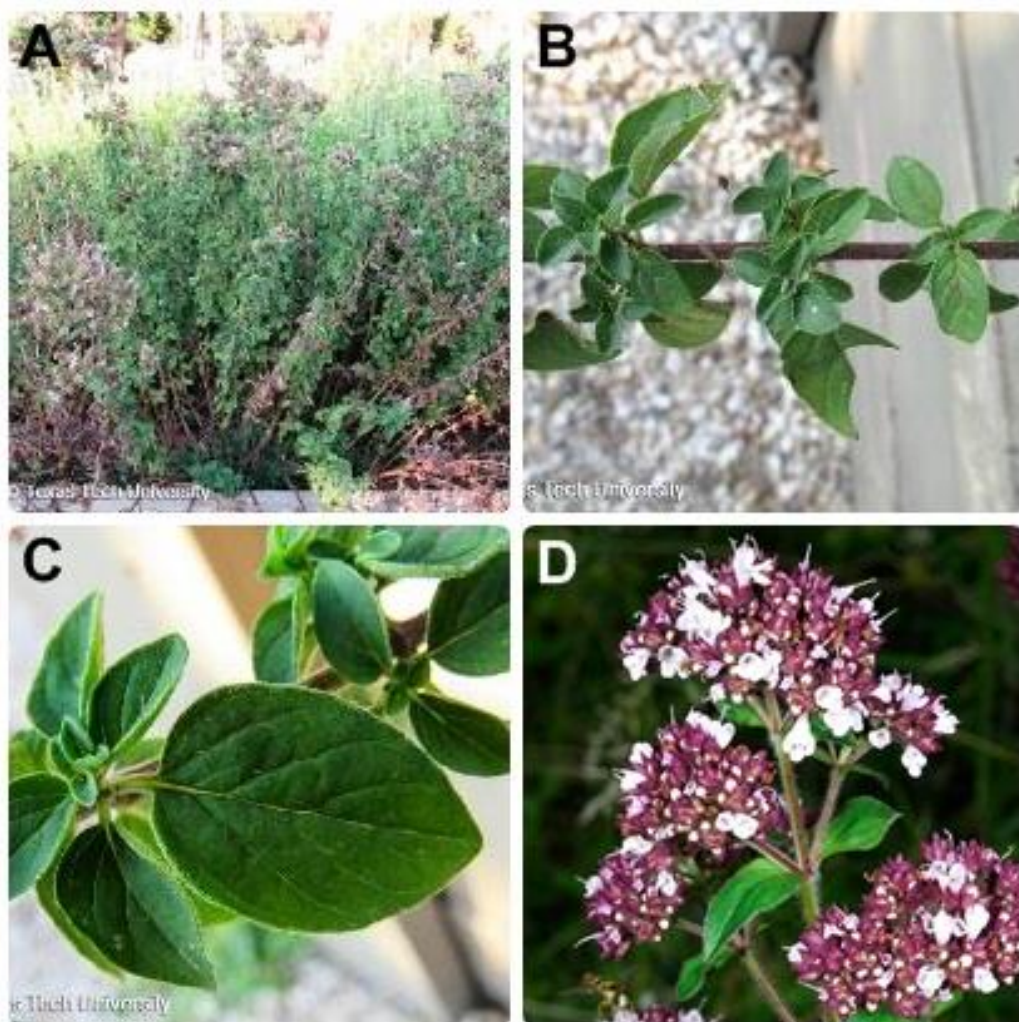
(continua)

<b>Espécie</b>	<b>Localização geográfica</b>
<i>Origanum scabrum</i>	Área centra e sul da Grécia
<i>Origanum heracleoticum</i>	Áreas montanhosas da ilha de Creta
<i>Origanum dictamnus</i>	Áreas montanhosas da ilha de Creta
<i>Origanum floribundum</i>	Argélia
<i>Origanum microphyllum</i>	Creta
<i>Origanum symes</i>	Grécia
<i>Origanum dayi</i>	Israel
<i>Origanum ramonense</i>	
<i>Origanum petraeum</i>	Jordânia
<i>Origanum punonense</i>	
<i>Origanum jordanicum</i>	
<i>Origanum libanoticum</i>	Líbano
<i>Origanum akhdareense</i>	Líbia
<i>Origanum cyrenaicum</i>	
<i>Origanum elongatum</i>	Marrocos
<i>Origanum grosii</i>	
<i>Origanum majorana</i>	Mediterrâneo Oriental e Ásia
<i>Origanum onites</i>	Sicília e Mediterrâneo Oriental
<i>Origanum bargyli</i>	Síria
<i>Origanum syriacum</i>	Sul da Europa, Ásia Ocidental e Mediterrâneo Oriental
<i>Origanum acutidens</i>	Turquia
<i>Origanum solymicum</i>	
<i>Origanum bilgeri</i>	
<i>Origanum minutiflorum</i>	
<i>Origanum boissieri</i>	
<i>Origanum saccatum</i>	
<i>Origanum hypericifolium</i>	

**Tabela 10** – Distribuição geográfica nativa de espécies vegetais representantes do gênero *Origanum*

Espécie	Localização geográfica
<i>Origanum brevidens</i> <i>Origanum haussknechtii</i> <i>Origanum leptocladum</i> <i>Origanum rotundifolium</i> <i>Origanum amanum</i> <i>Origanum micranthum</i>	Turquia
<i>Origanum vulgare vulgare</i> <i>O. vulgare glandulosum</i> <i>O. vulgare gracile</i>	Áreas montanhosas da ilha de Creta

Fonte: Sakkas e Papadopoulou (2017).



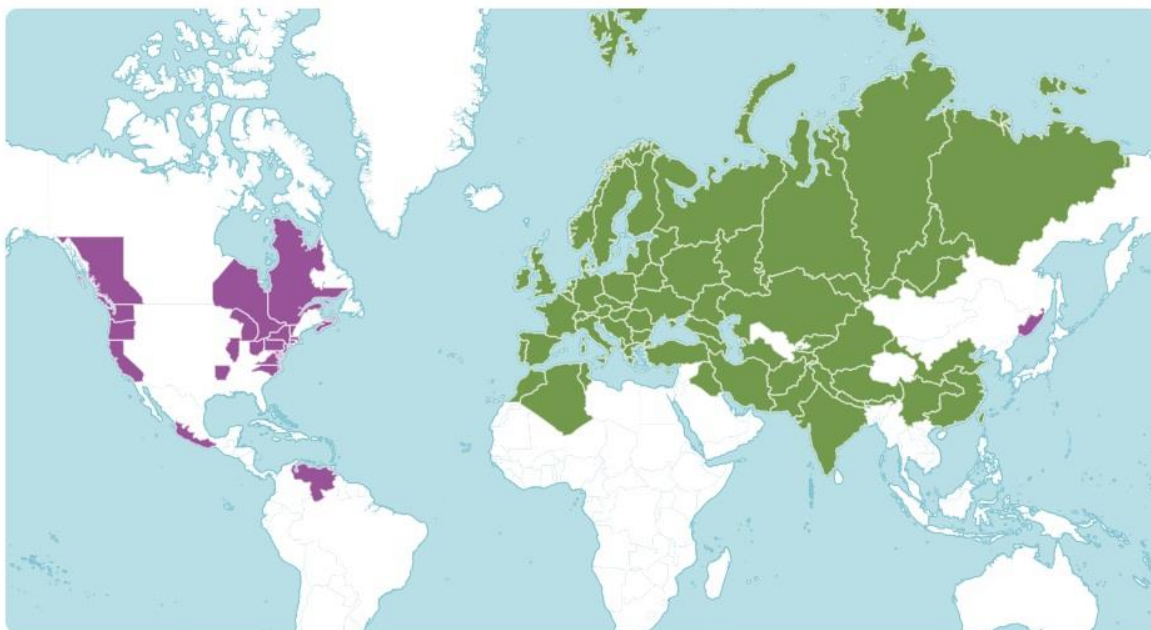
**Figura 19** – Morfologia macroscópica da planta *Origanum vulgare*, popularmente conhecida como orégano. **(A)** Planta com crescimento vertical e espalhado, cuja altura tem aproximadamente 30-60 cm e se espalha na mesma dimensão (imagem de Texas Tech University). **(B)** Haste do orégano (imagem de Texas Tech University). **(C)** Folhas pequenas e de coloração verde escura (imagem de Texas Tech University). **(D)** Flores brancas ou roxas (imagem de Wolfgang Stuppy).

Fonte: Texas Tech University e Royal Botanic Gardens-Kew (2020).

**Tabela 11** – Classificação taxonômica de *Origanum vulgare*

<b>Táxon ou Grupo</b>	<b>Nome científico ou comum</b>
Reino	Plantae (Plantas)
Sub-Reino	Tracheobionta (Plantas vasculares)
Super-Divisão	Spermatophyta (Plantas com sementes)
Divisão	Magnoliophyta (Plantas com flores)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledôneas)
Subclasse	Asteridae
Ordem	Lamiales
Família	Lamiaceae ou Labiatae
Gênero	<i>Origanum</i> L.
Espécie	<i>Origanum vulgare</i> (Orégano)

Fonte: USDA (2020).



**Figura 20** – Mapa de distribuição do *Origanum vulgare* pelo mundo. Os países onde *O. vulgare* é nativo estão representados em verde. Regiões onde a planta foi introduzida estão indicadas em roxo.

Fonte: Royal Botanic Gardens-Kew (2020).



**Tabela 12** – Composição e rendimento de óleos essenciais de *Origanum vulgare* de diferentes procedências

		(continua)
<b>Origem</b>	<b>Composição</b>	<b>Rendimento</b>
Argentina	p-cimeno (26,00%), $\gamma$ -terpineno (21,89%), terpinen-4-ol (16,29%), $\beta$ -cariofileno (8,25%)	NR
Argentina	carvacrol (26,70%), p-cimeno (15,20%), $\gamma$ -terpineno 15,10%), terpineno (7,50%)	NR
Argentina	$\gamma$ -terpineno (25,1%), terpinen-4-ol (16,7%), carvacrol (16,2%), $\alpha$ -terpineno (8,54%)	NR
Argentina	$\gamma$ -terpineno (32,1%), $\alpha$ -terpineno (15,1%), p-cimeno (8,0%), timol (8,0%)	NR
Argentina	carvacrol (81,92%), $\gamma$ -terpineno (4,49%), timol (3,5%), p-cimeno (3,07%)	NR
Brasil	carvacrol (73,9%), $\gamma$ -terpineno (3,6%), timol (3,0%), $\beta$ -cariofileno (2,8%)	NR
Chile	cis- $\beta$ -terpineol (16,49%), timol (13,26%), terpinen-4-ol (10,24%), $\alpha$ -terpineol (4,35%)	NR
China	carvacrol (30,73%), timol (18,81%), p-cimeno (10,88%), $\beta$ -cariofileno (8,21%),	NR
China	$\beta$ -citronelol (85,3%), acetato de citronelol (5,2%), $\beta$ -citronelal (1,2%)	0,7%
China	timol (42,9%), citronelol (12,2%), $\beta$ -cariofileno (7,8%), p-cimen-2-ol (7,5%)	0,3%
China	$\beta$ -citronelol (75,0%), geraniol (7,7%), acetato de citronelol (3,4%)	0,3%
China	1,8-cineol (20,8%), $\beta$ -cariofileno e (10,2%), éter metílico de eugenol (9,8%), citronelol (8,8%)	0,3%
China	óxido de cariofileno (32,9%), $\beta$ -cariofileno (17,7%), citronelol (10,2%), germacreno D (9,8%)	0,1%
Colômbia	timol (21,5%), p-cimeno (21,0%), $\gamma$ -terpineno (20,3%), $\alpha$ -terpineno (5,9%)	NR
Grécia	carvacrol (63,03%), timol (15,09%), p-cimeno (10,47%), $\gamma$ -terpineno (3,43%)	NR

**Tabela 12** – Composição e rendimento de óleos essenciais de *Origanum vulgare* de diferentes procedências

Origem	Composição	(conclusão) Rendimento
Índia	carvacrol (35,02–62,81%), p-cimeno (8,60–46,59%), $\gamma$ -terpineno (2,49–19,11%)	0,20–1,30%
Iran	carvacrol (29,85%), $\gamma$ -terpineno (20,94%), $\alpha$ -himachalene (12,17%), $\beta$ -pineno (11,67%)	0,80%
Iran	carvacrol (59,37%), $\gamma$ -terpineno (18,36%), cedrene (6,65%)	1,66%
Iran	carvacrol (58,51%), humuleno (11,46%), $\gamma$ -terpineno (9,56%)	0,93%
Iran	carvacrol (67,09%), $\gamma$ -terpineno (7,71%), humulene (7,67%)	1,36%
Itália	carvacrol (65,94%), p-cimeno (9,33%), $\gamma$ -terpineno (5,25%), $\beta$ -cariofileno (3,72%)	NR
Itália	carvacrol (71,8%), p-cimene (11,6%), $\beta$ -cariofileno (2,7%), linalol (1,8%)	NR
Marrocos	carvacrol (34,0%), $\gamma$ -terpineno (21,6%), p-cimeno (9,4%), timol (3,3%)	2,7%
Polônia	carvacrol (26,38–36,72%), timol (16,59–25,58%), $\gamma$ -terpineno (10,06–16,11%), p-cimeno (6,09–6,76%)	NR
Portugal	carvacrol (14,5%), $\beta$ -fenchol (12,8%), $\gamma$ -terpineno (11,6%), terpineol (7,5%)	NR
Sérvia	sabineno (10,2%), terpinen-4-ol (9,3%), 1,8-cineole (5,8%), $\gamma$ -terpineno (5,6%)	0,17%
Sérvia	carvacrol (64,5%), p-cimeno (10,9%), $\gamma$ -terpineno (10,8%), timol (3,5%)	1,5%
Espanha	terpinen-4-ol (24,57%), carvacrol (16,09%), timol (9,03%), $\gamma$ -terpineno (6,20%)	NR
EUA	carvacrol (17,9–81,8%), p-cimeno (2,62–25,7%), $\gamma$ -terpineno (2,5–19,4%), $\beta$ -mirceno (0,58–6,06%)	0,11–2,31%

NR: Não reportado. Rendimento em % indica mL de óleo obtido a cada 100 g de material vegetal seco.

Fonte: Leyva-López et al. (2017).

barreira para impedir o superaquecimento (KOKETSU; GONÇALVEZ, 1991; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

**Tabela 13** – Comparação da composição de óleos essenciais de *Origanum vulgare* extraídos de diferentes partes da planta (folhas/flores, haste e raiz), com número de compostos diferentes identificados e a porcentagem dos componentes majoritários indicados <sup>1</sup>

<b>Parte da planta (número de compostos diferentes)</b>	<b>Composição majoritária</b>
Folhas e flores (37)	carvacrol (30,73%) timol (18,81%) p-cimeno (10,88%) $\beta$ -cariofileno (7,73%) 3-carene (4,06%)
Hastes (11)	ácido palmítico (60,18%) ácido linoleico (14,25%) carvacrol (6,02%) timol (3,46%) ácido oleico (5,65%)
Raízes (29)	ácido palmítico (58,23%) ácido linoleico (12,11%) ácido linolênico (3,66%) carvacrol (3,27%) timol (1,08%)

<sup>1</sup> Resultados parciais do estudo intitulado “*Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano*” publicado em jornal científico.

Fonte: Han et al. (2017).

A atividade antibacteriana do OEO se deve principalmente aos seus compostos majoritários, CAR e Thy (KACHUR; SUNTRES, 2019; NAZZARO et al., 2019; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017). Mas não se pode anular a contribuição dos compostos minoritários para esta propriedade biológica, tais como álcoois monoterpênicos (e.g., linalol, 4-terpineol), hidrocarbonetos monoterpênicos (e.g., p-cimeno, terpinoleno, terpineno, pineno), sesquiterpenos (e.g.,  $\beta$ -cariofileno, germacreno, espatulenol), mirceno, limoneno, ácido rosmarínico e outros (CLEFF et al., 2008).

Dentre tantos óleos essenciais, o OEO se destaca devido à excelente atividade antibacteriana. Kozics et al. (2019) mostrou que óleos de *O. vulgare* e *Thymus vulgaris* (tomilho), que possuem CAR e Thy como componentes majoritários respectivamente, exibiram os menores valores de concentração inibitória mínima

(CIM) contra cepas MDR (*P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *K. pneumoniae* e *Citrobacter koseri*), em comparação a outros nove óleos essenciais. Chaftar et al. (2016) encontraram resultados similares, óleos de *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentaram baixo valor de CIM contra Bacteria e também espécies de Fungi, em comparação a outros 17 óleos essenciais. Outros estudos envolvendo dezenas de óleos essenciais também reportam que o OEO e óleo obtido de *T. vulgaris* exibem alta atividade antimicrobiana contra várias cepas MDR, tanto Gram-positivas e negativas, e de relevância patogênica como *E. coli* O157:H7 (BURT; REINDERS, 2003; MITH et al., 2014; SOKOVIĆ et al., 2007; VALERO; SALMERO, 2003). CAR e o Thy também se destacam em comparação a outros bioativos purificados de óleos essenciais. Yamazaki et al. (2004) mostraram que o CAR exibiu o maior efeito contra *L. monocytogenes*, seguido do Thy, eugenol, cinemaldeído e isoeugenol.

Tanto o OEO como seus principais bioativos apresentam potente atividade antibacteriana, atuando em baixas concentrações, muito rapidamente, com amplo espectro de ação e contra célula planctônica e na forma de biofilme (Tabela 14). A figura 22 mostra qualitativamente a atividade antibacteriana do OEO. No entanto, há variações sutis (especialmente de CIM e tempo de ação) entre resultados reportados por diferentes estudos, uma vez que diversos fatores influenciam os resultados microbiológicos, como a composição dos óleos (variável em decorrência de solo, clima, época de colheita da planta e métodos de extração dos óleos) e falta de padronização de técnicas utilizadas nos testes (e.g., diversificação de métodos, meios de cultura, cepas microbianas, etc).

OEO, CAR e Thy exibem atividade contra patógenos importantes na clínica humana e veterinária. Estudos mostram a potente ação desses terpenoides derivados do *O. vulgare* contra MRSA, *S. epidermidis* e bacilos Gram-negativos MDR (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* produtores de ESBL e carbapenemases), incluindo isolados hospitalares provenientes de urina, secreção respiratória, swab retal e pele, bem como cepas causadoras de infecções relacionadas a biofilme (ATKI et al., 2019; FOURNOMITI et al., 2015; KOZICS et al., 2019; LIU et al., 2017; MOHAMED et al., 2018; NOSTRO et al., 2004; REICHLING, 2020; SAGHI et al., 2015; SCANDORIEIRO et al., 2016; SI et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2019; WALSH et al., 2019; WIJESUNDARA; RUPASINGHE, 2018; YADAV et al., 2015). Sim et al. (2019) reportaram que OEO, CAR e Thy exibem atividades bactericida e fungicida contra microrganismos isolados de cães com otite

**Tabela 14** – Estudos sobre atividade antibacteriana de compostos derivados do *Origanum vulgare* (óleo essencial, carvacrol e timol), indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM), tempo de ação, espécies bacterianas testadas e forma de seu crescimento (célula planctônica ou biofilme)

(continua)

Bactérias <sup>1</sup>	Tipo de cultura	Compostos	CIM (mg/mL) Tempo	Referências
<i>Staphylococcus aureus</i>	CP	O	0,015 <sup>c</sup> (1 dia)	Xiao et al. (2020)
<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Malassezia pachydermatis</i>	CP	O	0,58 – 8,7	Ebani et al. (2020)
<i>Listeria monocytogenes</i>	*	O, T	0,007 <sup>c</sup>	Cho et al. (2020)
<i>Bacillus cereus</i> e <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	CP	O	625 – 1250 <sup>d</sup>	Airi (2020)
<i>S. aureus</i>	CP, BM	O, C, T	0,015 – 0,5 <sup>c</sup>	Reichling (2020)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CP, BM	C, T	2,5 – 3,9 <sup>a, e</sup> (> 6h) 1,95 – 15,6 <sup>b, e</sup>	Walsh et al. (2019)
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	CP	O, C, T	0,145 – 2,292 (0 – 1h)	Sim et al. (2019)

**Tabela 14** – Estudos sobre atividade antibacteriana de compostos derivados do *Origanum vulgare* (óleo essencial, carvacrol e timol), indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM), tempo de ação, espécies bacterianas testadas e forma de seu crescimento (célula planctônica ou biofilme)

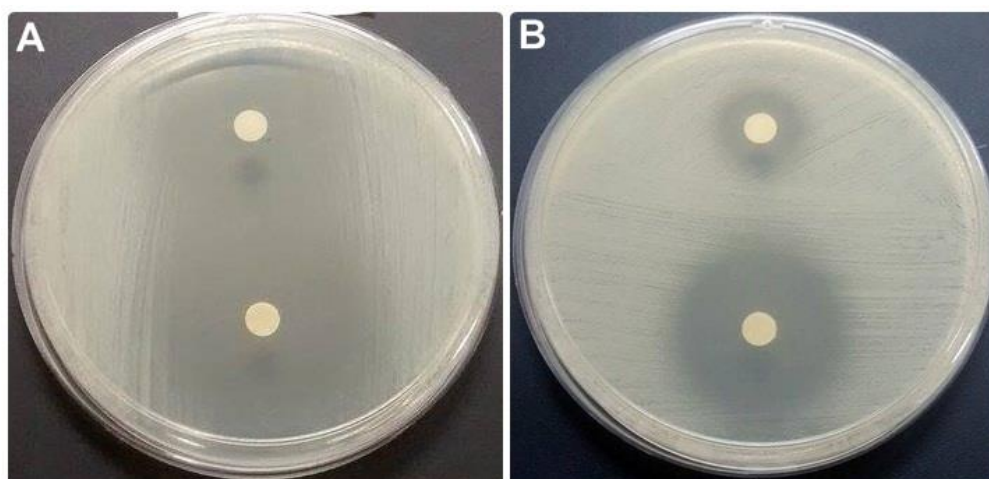
(continuação)				
Bactérias <sup>1</sup>	Tipo de cultura	Compostos	CIM (mg/mL) Tempo	Referências
<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Citrobacter koseri</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP	O	0,25 – 1,25	Kozics et al. (2019)
<i>S. Typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>S. aureus</i>	CP	T	0,12	Guimarães et al. (2019)
<i>Cronobacter</i> spp.	*	T	0,05	Berthold-Pluta et al. (2019)
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> e <i>Lactobacillus</i> spp.	CP	C, T	0,187 – 1,5	Du (2015)
<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i>	CP	T, C	0,351 – 1,406	Atki et al. (2019)
<i>K. pneumoniae</i> , <i>Serratia</i> <i>marcescens</i> e <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	CP	O	0,015 – 0,059 <sup>c</sup> (4 h)	Vasconcelos et al. (2019)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CR, BF, BM	O	$0,8 \times 10^{-5}$ – 0,5 <sup>f</sup> (5 min)	Wijesundara et al. (2018)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	CP, BM	C	0,312 – 1,25 <sup>c</sup> (6 h)	Trevisan et al. (2018)

**Tabela 14** – Estudos sobre atividade antibacteriana de compostos derivados do *Origanum vulgare* (óleo essencial, carvacrol e timol), indicando a faixa de concentração inibitória mínima (CIM), tempo de ação, espécies bacterianas testadas e forma de seu crescimento (célula planctônica ou biofilme)

Bactérias <sup>1</sup>	Tipo de cultura	Compostos	CIM (mg/mL) Tempo	Referências (conclusão)
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Streptococcus mutans</i> e <i>S. aureus</i>	CP	O	0,298 – 1,193	Scandorieiro et al. (2016)
<i>Streptococcus</i> spp.	CP	O, C	0,064 – 0,512	Magi et al. (2015)
<i>Salmonella</i> spp.	CP, BF, BM	T, C	0,156 – 0,624	Amaral et al. (2015)
<i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. aureus</i>	CP	O	0,05 – 0,1	Stojković et al. (2013)
<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	CP	T	0,030 – 4 <sup>g</sup>	Hamoud et al. (2014)
<i>E. coli</i>	CP	T, C	0,4	Pei et al. (2009)

CP – célula planctônica; BF – biofilme em formação; BM – biofilme maduro ou pré-formado; O – óleo essencial de *Origanum vulgare*; C – carvacrol; T – timol. <sup>a</sup> CIM contra célula planctônica e BF; <sup>b</sup> CIM contra BM, <sup>c</sup> % (v/v), <sup>d</sup> ppm, <sup>e</sup> mM. <sup>f</sup> CIM contra CP e biofilme é similar; <sup>g</sup> A variação nos valores de CIM reflete a diferença de susceptibilidade de diferentes cepas bacterianas. \* Cultivo em ágar solidificado. ▲ CIM não reportado. <sup>1</sup> bactérias de referência e isolados clínicos, incluindo MDR.

**Fonte:** próprio autor (2020). Levantamento de dados realizado no período de 2016 a 2020.



**Figura 22 – Atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) mostrada pela técnica de disco-difusão.** As imagens mostram o efeito do óleo, depositado em discos de papel, contra *Staphylococcus aureus*. Os discos da parte superior das placas contêm 5  $\mu$ L de óleo (0,45 mg) e os discos da parte inferior contêm 10  $\mu$ L (0,95 mg); a massa foi calculada com base na densidade do óleo (0,95 g/mL). Para bactérias Gram-positivas, o halo de inibição foi de aproximadamente 24,33 mm; para Gram-negativas, ficou em torno de 33 mm (imagem não mostrada). A técnica de disco-difusão não é a mais adequada para testes microbiológicos de óleos essenciais; mas neste caso, ela se torna interessante para mostrar qualitativamente a atividade antibacteriana do óleo de orégano **(A)** Os discos foram preparados no dia do ensaio microbiológico. **(B)** Os discos foram impregnados com óleo, porém armazenados por 15 dias (a 25°C, protegido da luz) antes do ensaio microbiológico. O óleo utilizado foi obtido comercialmente da empresa Ferquima, e seus componentes majoritários são: carvacrol (72%), timol (2%),  $\gamma$ -terpineno (4,5%), p-cimeno (4%) e linalol (4%)  
**Fonte:** próprio autor (2020).

externa. De acordo com Ebani et al. (2020), OEO apresenta uma das atividades antimicrobianas mais altas (em comparação a outros oito óleos) contra *Staphylococcus* spp. e *Malassezia pachydermatis* isolados de cães com dermatite. Du et al. (2015) reportou que a adição de Thy e CAR na dieta de frangos de corte, desafiados com *Clostridium perfringens* (agente causador de enteríte necrótica aviária), aliviou lesões intestinais nesses animais e pode contribuir no controle de infecção por *C. perfringens*.

OEO e seus bioativos também inibem o crescimento de bactérias que causam doenças veiculadas por alimentos. Cho et al. (2020) reportaram a atividade de óleo de *O. vulgare* e Thy contra isolados *L. monocytogenes* de diferentes alimentos (aipo, milho, cenoura e repolho) e de fezes de paciente acometido por surto relacionado a salada de repolho, sugerindo que esses terpenoides podem controlar a presença da bactéria na indústria alimentícia. OEO, CAR e Thy controlam o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* e *S. aureus*, inclusive com ação antibiofilme, prevenindo a formação e eliminando biofilme formado, que é um dos maiores desafios da indústria alimentícia (BARROS et al., 2009;

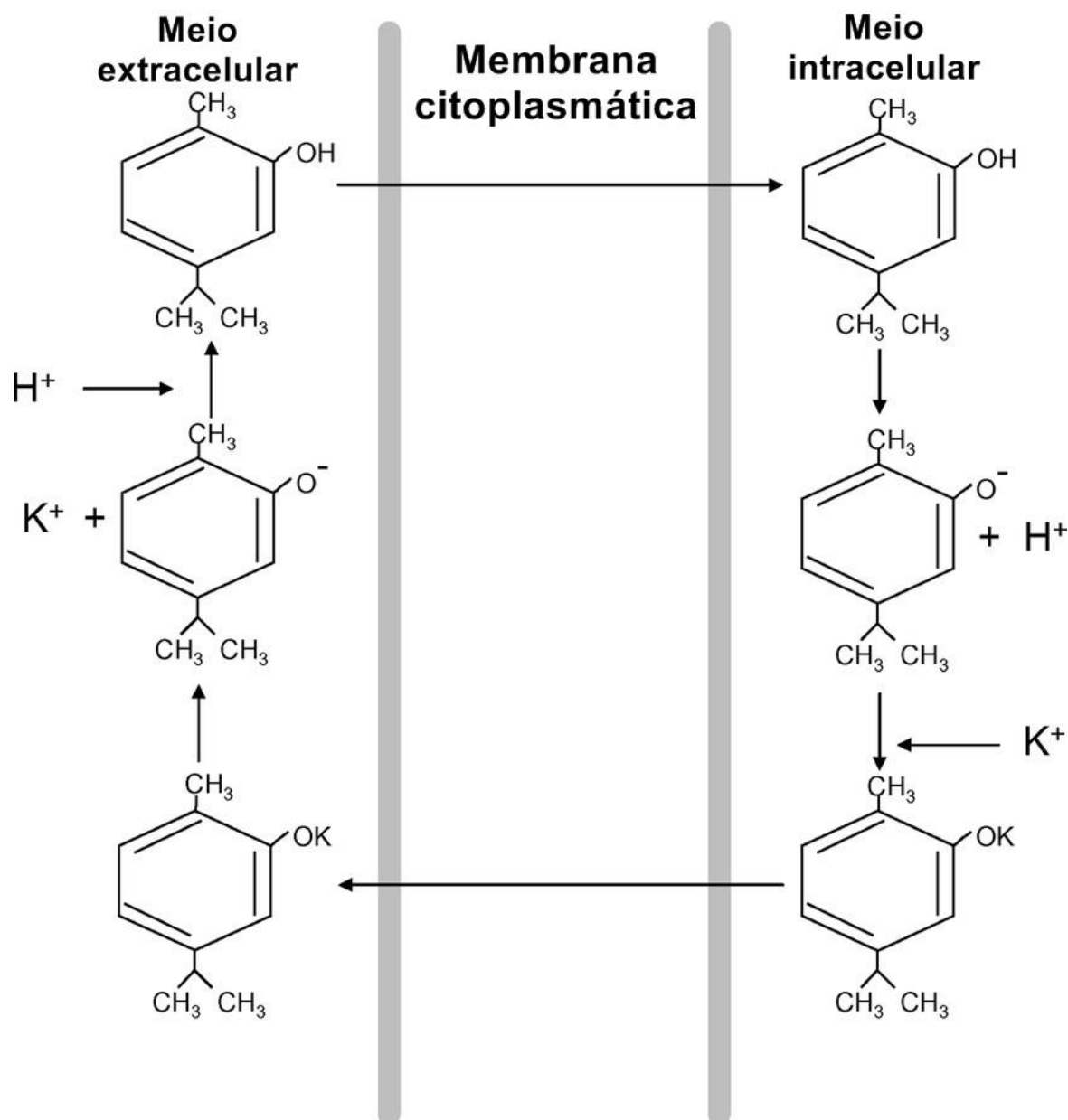
BERTHOLD et al., 2019; BETANCOURT et al., 2012; C et al., 2019; NOSTRO et al., 2009; TREVISAN et al., 2018).

Tanto o OEO, como seus bioativos purificados, são lipofílicos e portanto a membrana celular microbiana é o alvo principal do mecanismo de ação desses compostos. Ao interagirem com essa estrutura lipídica, alteram sua permeabilidade seletiva, que implica extravasamento de íons e outros constituintes celulares (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013). A partir do momento que a membrana celular é afetada, compromete-se a viabilidade bacteriana porque essa estrutura é responsável por muitas funções em procariotos (STRAHL; ERRINGTON, 2017). Análises estruturais, por microscopia eletrônica, mostram que os terpenóides de *O. vulgare* causam alterações morfológicas na bactéria que indicam dano à membrana, como formação de vesículas na superfície da célula ou superfícies afundadas (BURT; REINDERS, 2003; SCANDORIEIRO et al., 2016; SUZUKI et al., 2015).

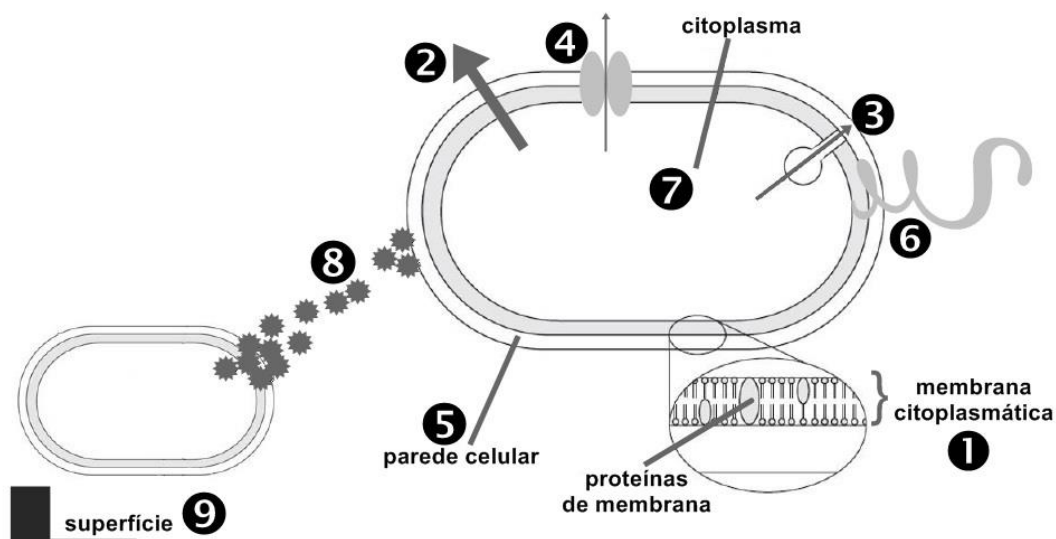
A presença do grupo hidroxila e um sistema de elétrons deslocalizados desempenha um papel importante na atividade antibacteriana do CAR e Thy. CAR (5-isopropil-2-metilfenol) e Thy (2-isopropil-5-metilfenol) são monoterpenoides (monoterpenos fenólicos), cuja estrutura química é caracterizada por anel fenólico único formado a partir da ligação de duas moléculas de isopreno com três grupos substituintes. Em ambas as estruturas (CAR e Thy), o grupo hidroxila está ligado ao carbono da posição 1 (C1); (i) mas no Thy, o grupo metil está ligado a C5 e o grupo isopropil está ligado a C2, (ii) e no CAR o grupo metil liga-se a C2 e o isopropil a C5 (Figura 22) (KACHUR; SUNTRES, 2019).

Estudos de nível molecular mostram que esses terpenoides se acumulam nas cadeias de ácidos graxos e causam alterações conformacionais da bicamada lipídica. O CAR e o Thy, por terem o grupo hidroxila e o sistema de elétrons deslocalizados (ligações duplas), podem agir como trocador de próton (Figura 23), reduzindo o gradiente eletroquímico através da membrana citoplasmática, e conseqüentemente resultam no colapso da força próton-motriz e depleção de ATP, culminando na morte celular. O equilíbrio de pH e íons intracelulares (potássio e fosfato) é afetado, pois os compostos interferem na permeabilidade seletiva da membrana, fazendo com que a célula bacteriana perca constituintes citoplasmáticos (CAILLET et al., 2009; KACHUR; SUNTRES, 2019; LAMBERT et al., 2001; NAZZARO et al., 2019; SUZUKI et al., 2015). Além de afetar as funções da membrana citoplasmática, previnem a formação de biofilme, inibem sistemas de *quorum sensing*

bacterianos, inibem bombas de efluxo e motilidade bacteriana, por afetarem a expressão de flagelinas ou interferirem na função do flagelo sem perturbar a montagem do filamento (KACHUR; SUNTRES, 2019; NAZZARO et al., 2019). A figura 24 mostra os principais mecanismos de ação do OEO, CAR e Thy.



**Figura 23 – Mecanismo hipotético de ação antibacteriana do carvacrol como trocador de próton.** O carvacrol não dissociado se difunde através da membrana citoplasmática em direção ao citoplasma e se dissocia, liberando seu próton. O carvacrol não associado retorna carregando um íon de potássio (ou outro íon) do citoplasma para o meio extracelular. O carvacrol libera esse íon no meio extracelular e recupera um hidrogênio adicional para fechar o ciclo.  
**Fonte:** adaptado de Ultee (2002).



**Figura 24 – Mecanismo antibacteriano do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano).** O óleo essencial de orégano, por ser lipofílico, interage com a membrana citoplasmática e causa alteração dos ácidos graxos e proteínas dessa estrutura (1), altera sua permeabilidade seletiva e conseqüentemente leva a bactéria a perder seus constituintes citoplasmáticos (2). Também altera a força próton-motora, já que pode agir como trocador de próton, reduzindo o gradiente eletroquímico necessário para formação de ATP e interferindo na ação de ATPases (3). Inibe bombas de efluxo (4), danifica a parede celular (5), afeta a motilidade bacteriana (6), causa coagulação de constituintes citoplasmáticos (7), interfere em sistema de *quorum sensing* e impede comunicação celular (8), e inibe formação de biofilme (9).

**Fonte:** adaptado de Burt (2004).

A atividade antibacteriana do OEO provavelmente não depende exclusivamente de seus constituintes principais, mas é resultado da interação entre seus compostos majoritários e minoritários. Os constituintes minoritários, que não apresentam ou apresentam pouca atividade antibacteriana, como monoterpenos de hidrocarbonetos ( $\alpha$ -pineno, canfeno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno e p-cimeno) podem atuar sinergicamente com CAR; o hidrocarboneto provavelmente facilita a entrada do CAR na célula (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; BURT, 2004; HYLDGAARD et al., 2012; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). Além disso, o óleo bruto pode exibir maior atividade antibacteriana do que seus componentes majoritários purificados (isolados ou combinados) (LAMBERT et al., 2001), além da combinação contendo CAR e Thy puros exibir atividade sinérgica ou aditiva (PEI et al., 2009; RIVAS et al., 2010; ZHOU et al., 2007). Outros estudos sugerem que os compostos minoritários interagem antagonicamente com bioativos majoritários; neste caso, os componentes principais, quando isolados exibem maior atividade antibacteriana do que o óleo bruto (HYLDGAARD et al., 2012; MAGI; MARINI; FACINELLI, 2015; RAO et al., 2010). A maneira como esses compostos interagem é variável, pois depende

da composição do óleo que pode mudar mediante vários fatores (GAVAHIAN et al., 2018; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017).

O OEO e seus componentes majoritários, quando diluídos, são considerados seguros para consumo humano, uma vez que fazem parte da lista de substâncias reconhecidas como GRAS (*generally recognized as safe*) pelo FDA portanto é permitido que sejam adicionados a alimentos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019). Também estão incluídos na lista europeia de compostos aromáticos permitidos como aditivos alimentares (EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR FEED ADDITIVES, 2019). O CAR e Thy são comumente adicionados a alimentos e bebidas para evitar que bactérias e fungos afetem a qualidade e segurança desses produtos. São encontrados em bebidas alcoólicas e não alcoólicas, assados, gomas de mascar, condimentos, laticínios congelados, pudim, doces, entre outros (KACHUR; SUNTRES, 2019). No Brasil, o CAR e Thy são aditivos aprovados pelo MAPA para uso na alimentação de animal de produção (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E MEIO AMBIENTE, 2020).

O CAR se mostrou eficaz como conservante de vários produtos alimentares, como arroz, suco de maçã, leite, uva, tomate e outros frutos (KACHUR; SUNTRES, 2019). O CAR e Thy, quando utilizados como suplemento alimentar, também melhoram a qualidade de carne de aves, inibindo a oxidação lipídica tecidual, que é um processo de deterioração que afeta a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (LUNA et al., 2010). As pesquisas continuam investigando a possibilidade de incorporá-los a vários produtos alimentícios ou a embalagens para impedir o crescimento de microrganismos e preservar produtos perecíveis (KACHUR; SUNTRES, 2019; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017).

Antibióticos à base de derivados de *O. vulgare* ainda não estão disponíveis comercialmente. Mas na prática odontológica, o Thy tem sido utilizado em enxaguantes bucais e selantes dentários; enquanto o CAR para tratamento de odontalgia, dentina sensível, abscesso alveolar e como antisséptico de canais pulpaes dos dentes (KACHUR; SUNTRES, 2019). Além disso, o óleo de orégano diluído é comercializado como fitoterápico para uso oral e o óleo puro para aromaterapia.

OEO, CAR e Thy exibem, além da atividade antibacteriana, outras propriedades biológicas, tais como antifúngica, antiviral, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatórias e antidiabética (GILLING et al., 2014; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017;

NÓBREGA et al., 2016). Apesar das inúmeras atividades medicinais que apresentam, os terpenoides derivados do *O. vulgare* possuem características organolépticas marcantes (intensos sabor e odor), podendo impactar sensorialmente produtos que os contenham. Portanto, são necessários estudos que visem minimizar esses efeitos sensoriais marcantes e ampliam as possibilidades de aplicação do OEO e seus componentes majoritários (GAVAHIAN et al., 2018; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

### 3.6 NANOTECNOLOGIA

A nanociência envolve estudos multidisciplinares sobre as propriedades dos materiais nas escalas atômica e molecular. O termo "nano" é derivado da palavra grega que significa “anão”, e assim como outros prefixos (e.g., centi, mili, micro, etc) especificam o fator pelo qual uma grandeza é multiplicada; e na escala nano esse fator corresponde a  $10^{-9}$ , ou seja, um nanômetro corresponde à bilionésima parte de um metro, ou milionésima parte do milímetro (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010; JEEVANANDAM et al., 2018; RAI et al., 2015). A nanotecnologia tem como objetivo criar materiais, por meio da manipulação e controle da matéria em nanoescala, para aplicações industriais, biomédicas e outras (JEEVANANDAM et al., 2018; RAI et al., 2015).

A natureza é uma das maiores fontes de inspiração para a nanotecnologia. Animais e plantas usam nanoestruturas para lidar com as dificuldades que enfrentam no meio ambiente. Por exemplo, as lagartixas conseguem andar em superfícies lisas e verticais porque possuem nanoestruturas nas patas, que permitem forte adesão às superfícies. As asas das borboletas apresentam gradientes de cor e os camaleões mudam sua coloração, ambos para escapar de predadores ou se camuflar em situações de sobrevivência; esses animais possuem estruturas nanométricas que interagem com a luz e geram esse interessante efeito visual. Os dentes humanos têm nanoestruturas, bem organizadas e com elevada resistência mecânica, que permitem mastigar alimentos sólidos e duros, como nozes e amendoim (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010; BHUSHAN, 2009). Apesar da nanociência ser recente, o “efeito nano” é encontrado amplamente na natureza, assim como inúmeras nanoestruturas importantes para funções vitais são encontradas no corpo humano, por exemplo a glicose (1 nm), DNA (2,2 a 2,6 nm),

proteínas (por volta de 3 a 6 nm), hemoglobina (6,5 nm), ribossomos (25 nm), enzimas e anticorpos (2–200 nm) (JEEVANANDAM et al., 2018).

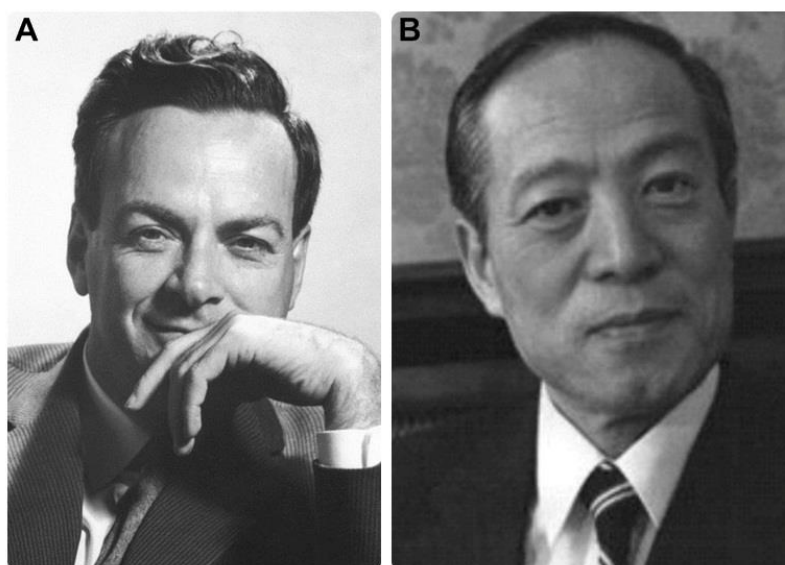
O termo “nanotecnologia” ainda não havia sido definido, e nem o mundo científico tinha conhecimento sobre as distintas propriedades da nanoescala, mas o homem já produzia estruturas nanométricas com base no entendimento empírico de artesãos e na prática de manipulação de materiais, muitas vezes fazendo uso de técnicas que envolviam altas temperaturas (INITIATIVE NATIONAL NANOTECHNOLOGY, [20--]). Há aproximadamente 1.600 anos foi fabricado o “Cálice de Licurgo” (Figura 25), uma obra de arte romana na forma de cálice que contém pequenas esculturas em vidro, que representam cenas da morte do rei Licurgo, da Trácia. Quando a luz é refletida pelo cálice, ele parece verde, mas quando a luz vem do seu interior (luz transmitida), ele parece vermelho e isso acontece por conta de partículas nanométricas de ouro e prata que compõem a obra (FREESTONE; MEEKS, 2007; INITIATIVE NATIONAL NANOTECHNOLOGY, [20--]). As espadas em aço de Damasco, fabricadas no oriente médio entre os séculos XIII e XVIII, continham nanoestruturas de carbono e cementita do tipo “fio” e “tubo” que lhes davam resistência, resiliência e arestas afiadas (INITIATIVE NATIONAL NANOTECHNOLOGY, [20--]). Antes da era da nanotecnologia, a indústria farmacêutica também já apresentava nanomateriais; em 1897, um produto chamado de “Collargol”, que continha nanopartículas de prata (AgNP) em sua composição, foi comercializado e usado para aplicações médicas (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).



**Figura 25 – O cálice de Licurgo. (A)** O cálice apresenta coloração verde quando a luz é refletida. **(B)** Mas apresenta coloração vermelha quando a luz é transmitida, ou seja, quando a luz vem do seu interior.

**Fonte:** adaptado de NNI [20--].

No entanto, o conceito de nanotecnologia é relativamente recente. Em 29 de dezembro de 1959, o físico americano Richard Phillips Feynman (Figura 26A) introduziu a ideia sobre essa tecnologia em uma conferência intitulada "*There's plenty of room at the bottom*" ("Há muito espaço lá em baixo"). Na ocasião, Feynman não usou o termo "nanotecnologia", mas falou sobre a possibilidade de manipular matéria na escala atômica e molecular (FEYNMAN, 1960; NUNES et al., 2018; RAI et al., 2015). A palavra "nanotecnologia" só surgiu em 1974, com o professor japonês Norio Taniguchi (Figura 26B) (NUNES et al., 2018; RAI et al., 2015).



**Figura 26 – Cientistas que contribuíram para o início do estabelecimento da nanotecnologia como ciência. (A) Richard Phillips Feynman (1918 – 1988). (B) Norio Taniguchi (1912 – 1999). Fonte: NobelPrize.org (2020) e Tarafdar e Adhikari (2012).**

O progresso da nanotecnologia como ciência só ocorreu após a invenção de microscópios aprimorados e outros equipamentos mais avançados. Essa ciência trabalha com estruturas muito pequenas, portanto, diversos equipamentos são necessários para visualizá-las, mensurá-las e caracterizá-las, e assim, permitir melhor conhecimento e aprimoramentos neste campo (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, [20 --]b; NUNES et al., 2018; RAI et al., 2015). A tabela 15 mostra alguns acontecimentos (linha de tempo) importantes na era moderna da nanotecnologia.

O interesse da ciência em estruturas nanométricas é por conta de estas exibirem propriedades singulares (Tabela 16), não encontradas em materiais macroscópicos, que podem trazer soluções para problemas da humanidade. A

nanoescala aumenta a área superficial do material e torna significativa a porcentagem de átomos na sua superfície (RAI et al., 2012). Portanto, reduzir o tamanho do material, sem alterar sua composição química, possibilita alteração de características como condutividade elétrica, elasticidade, resistência, cor, atividade antimicrobiana, entre outras (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010; GUAZZELLI; PEREZ, 2009; JEEVANANDAM et al., 2018; KOLAHALAM et al., 2019). Por exemplo, o carbono na forma de grafite é macio e maleável, mas nanocarbono é mais resistente e leve que o aço, como na espada de Damasco. O alumínio em nanoescala torna-se altamente inflamável, pode pegar fogo espontaneamente. O ouro que conhecemos no nosso cotidiano, incorporado em joias ou outras ornamentações, é amarelado ou dourado, mas o ouro nanométrico pode ser vermelho ou púrpura como no cálice de Licurgo, laranja ou até verde; e além da mudança de cor, apresentam diferentes pontos de fusão, o ouro nanoparticulado pode fundir a 300°C, bem abaixo da temperatura de fusão de placas de ouro (1.064°C) (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010; GUAZZELLI; PEREZ, 2009; SCHMID; CORAIN, 2003).

**Tabela 15** – Linha do tempo com alguns dos acontecimentos importantes na era moderna da nanotecnologia

(continua)

Ano	Acontecimento
1857	Descoberta do ouro vermelho (ouro nanométrico) por Michael Faraday
1936	Invenção do microscópio de emissão de campos, por Erwin Müller, permitindo obtenção de imagens com resoluções quase atômicas de diferentes materiais.
1951	Utilizando microscopia, foi possível obter imagens do arranjo de átomos na superfície de uma ponta afiada de metal.
1956	Arthur von Hippel, no MIT ( <i>Massachusetts Institute of Technology</i> ) introduziu o termo engenharia molecular ( <i>molecular engineering</i> ) e muitos conceitos relacionados.
1959	Richard Feynman ministrou a primeira palestra sobre tecnologia e engenharia em escala atômica em um encontro da Sociedade Americana de Física, na Caltech ( <i>California Institute of Technology</i> , nos EUA).

**Tabela 15** – Linha do tempo com alguns dos acontecimentos importantes na era moderna da nanotecnologia

(continuação)

Ano	Acontecimento
1974	O professor Norio Taniguchi, da Universidade de Ciências de Tóquio ( <i>Tokyo University of Science</i> ), cunhou o termo “nanotecnologia” para descrever a engenharia em escala submicrométrica.
1981	Invenção do microscópio de tunelamento, por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, em Zurique, que permitiu aos cientistas "observarem" (criarem imagens espaciais diretas) átomos individuais pela primeira vez.
1985	Descoberta de uma nova forma de carbono, chamada <i>Buckminsterfullerene</i> ou <i>Buckyball</i> , por pesquisadores da <i>Rice University</i> (Houston, Texas, EUA).
1986	Invenção do microscópio de força atômica, por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber, que permite visualizar, medir e manipular materiais até frações nanométricas, incluindo a medição de várias forças intrínsecas aos nanomateriais.
1989	Don Eigler e Erhard Schweizer, do Centro de Pesquisas de Almaden ( <i>Almaden Research Center</i> , Califórnia, EUA), manipularam 35 átomos individuais de xenônio para escrever o logotipo da IBM ( <i>International Business Machines Corporation</i> ). Essa demonstração da capacidade de manipular átomos com precisão deu origem ao uso aplicado da nanotecnologia.
Década de 90	As primeiras empresas de nanotecnologia começaram a operar, por exemplo, <i>Nanophase Technologies</i> em 1989, <i>Helix Energy Solutions Group</i> em 1990, <i>Zyvex</i> em 1997, <i>Nano-Tex</i> em 1998 e muitas outras.
1991	Descoberta dos nanotubos de carbono, por Sumio Iijima da NEC Corporation, que exibem propriedades extraordinárias em termos de resistência, condutividade elétrica e térmica, entre outros.
1993	Moungi Bawendi, do MIT, inventou um método para síntese controlada de nanocristais, abrindo caminho para aplicações na computação, biologia, entre outros.
1998	Formação do grupo <i>Interagency Working Group on Nanotechnology</i> (IWGN) para investigar a nanociência e nanotecnologia de última geração e prever possíveis desenvolvimentos futuros. O documento <i>Nanotechnology Research Directions: Vision for the Next Decade</i> , criado em 1999 pelo IWGN, resultou diretamente da NNI ( <i>National Nanotechnology Initiative</i> ) dos EUA em 2000.

**Tabela 15** – Linha do tempo com alguns dos acontecimentos importantes na era moderna da nanotecnologia

(conclusão)

Ano	Acontecimento
1999 e início dos anos 2000	Os nanoproductos começaram a aparecer no mercado, incluindo para-choques leves para automóveis que resistem a arranhões, bolas de golfe que voam mais retas, raquetes de tênis mais rígidas (portanto, a bola ricocheteia mais rápido), tacos de beisebol com melhor flexibilidade, meias antibacterianas com prata em nanoescala, protetor solar com nanopartículas, roupas resistentes a dobras e manchas, revestimentos de vidro resistentes a arranhões, baterias de recarga mais rápida para ferramentas elétricas sem fio, telas aprimoradas para televisões, telefones celulares e câmeras digitais.
2003	Promulgação da Lei de Pesquisa e Desenvolvimento em Nanotecnologia do século XXI, nos EUA. O ato forneceu uma base estatutária para o NNI, estabeleceu programas, atribuiu responsabilidades às agências, autorizou financiamentos e promoveu pesquisas para tratar de questões-chave na área.
2003	Pesquisadores da <i>Rice University</i> desenvolveram nanoconchas de ouro com potencial de aplicações oncológicas (diagnóstico e tratamento).
2004	A comissão europeia adotou o comunicado “ <i>Towards a European Strategy for Nanotechnology</i> ”, com objetivo de institucionalizar a nanociência europeia, impulsionando planos de ação e financiamento para nanotecnologia.
2004	A <i>Britain’s Royal Society</i> e a <i>Royal Academy of Engineering</i> publicaram o documento “ <i>Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties</i> ” que defende a necessidade de abordar possíveis problemas de saúde, ambientais, sociais, éticos e regulatórios associados à nanotecnologia.
2004	A Universidade do Estado de Nova Iorque em Albany ( <i>SUNY Albany</i> ) lançou o primeiro programa de educação em nanotecnologia nos EUA, o <i>College of Nanoscale Science and Engineering</i> .
2008	O primeiro documento de estratégias da NNI foi publicado, o “ <i>NNI Strategy for Nanotechnology-Related Environmental, Health, and Safety (EHS) Research</i> ”. O mesmo foi atualizado em 2011.
2014	A NNI publicou o documento “ <i>Progress Review on the Coordinated Implementation of the NNI 2011 Environmental, Health, and Safety Research Strategy</i> ”.

Fonte: NNI [20--]

Tipicamente, a nanotecnologia cria materiais com uma (e.g., nanofilmes), duas (e.g., nanotubos, nanofios) ou três dimensões (nanopartículas; e.g., nanoesferas) que variam de 0,1 a 100 nm. No entanto, materiais com dimensões inferiores a 1.000 nm, mas que exibem propriedades únicas não vistas no material *bulk* (escala macro), foram denominados "nano" em muitas patentes e publicações de fertilizantes (GUAZZELLI; PEREZ, 2009; JEEVANANDAM et al., 2018; RAI et al., 2012).

Atualmente, a nanotecnologia está presente em múltiplas áreas, como indústrias eletrônica, biomédica, farmacêutica, cosmética, alimentícia, têxtil, de transporte, agricultura, entre outras (HANAN et al., 2018; KOLAHALAM et al., 2019). Os nanomateriais fazem parte dos mais variados produtos de vida nossa cotidiana. Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e de óxido de zinco (ZnO) são amplamente incorporadas em cosméticos, devido à ótima capacidade que possuem para bloquear raios UVA e UVB (Lu et al., 2015). As propriedades antimicrobianas de AgNP e nanopartículas de titânio são aproveitadas em diversos produtos, como filtros de água, têxteis, calçados, ar condicionado, eletrodomésticos, produtos de higiene pessoal, eletrônico, material hospitalar e odontológico (GUAZZELLI; PEREZ, 2009; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Setores biomédicos são altamente beneficiados pela nanotecnologia. Nanopartículas têm potencial para atuar na liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), em técnicas de diagnóstico, no tratamento de feridas, como antimicrobianos, entre outros (EL-SAYED; KAMEL, 2020; PATRA et al., 2018). A composição do nanomaterial é variável e depende da finalidade de sua aplicação, pode ser constituído de moléculas lipídicas, proteicas, metálicas, entre outros (JEEVANANDAM et al., 2018). Em liberação controlada de fármacos, por exemplo, duas estruturas são comumente utilizadas, as nanoesferas e nanocápsulas. Nos sistemas de nanoesferas, o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica; as nanocápsulas são sistemas que contém o fármaco confinado a uma cavidade delimitada por polímero (DENG et al., 2020; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Há nanomateriais que não carregam fármacos, mas possuem propriedade medicinal intrínseca, como é o caso das nanopartículas metálicas que apresentam ótima ação antimicrobiana (HANAN et al., 2018; NISAR et al., 2019; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

**Tabela 16** – Exemplos de algumas propriedades físicas, químicas e biológicas encontradas em materiais nanométricos (continua)

<b>Propriedades</b>	<b>Observações</b>	<b>Referência</b>
Temperatura de fusão	A escala nanométrica pode trazer como vantagem a redução da temperatura de fusão de alguns materiais (ex. ouro). A condutividade térmica de nanopartículas metálicas é alta.	Schmid e Corain (2003); Khan et al. (2019)
Bloqueio de radiação solar	Nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio em protetores solares bloqueiam os raios UV. São comercialmente atrativas, já que não conferem ao cosmético a opacidade indesejada.	Smijs e Pavel (2011)
Óptica (mudança de cor)	Nanopartículas podem ser utilizadas em aplicações de bioimagem devido à sua capacidade de produzir intensidade variável de cores em soluções. Por exemplo, partículas de ouro de 20 nm apresentam cores avermelhadas.	Dreaden et al. (2012)
Dureza	Algumas nanopartículas têm rigidez e resistência mecânica (ex. nanopartículas de argila) e podem ser incorporadas em polímeros para produzir plásticos duros ou roupas funcionais.	Khan et al. (2019); Zahedi et al. (2011)
Formação de suspensões	Nanopartículas têm capacidade para formar suspensões, uma vez que a interação entre partículas nanométricas e solvente é muito forte. Então a nanotecnologia pode ajudar na produção de líquidos sem precipitados ou material floculante.	Khan et al. (2019)

**Tabela 16 – Exemplos de algumas propriedades físicas, químicas e biológicas encontradas em materiais nanométricos (conclusão)**

<b>Propriedades</b>	<b>Observações</b>	<b>Referência</b>
Magnetismo	As nanopartículas magnéticas podem ter aplicações variadas, desde armazenamento de dados a aplicações de diagnóstico, como imagens clínicas. Essas nanopartículas são manipuladas pelo uso do campo magnético (ex. Nanopartículas de ferro)	Gloag et al. (2019)
Dimensionalidade	Os materiais nanométricos podem ter três dimensões. Existem nanomateriais de uma dimensão (filmes ou muitas superfícies de revestimento usadas na eletrônica). Nanomateriais bidimensionais são usados como filtros ou fibras. Os materiais tridimensionais incluem nanopartículas de diferentes morfologias e aplicações.	Guazelli e Perez (2009); Rai et al. (2015)
Propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes	Nanopartículas usadas para eliminar bactérias, fungos, vírus e alguns parasitas. Além de serem úteis no tratamento ou prevenção de doenças infecciosas, as nanopartículas podem ser aplicadas no tratamento de outras doenças devido a várias propriedades medicinais.	Sánchez-López et al. (2020)

**Fonte:** Próprio autor (2020). O levantamento de dados foi realizado entre 2016 e 2020.

### 3.6.1 Nanopartículas Metálicas

Há séculos, as propriedades antimicrobianas dos metais vêm sendo exploradas pelos seres humanos. Vasos de cobre e prata eram usados para desinfecção de água e preservação de alimentos por várias civilizações antigas, como persas, fenícios, gregos, romanos e egípcios. Documentos médicos de milhares de anos registram que o sal de cobre era aplicado como adstringente em processos cirúrgicos. A prata também tem sido importante na história da medicina, com a aplicação de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) para prevenção de infecções oculares em recém-natos e as películas à base de prata no tratamento de feridas (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013; NISAR et al., 2019).

Nanopartículas metálicas apresentam potencial para combater a resistência microbiana, pois possuem mecanismos de ação completamente diferentes dos descritos para antimicrobianos tradicionais e exibem atividade contra bactérias que já desenvolveram resistência aos fármacos usuais. Os elementos mais amplamente utilizados em nanopartículas metálicas incluem prata, ouro, cobre, ferro e zinco; uma vez que são metais de transição, possuem orbitais-d parcialmente preenchidos, o que os tornam mais ativos em redox (mais fácil de reduzir para átomos zerovalentes), um recurso que facilita a agregação dos átomos metálicos e formação de nanopartículas (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Nanopartículas metálicas podem ser produzidas por duas maneiras, métodos “de cima para baixo” (*top-down*) ou “de baixo para cima” (*bottom-up*). Nas técnicas *top-down*, o material macroscópico (*bulk*) é fragmentado até atingir escala nanométrica. Nos métodos conhecidos por *bottom-up*, a síntese de nanopartículas ocorre a partir de blocos de construção (átomos, moléculas) que se unem até atingirem agregados nanométricos (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Nanometais são sintetizados por métodos físicos, químicos ou biológicos. Os processos físicos envolvem técnicas *top-down*, nas quais o metal *bulk* é fracionado a pedaços menores por evaporação-condensação, ablação por laser ou emprego de micro-ondas (EL-NOUR; AL-WARTHAN; AMMAR, 2010). Tais técnicas criam nanopartículas com distribuição de tamanho bastante dispersa e, portanto, não é a mais apropriada, já que o tamanho é um fator determinante para atividade antimicrobiana das nanopartículas metálicas (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Já as técnicas *bottom-up* são utilizadas nos processos químicos e

biológicos de síntese, (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Nos métodos químicos, íons metálicos (provenientes de sais) sofrem redução e conseqüentemente se agregam e formam estruturas de tamanho nanométrico; agentes químicos redutores (e.g., borohidreto de sódio, citrato de sódio, entre outros) e estabilizadores (polímeros como polivinilpirrolidona – PVP, polietilenoglicol – PEG, poliácridamida, etc) são empregados (EL-NOUR; AL-WARTHAN; AMMAR, 2010).

Os métodos biológicos surgiram da necessidade de desenvolver técnicas mais ecológicas, que excluem o uso de solventes orgânicos e produtos químicos tóxicos. São alternativas mais seguras e ecologicamente sustentáveis (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Biomoléculas provenientes de bactérias, fungos, algas e plantas são utilizadas como agentes redutores de íons metálicos e como estabilizantes (DURÁN et al., 2011). Aspectos críticos da síntese de nanopartículas metálicas, como distribuição de tamanho e cristalinidade, podem ser superados, por exemplo, selecionando a cepa microbiana, temperatura e tempo de reação, concentração do precursor de metal, condições ideais de pH, etc (SHAH et al., 2015).

As propriedades de nanopartículas metálicas dependem diretamente de seu tamanho, morfologia, superfície e cristalinidade. Desta forma, na síntese de nanometais, o controle desses parâmetros é fundamental para otimizar a funcionalidade da nanoestrutura (WATT; CHEONG; TILLEY, 2013). O tamanho e morfologia são alguns dos fatores que fortemente influenciam o potencial antimicrobiano de nanometais, mas o potencial de redução desses metais também contribui para essa atividade biológica, uma vez que se ligam a moléculas microbianas doadoras de elétrons e conseqüentemente interferem na função celular do microrganismo (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). Dentre os metais estudados, a prata possui grande tendência à redução (potencial de redução igual a 0,80 V) comparado a metais como Cu (0,34 V), Fe (- 0,44 V) e Zn (-0,76 V) (SCOTT; YU, 2015), e se destaca pela atividade antimicrobiana de amplo espectro contra agentes patogênicos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus (BOCATE et al., 2019; GALDIERO et al., 2011; LONGHI et al., 2016; MACHADO et al., 2020; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020; SCANDORIEIRO et al., 2016). Portanto, AgNP são amplamente distribuídas em produtos já comercializados, inclusive aqueles para aplicações biomédicas; e também são investigadas em estudos que visam o desenvolvimento de estratégias e medicamentos para auxiliar no combate à resistência microbiana (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

### 3.6.2 Nanopartículas de Prata

#### 3.6.2.1 Nanoprata: histórico e aplicações antimicrobianas

A prata é um elemento de ocorrência natural, um pouco mais duro que o ouro, muito dúctil e maleável, com alta condutividade elétrica e térmica, e excelente atividade microbicida (RAI et al., 2012). Durante séculos, os compostos à base de prata foram utilizados para diversos fins. Especialmente como agente antimicrobiano, era aplicado por povos antigos no tratamento de feridas, infecções oculares e na preservação de alimento e água. Até o pai da medicina, Hipócrates, defendia o potencial do pó de prata para curar úlceras, deste então, muitas práticas hospitalares usando prata como bactericida têm sido documentadas (ALEXANDER, 2009). Entre os agentes antimicrobianos à base de prata, usados há muito tempo, incluem-se  $\text{AgNO}_3$ , sulfadiazina de prata, zeólito de prata, prata em pó (óxido de prata) e cloreto de prata (RAI et al., 2012).

O  $\text{AgNO}_3$  é conhecido por diferentes nomes, como "*Lunar caustic*" (inglês), "*Lapis infernalis*" (latim) e "*Pierre infernale*" (francês). No século XVIII, foi utilizado para o tratamento de doenças venéreas, fístulas de glândulas salivares e abscessos ósseos e perianais. No século XIX, o  $\text{AgNO}_3$  era usado no tratamento de queimaduras. Em 1881, Carl Siegmund Franz Credé começou a utilizar colírios de  $\text{AgNO}_3$  para curar oftalmia neonatal. Em 1884, gotas de  $\text{AgNO}_3$  já eram usadas para evitar a transmissão de *Neisseria gonorrhoeae* de mães infectadas para seus filhos durante o parto (RAI et al., 2012). Na forma de  $\text{AgNO}_3$  ou vitelinato de prata, recentemente, ainda tem sido empregado como antisséptico oftálmico na profilaxia neonatal, mas seu uso para este fim vem sendo substituído por outros fármacos, como iodopovidona ou eritromicina (DUARTE et al., 2019; CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015). A sulfadiazina de prata é utilizada na prevenção e tratamento de feridas com potencial a sepse, como queimaduras, úlceras e feridas cirúrgicas, e profilaticamente contra infecções associadas a cateterismos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Com a era dos antibióticos, a prata passou a ser menos utilizada para fins terapêuticos. No entanto, o aumento da incidência de cepas microbianas MDR e os avanços da nanociência e nanotecnologia têm permitido recuperar o uso da prata

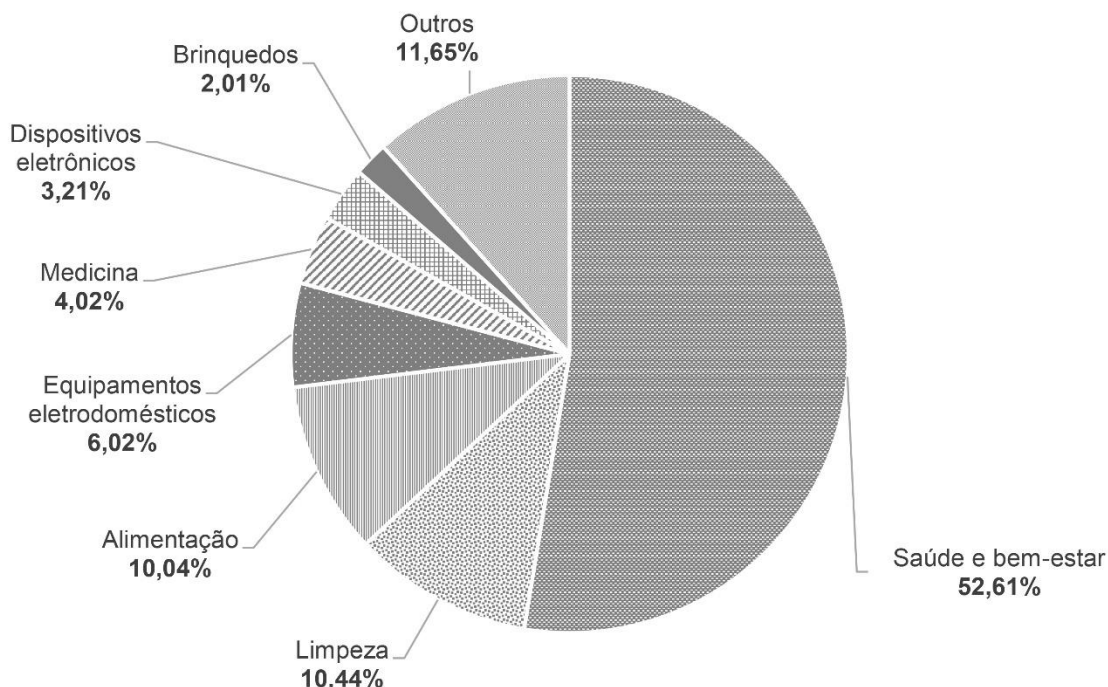
como antimicrobiano, porém em nanoescala (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020; SINGH et al., 2019).

Apesar do advento da nanotecnologia ser recente, AgNP são utilizadas há mais de 100 anos devido a seus efeitos antimicrobianos. Nanoprata de aproximadamente 10 nm, com o nome de “Collargol”, já era comercializada em 1897 para aplicações clínicas humanas e veterinárias, na forma de pomada para uso tópico e solução de uso intravenoso (FORTEESCUE-BRICKDALE; M.A.; OXON., 1903; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). A aplicação tópica de AgNP em feridas foi aprovada por volta de 1920 pelo FDA, pelo fato desse material acelerar o processo de cicatrização e exibir atividade antibacteriana (DURÁN et al., 2016; SINGH et al., 2019). Nos EUA, desde 1954, são registradas como material biocida aplicado como algicidas, aditivos antimicrobianos (incorporados em plásticos e têxteis) e impregnados em filtros de água. É importante destacar que os inventores de formulações contendo nanoprata já entenderam, décadas atrás, que a viabilidade da tecnologia exigia prata em nanoescala, por exemplo, pela seguinte declaração de uma patente: “para eficiência, a prata deve ser dispersa na forma de partículas com tamanho inferior a 250Å [inferior a 25 nm]”. Além disso, apesar dos pesquisadores, na época, não usarem o termo “nano” em suas publicações, as técnicas de síntese já envolviam nanociência; por exemplo, em 1889, já foi reportada a síntese de partículas de prata (de 7 a 9 nm) estabilizadas por citrato, usando o  $\text{AgNO}_3$  como precursor (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

Apesar da longa história da fabricação de produtos contendo nanoprata, atualmente, na era da nanotecnologia, é possível funcionalizar esses nanometais para atender diversas aplicações; AgNP estão incorporadas em inúmeros itens do nosso cotidiano (Figura 27), como têxteis, cosméticos, canecas, talheres e outros utensílios domésticos, eletrodomésticos, brinquedos, artigos eletrônicos, desinfetantes, tintas, curativos, equipamentos médicos e odontológicos e muitos outros (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2018; GUAZZELLI; PEREZ, 2009; PULIT-PROCIAK; BANACH, 2016).

AgNP apresentam grande potencial para aplicações biomédicas. Nanosistemas à base de prata têm sido avaliados como carreadores adequados de várias moléculas terapêuticas, incluindo anti-inflamatórios, antioxidantes, moléculas anticâncer e antimicrobianas (BURDUSEL et al., 2018; PUDLARZ; SZEMRAJ, 2018). Para induzir efeitos antibacterianos a materiais e dispositivos clinicamente relevantes,

AgNP têm sido aplicadas para a modificação de superfícies como tecidos de algodão, fibras naturais e artificiais, filmes finos de polímeros, bandagens para feridas, cateteres, próteses e implantes. Nanoprata incorporada em curativos, por exemplo, é uma estratégia valiosa para pacientes diabéticos com feridas que demoram para cicatrizar e podem ser acompanhadas por numerosas infecções. AgNP vêm sendo cada vez mais estudadas para aplicações ortopédicas, hidroxiapatita ou titânio integrada com este nanometal representa uma escolha adequada para a fabricação de implantes ósseos antimicrobianos (BURDUSEL et al., 2018; KOBAYASHI et al., 2019; NAKAZATO et al., 2020). Além disso, AgNP têm sido incorporadas em materiais dentários de uso geral, para fornecer efeitos bactericidas aos mesmos, tais como materiais de restauração, implantes, ortodontia, entre outros (BURDUSEL et al., 2018; NORONHA et al., 2017). Além dos setores biomédicos, as propriedades antimicrobianas de AgNP podem ser aproveitadas em cosméticos, embalagens de alimentos, filtros para desinfecção de água, tratamentos de águas poluídas, entre muitos outros (BARKAT et al., 2018; NAKAZATO et al., 2017).



**Figura 27 – Predominância de produtos comercializados, em diferentes categorias, contendo nanopartículas de prata (AgNP).**

Fonte: adaptado de Pulit-Prociak e Banach (2016).

### 3.6.2.2 Síntese de nanopartículas de prata (AgNP)

AgNP podem ser sintetizadas por diferentes métodos, porém é importante que o processo de síntese permita o controle de propriedades físicas e químicas dessas partículas, tais como a obtenção de nanopartículas com distribuição uniforme de tamanho (monodispersas), com morfologia idêntica, com revestimento adequado (que evite agregação ou até funcionalize a nanopartícula), composição química conhecida, entre outros (GÜZEL; ERDAL, 2018).

Entre os métodos físicos mais importantes para a síntese de AgNP, estão evaporação-condensação, ablação a laser, irradiação elétrica, irradiação gama e litografia. A ablação a laser é uma técnica notável, já que permite a obtenção de grande número de nanopartículas em pouco tempo, com controle de tamanho (mudando o número de pulsos a laser, por exemplo) e na ausência de reagentes químicos (GÜZEL; ERDAL, 2018). A síntese de AgNP por evaporação-condensação é um método mais dispendioso, pois requer o uso de um forno tubular (que ocupa muito espaço e consome uma grande quantidade de energia), além de requerer o aumento da temperatura durante o processo, exigindo muito tempo para atingir estabilidade térmica (EL-NOUR; AL-WARTHAN; AMMAR, 2010; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Comparado a outros métodos, a síntese química de AgNP é relativamente barata e fácil de implementar em larga escala, além de permitir síntese de nanopartículas com distribuição de tamanho monodispersa. Esse processo emprega o uso de três componentes principais, um precursor de metal (normalmente o  $\text{AgNO}_3$ ), agentes redutores e agentes estabilizadores (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Tamanho, morfologia e dispersão apropriados podem ser alcançados pelo controle de parâmetros experimentais, como o precursor usado na reação, e tipo de agentes redutores e estabilizantes, concentração de reagentes, pH e temperatura (GÜZEL; ERDAL, 2018).

Agentes redutores são utilizados para converter íons metálicos a  $\text{Ag}^0$ , estado eletrônico em que os átomos tendem a se agregar e formar as nanopartículas. Diferentes reagentes têm sido aplicados para o processo de redução, entre eles estão citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), hidrogênio elementar, N,N-dimetilformamida (DMF), hidrazina, tiosulfato, polietilenoglicol, entre outros (EL-NOUR; AL-WARTHAN; AMMAR, 2010; GÜZEL; ERDAL, 2018).

Uma etapa importante na síntese de AgNP é a estabilização, principalmente para evitar processos de aglomeração e oxidação. Agentes estabilizantes são utilizados para interagir com a superfície das partículas e assim estabilizar o aumento de suas dimensões, além de protegê-las de sedimentação e agregação; dentre esses estabilizadores estão citrato, PVP, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), álcool polivinílico (PVA), quitosana, derivados de amina, tióis, ácido glucônico, poliacrilonitrila, poliácridamida, PEG, entre outros (EL-NOUR; AL-WARTHAN; AMMAR, 2010; (GÜZEL; ERDAL, 2018). De maneira geral, a estabilização pode ser eletrostática ou estérica. Na estabilização estérica, reveste-se a superfície das nanopartículas com polímeros ou proteínas para criar barreira mecânica que impede agregação. A estabilização também pode ser alcançada por repulsão eletrostática, por incorporação de carga positiva ou negativa à superfície dessas nanopartículas (TADROS, 2012).

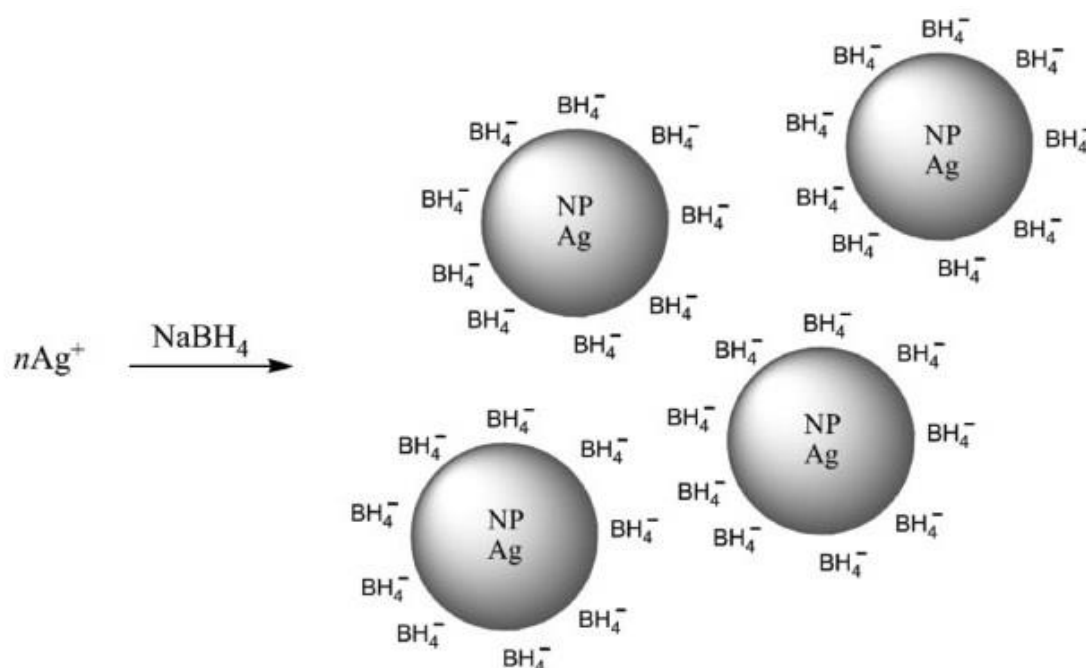
O agente redutor, algumas vezes, pode ter uma função dupla, isto é, também atuar como agente estabilizante (GÜZEL; ERDAL, 2018; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Entre as técnicas químicas para obter AgNP, o método de Creighton é um dos mais utilizados porque permite a síntese de nanopartículas de pequeno tamanho (por volta de 10 nm) e monodispersas. Neste caso, o agente precursor é  $\text{AgNO}_3$  e o agente redutor é  $\text{NaBH}_4$ . Adiciona-se o  $\text{NaBH}_4$  em excesso em relação ao  $\text{AgNO}_3$ , pois esse reagente atua simultaneamente como agente redutor e estabilizante. Os íons borohidreto se adsorvem às superfícies das nanopartículas, envolvendo-as e deixando-as repletas de carga que criam uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas e evita a agregação das mesmas (MELO et al., 2012; MULFINZER et al., 2007) (Figura 28).

A reação responsável pela redução de íons prata em prata metálica, pela ação do  $\text{NaBH}_4$ , é descrita a seguir:



Atualmente, AgNP sintetizadas por rotas químicas são extensivamente encontradas no mercado. Embora o baixo custo e alto desempenho da síntese química serem características vantajosas, o uso de agentes químicos (redutores e estabilizantes) tem impacto negativo, principalmente no meio ambiente. Portanto, métodos ecologicamente mais corretos têm sido desenvolvidos. Um deles,

envolve D-glicose como agente redutor e amido como agente estabilizante, e permite a obtenção de AgNP com diâmetro por volta de 10 nm (KUMAR et al., 2018). Atualmente, os métodos ecologicamente sustentáveis, também chamados de “nanotecnologia verde” ou “síntese verde”, estão gradualmente substituindo a síntese química tradicional. A biossíntese de AgNP usa as bases da síntese química, mas em vez de agentes redutores e estabilizantes químicos, tira proveito das propriedades redutivas e estabilizantes das entidades biológicas, como bactérias, fungos, plantas e algas (DAKAL et al., 2016; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). São técnicas que não requerem o uso de alta energia, pressão, temperatura e produtos químicos tóxicos (IRAVANI; KORBEBANDI; ZOLFAGHARI, 2014). Além disso, AgNP biogênicas têm alta estabilidade devido à presença de agentes de capeamento eficientes, de fonte biológica, que além de prevenir a agregação de nanopartículas, atuam como agente redutor (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016).



**Figura 28 – Esquema mostrando estabilização de nanopartículas de prata (AgNP) com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ).** Íons borohidreto adsorvidos às AgNP criam forças repulsivas capazes de estabilizar a solução coloidal, impedindo a agregação das nanopartículas.

Fonte: Melo et al. (2012).

Dentre as vantagens de utilizar plantas para a síntese de AgNP, estão a fácil acessibilidade aos vegetais e a grande variedade de seus grupos funcionais ativos que podem promover a redução de íons de prata. Extratos vegetais (de folhas, raízes, látex, casca, caule e sementes) exibem níveis relativamente altos de agentes

reduzidos como polissacarídeos, taninos, saponinas, compostos fenólicos, terpenoides, flavonas, alcaloides, proteínas, enzimas, vitaminas, aminoácidos, componentes alcoólicos, que também podem atuar como agentes estabilizantes (GÜZEL; ERDAL, 2018; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

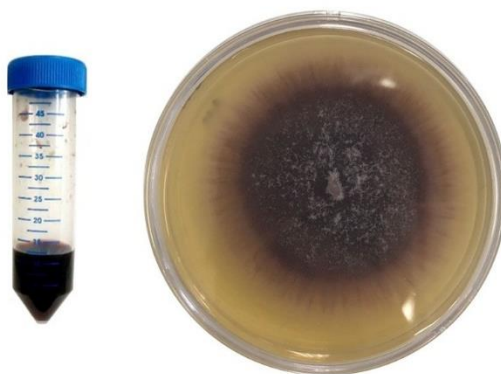
De maneira geral, a obtenção de AgNP a partir de extratos vegetais é um processo simples. As partes coletadas das plantas são limpas com água destilada esterilizada, secas na sombra e pulverizadas. Para o preparo do extrato, o pó seco é fervido em água deionizada. A infusão resultante é filtrada para remoção de materiais insolúveis, em seguida o precursor de Ag ( $\text{AgNO}_3$ ) é adicionado. A reação de síntese de AgNP é acompanhada pela mudança de cor do sistema (geralmente resultando em castanho escuro) e por análise de ressonância plasmônica com auxílio da técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis). Finalmente, as nanopartículas podem ser coletadas por centrifugação, caracterizadas e testadas (GÜZEL; ERDAL, 2018; NISAR et al., 2019; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Diversas plantas têm sido utilizadas na biossíntese de AgNP, como *Pelargonium graveolens* (gerânio), *O. vulgare* (orégano), *Musa paradisiaca* (banana), *Ocimum gratissimum* (manjeriço), *Carica papaya* (mamão), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), entre outras (GÜZEL; ERDAL, 2018; NANCY; ELUMALAI, 2019; NISAR et al., 2019; SHARMA; GULERIA, 2019).

A biossíntese de AgNP a partir do potencial redox de bactérias pode acontecer por duas maneiras gerais, com enzimas redutases de processos intra ou extracelulares. A biossíntese intracelular utiliza transporte facilitado de íons  $\text{Ag}^+$  para o interior da célula bacteriana, a prata iônica é reduzida e ocorre agregação de seus átomos; mas neste caso, é necessária uma etapa adicional (lise celular) para recuperação das nanopartículas. Já na biossíntese extracelular, utiliza-se a biomassa bacteriana, o sobrenadante de culturas bacterianas ou extratos sem células; e uma de suas vantagens é não requerer etapa de lise (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Um dos pontos positivos de se utilizar bactérias para a produção de AgNP é que estas são microrganismos facilmente manipuláveis geneticamente, o que permite otimizar o processo de biossíntese. Entre as espécies já utilizadas para biossíntese de AgNP estão *Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas stutzeri*, entre muitas outras (DURÁN et al., 2011; IRAVANI; KORBEGANDI; ZOLFAGHARI, 2014; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

A forma de nutrição dos fungos confere a esses microrganismos

grande relevância na síntese extracelular de AgNP. Eles produzem enzimas que são secretadas e realizam digestão extracelular de macromoléculas, para em seguida ocorrer absorção de nutrientes (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Diversos fungos têm sido utilizados para síntese de AgNP, como *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Coriolus versicolor*, *Trichoderma asperellum*, *Rhizopus stolonifer* e outros (DURÁN et al., 2005, 2011; GUILGER-CASAGRANDE; LIMA, 2019).

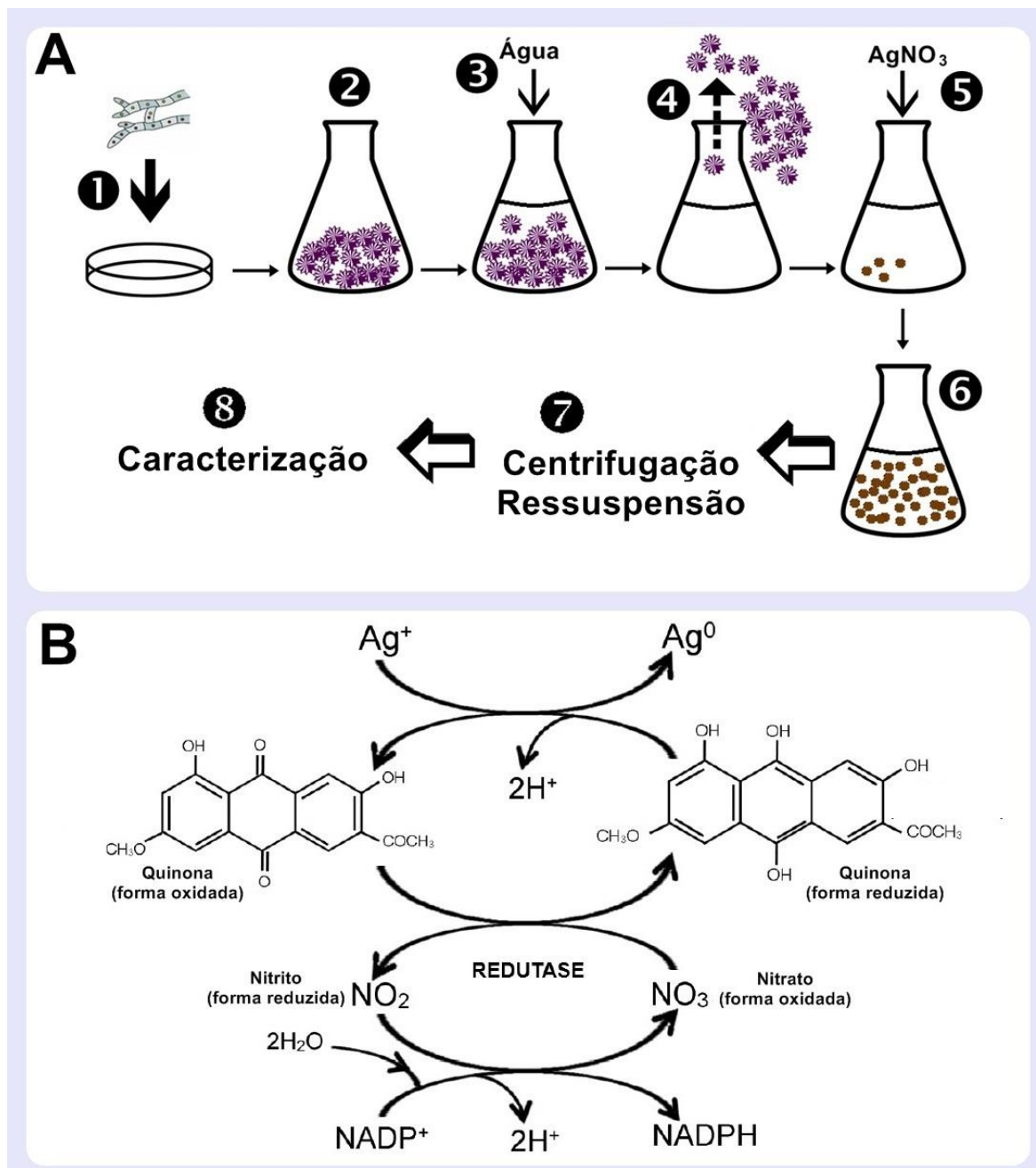
Muitos fungos que possuem nitrato redutase são capazes de reduzir íons de Ag, mas naftoquinonas e antraquinonas com excelentes propriedades redox foram relatadas em *F. oxysporum* e também podem participar do processo de redução de íons metálicos (DURÁN et al., 2005; DURÁN; MARCATO; DURÁN, 2011; GUILGER-CASAGRANDE; LIMA, 2019). Durán et al. (2005) padronizaram um método de biossíntese extracelular de AgNP utilizando o fungo *F. oxysporum* (Figuras 29 e 30A), cuja patente foi depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com a identificação “PI 0605681-4 A” (CABALLERO et al., 2006). Evidências mostram que o mecanismo de biossíntese, nesse caso, se deve a dois componentes do *F. oxysporum*, nitrato redutase e quinona transportadora de elétrons, que reduzem íons metálicos de  $\text{AgNO}_3$  em solução (Figura 30B).



**Figura 29 – Solução coloidal de nanopartículas de prata (AgNP) biossintetizadas extracelularmente utilizando *Fusarium oxysporum*.** A solução de AgNP (tubo à esquerda) apresenta coloração castanha escura. A placa de Petri (à direita) contém colônia de *F. oxysporum* crescida em ágar malte, cujo micélio apresenta coloração violeta escura e branca.

**Fonte:** próprio autor (2019).

Resumidamente, Durán et al. (2005) incubaram a biomassa fúngica em água, por três dias, a 28°C. Em seguida, a biomassa foi filtrada, e ao extrato líquido (contendo os componentes fúngicos secretados) foi adicionado  $\text{AgNO}_3$ . Apesar da mudança de cor da solução, de amarelo pálido para coloração acastanhada, sugerir



**Figura 30 – Biossíntese extracelular de nanopartículas de prata (AgNP) utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*.** (A) Esquema mostrando o processo de síntese. O fungo é cultivado em ágar malte a 28°C por 7 dias (1). Em seguida, a biomassa fúngica é transferida das placas de Petri para um frasco Erlenmeyer, ou é obtida por centrifugação se a cultura for feita em fase líquida (2). Adiciona-se água destilada à biomassa fúngica (3), e o sistema é incubado a 28°C, por 72h, sob agitação. Após os três dias, a biomassa fúngica é removida por filtração (4), e ao filtrado livre de células adiciona-se nitrato de prata (5). Imediatamente a solução começa a alterar sua cor, tornando-se levemente acastanhada. O sistema é incubado a 28°C, e com o passar dos dias a solução adquire cor castanha escura, sugerindo a formação de AgNP (6). As AgNP passam por processo de centrifugação e ressuspensão para lavagem do material (7), são caracterizadas quanto a tamanho, morfologia, potencial zeta e composição química (8) e em seguida são testadas nos ensaios microbiológicos. (B) O esquema mostra o mecanismo hipotético de biossíntese de AgNP. Análises experimentais mostraram que o filtrado fúngico contém antraquinona e nitrato redutase, diante disso sugere-se que a redução dos íons de prata e subsequente formação de nanopartículas ocorrem devido a ação conjunta da enzima nitrato redutase e quinona transportadora de elétron. A imagem “A” foi feita pelo próprio autor e a imagem “B” é adaptada de Durán et al. (2005).

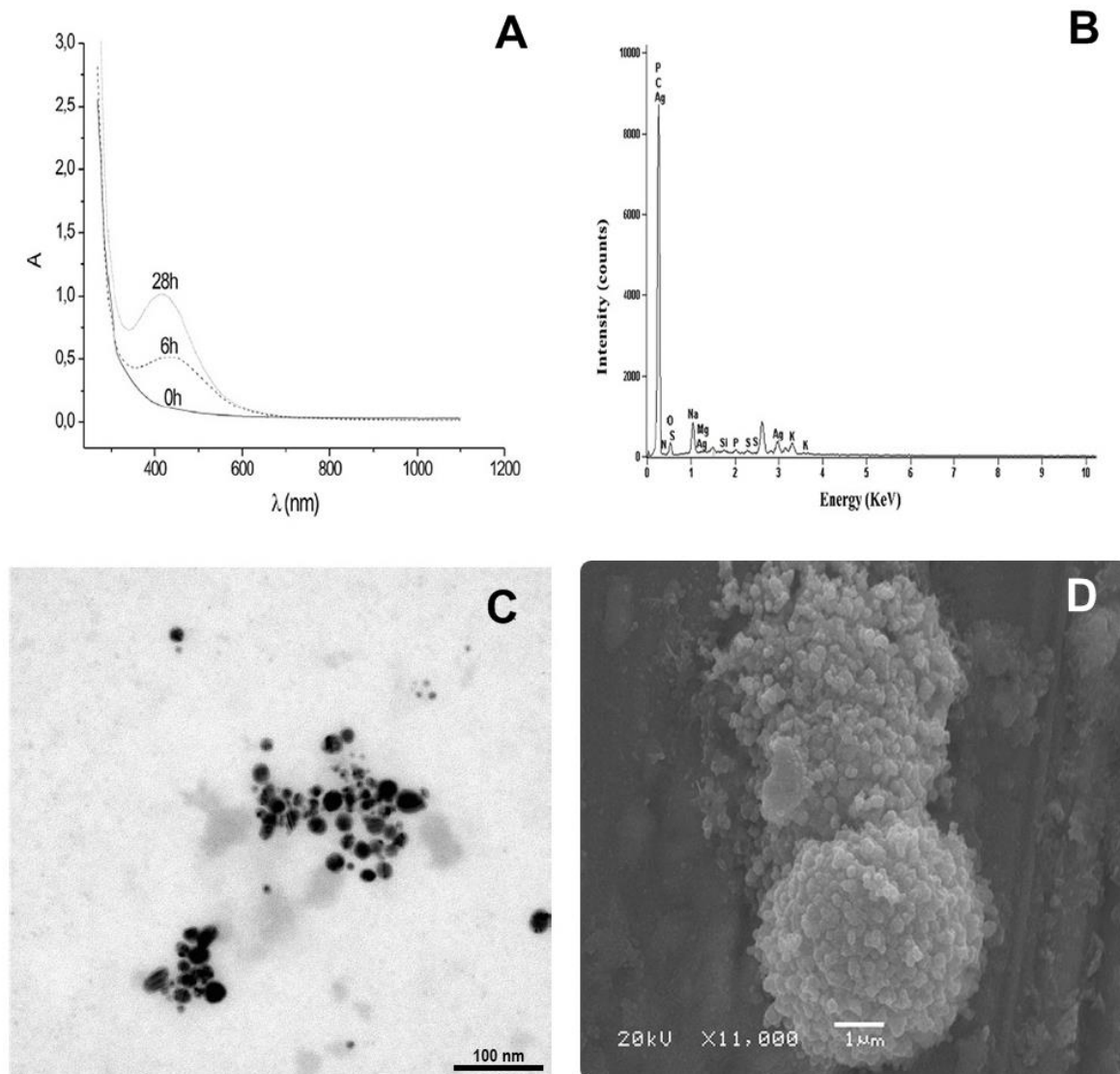
Fonte: próprio autor (2020) e adaptado de Durán (2005).

a formação de AgNP, alíquotas da solução de reação foram coletadas, em tempos diferentes, e avaliadas por espectrofotômetro UV-Vis para confirmação da banda plasmônica referente a nanop prata (Figura 31A). UV-Vis em baixo comprimento de onda também mostrou a presença de resíduos de triptofano/tirosina na solução de reação, indicando a presença de proteínas no filtrado fúngico que podem participar do processo de síntese. Por espectroscopia de energia dispersiva (EDX, *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) foi confirmada a presença do elemento Ag (Figura 31B). Com a técnica de MEV, os pesquisadores confirmaram a síntese de nanopartículas esféricas (com tamanho entre 20 e 50 nm) e a possível presença de agente estabilizante (Figura 31D). Posteriormente, com auxílio de imagem espectroscópica elementar (ESI, *elementar spectroscopy imaging*), mostraram que as mesmas AgNP são formadas por Ag, e átomos de N e S ao redor das nanopartículas, indicando que a estabilização é feita por proteínas fúngicas (Durán et al., 2007). Marcato et al. (2013) mostraram padrões de proteínas fúngicas nas mesmas nanopartículas, com auxílio de técnica espectroscopia no infravermelho; e com técnica de MET também confirmou sua morfologia esférica e faixa de tamanho (Figura 31C).

Para estudo do mecanismo de biossíntese, a solução contendo componentes fúngicos foi analisada por cromatografia de camada delgada, que mostrou *spots* correspondentes a 2-acetil-3,8-di-hidroxi-6-metoxi-antraquinona ou seu isômero 2-acetil-2,8-di-hidroxi-6-metoxi-antraquinona, colaborando com o espectro de fluorescência do filtrado que indica a presença de antraquinona. A presença de nitrato redutase no filtrado foi confirmada por método fluorométrico, detectando a reação de nitrito com 2,3-diaminoftaleno (Durán et al., 2005).

As AgNP produzidas pelo método de Durán e colaboradores apresentam excelente atividade antimicrobiana (Tabela 17), atuam contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas MDR de importância clínica, como *E. coli* produtoras de ESBL, *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos, *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium, MRSA e *S. agalactiae* (BIASI-GARBIN et al., 2015b; CARDOZO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2019; MARCATO et al., 2013; OTAGUIRI et al., 2017; SCANDORIEIRO et al., 2016), além de mostrar atividade contra leveduras e fungos filamentosos (BOCATE et al., 2019; LONGHI et al., 2016) e ação antiprotozoário (MACHADO et al., 2020). Apesar da comprovada eficiência antimicrobiana dessas AgNP biogênicas, pesquisas ainda são necessárias para verificar os mecanismos moleculares envolvidos na ação antimicrobiana, bem como

ampliar estudos sobre toxicidade, para garantir a segurança de seu uso (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).



**Figura 31 – Algumas características das nanopartículas de prata (AgNP) biosintetizadas extracelularmente utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*.** (A) Banda plasmônica localizada em 415-420 nm. (B) Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) confirma a presença de prata no nanomaterial. (C) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostra AgNP esféricas com tamanho médio de 20 nm (D) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra AgNP de 20-50 nm, que mesmo agregadas não estão em contato direto dentro dos agregados, o que indica a presença de agente estabilizante envolvendo as partículas.

**Fonte:** adaptado de Durán et al. (2005) e Marcato et al. (2013).

As rotas sintéticas biogênicas apresentam vantagens sobre as químicas ou físicas tradicionais, por serem mais ecológicas. No entanto, a reprodutibilidade relativamente pobre é a grande limitação da síntese biogênica. Desta

forma, a caracterização adequada dessas AgNP é crucial antes da avaliação de sua atividade biológica (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016). Nanopartículas metálicas

**Tabela 17** – Citotoxicidade e atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (AgNP), sintetizadas extracelularmente com *Fusarium oxysporum*<sup>1</sup>, indicados por concentração tóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) e concentração inibitória mínima (CIM), respectivamente

Modelo para estudo de toxicidade	CC <sub>50</sub>	Referência
Hemácias humanas	> 250 µM (>37,5 µg/mL) <sup>a</sup>	Scandorieiro et al. (2016)
HEp-2	97,22 µM (14,58 µg/mL)	Scandorieiro et al. (2016)
HEp-2	> 8.7 µg/mL	Longhi et al. (2016)
Fibroblasto V79	45 µM	Marcato et al. (2013)
Fibroblasto V79	3,4 µg/mL	Prado (2014)
Microrganismo	CIM	Referência
MRSA	125 µM	Cardozo et al. (2013)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	125 µM	Biasi-Garbin et al. (2015)
Bactéria Gram-positiva	125 – 250 µM (18,75 – 37,5 µg/mL)	Scandorieiro et al. (2016)
Bactéria Gram-negativa	62,5 – 125 µM (9,37 – 18,75 µg/mL)	Scandorieiro et al. (2016)
Levedura ( <i>Candida albicans</i> )	1,74 – 4,35 µg/mL	Longhi et al. (2016)
Fungo filamentosos ( <i>Aspergillus</i> spp.)	4 – 8 µg/mL <sup>b</sup>	Bocate et al. (2019)
<i>Toxoplasma gondii</i>	3 – 6 µM <sup>c</sup>	Machado et al. (2020)

<sup>1</sup> AgNP de todos os estudos foram sintetizadas de acordo com Durán et al. (2005).

<sup>a</sup> CC<sub>50</sub> equivalente a 770 µM para hemácia humana (dado referente a resultados do estudo descrito nesta tese. <sup>b</sup> Valor referente a CIM<sub>50</sub>, <sup>c</sup> Concentrações reduziram infecção celular por taquizoítos em 51 e 66% em comparação ao controle não tratado.

**Fonte:** próprio autor. O levantamento de dados foi realizado entre 2014 e 2020.

podem ser caracterizadas por inúmeras técnicas, que fornecem informações sobre suas propriedades morfológicas, físico-químicas e elétricas, que são cruciais para a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*. Dentre as propriedades relevantes das nanopartículas estão tamanho, forma e energia superficial (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

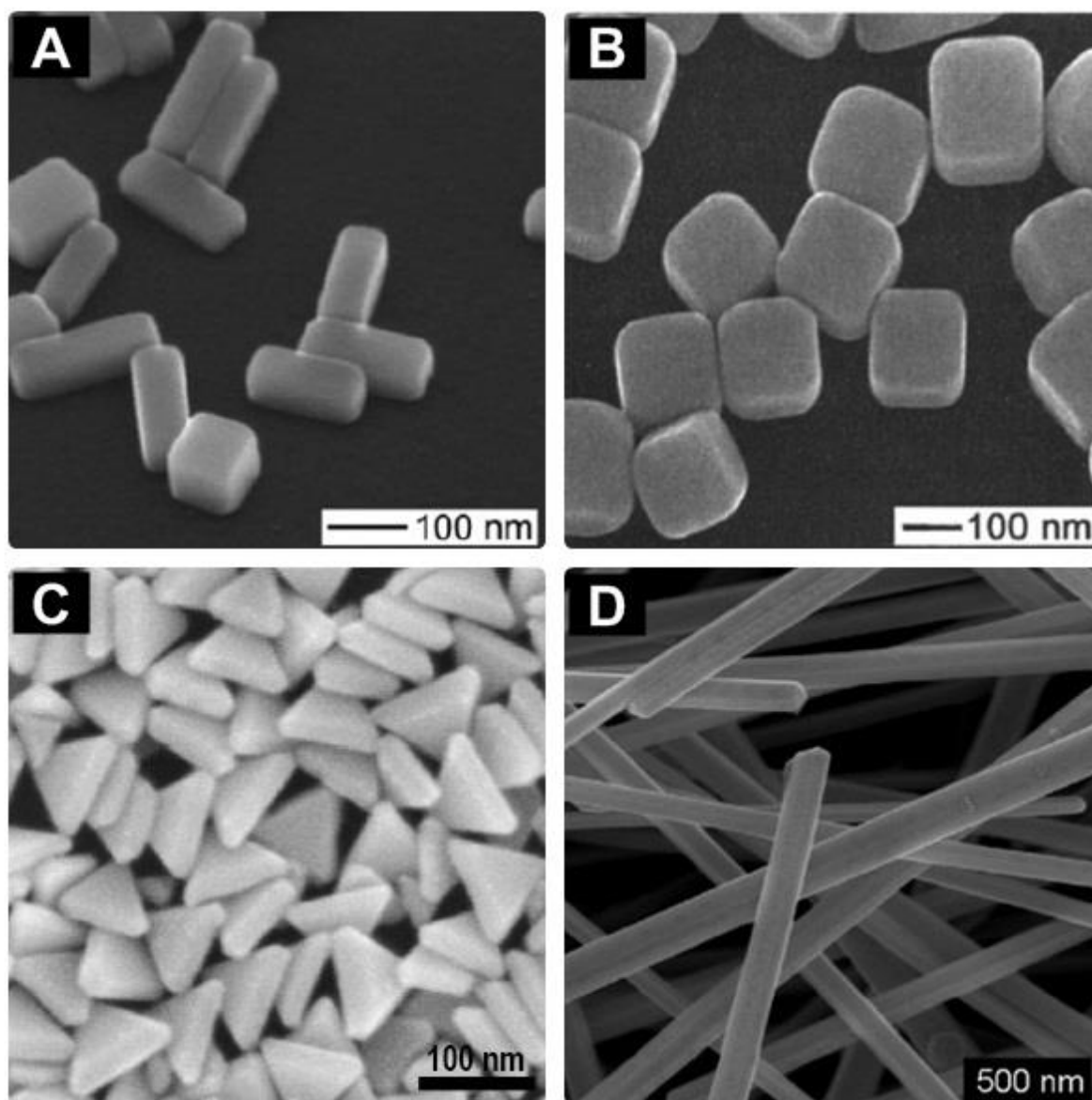
A análise básica da estrutura de qualquer nanomaterial metálico é a difração de raios X (XRD, *X-ray diffraction*), que avalia a natureza cristalina da nanopartícula, confirma sua morfologia, tamanho e composição (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016; MOURDIKOURDIS; PALLARESA; THANH, 2018).

Mas outras técnicas também são importantes, tais como espectroscopia UV-Vis, que é geralmente utilizada em vários intervalos de tempo durante a reação e fornece informações valiosas sobre o sucesso da síntese de AgNP. As nanopartículas metálicas possuem elétrons livres na sua superfície, e quando excitados experimentam uma oscilação coletiva; as oscilações ressonantes são conhecidas como ressonância plasmônica de superfície e no caso de AgNP acontece em torno do comprimento de onda de 400 nm (Figura 31A) (MOURDIKOURDIS; PALLARESA; THANH, 2018; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

As técnicas de MET e MEV fornecem informação sobre a morfologia e tamanho das nanopartículas. Espectroscopia de infravermelho é utilizada para caracterizar moléculas que participam da biorredução e estabilização, por exemplo, os principais grupos funcionais ou biomoléculas ligadas às AgNP, como grupos amina, resíduos de cisteína ou grupos carboxílicos. Espalhamento dinâmico de luz (DLS, *dynamic light scattering*) determina o tamanho e o índice de polidispersão. Eletroforese Doppler a laser é usado para medir potencial zeta (uma medida indireta da carga elétrica da superfície) das nanopartículas. EDX permite análise elementar ou caracterização química (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016; MOURDIKOURDIS; PALLARESA; THANH, 2018; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Diante da diversidade de métodos para síntese de nanopartículas metálicas, AgNP abordadas em diferentes estudos variam com relação à morfologia, podem ser esféricas, bastões, triangulares, tetraédricas, ou apresentar outros formatos (Figura 32), tipos de revestimentos e carga superficial ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $\text{NaBH}_4$ , diferentes polímeros, peptídeos, etc) e tamanhos (na faixa de 1 a 100 nm, ou até um pouco mais). Todos esses parâmetros influenciam a atividade microbiana de AgNP, o que reforça a necessidade de haver caracterização antes dos ensaios microbiológicos

(ABBASZADEGAN et al., 2015; AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; AYALA-NÚÑEZ et al., 2009; GOYAL et al., 2017). Além disso, é importante haver padronização tanto das técnicas de caracterização de AgNP como também de ensaios biológicos, para que possamos fazer conclusões com relação a atividade antimicrobiana e toxicidade desses nanomateriais (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016).



**Figura 32 – Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, representativas de nanoestruturas de prata com diferentes morfologias. (A) Nanobastões de prata (Wiley et al., 2007). (B) Nanocubos de prata (Sun e Xia, 2002). (C) Nanoprismas de prata (Xue et al., 2015). (D) nanofios de prata (Xu et al., 2017).**

**Fonte:** Wiley et al. (2007), Sun e Xia (2002), Xue et al. (2015) e Xu et al. (2017).

### 3.6.2.3 Atividade antibacteriana de AgNP

A elevada área superficial de AgNP contribui para a ótima eficiência antibacteriana desses nanometais, uma vez que um grande número de átomos interage com a bactéria (NISAR et al., 2019; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011; RAI et al., 2012). Portanto, a propriedade bactericida de nanop prata é fortemente influenciada pelo tamanho da partícula, bem como sua morfologia e concentração. Agnihotri, Mukherji e Mukherji (2014) analisaram AgNP de diversos tamanhos (5 a 100 nm), todas sintetizadas pelo mesmo método, porém com variações nas concentrações de reagentes para controlar o tamanho das partículas geradas. A atividade bactericida das AgNP foi dose e tamanho dependente; os valores de CIM encontrados foram, por exemplo, 20-70 µg/mL (5 nm), 80-130 µg/mL (50 nm) e 110-200 µg/mL (100 nm). Outros estudos também mostram que AgNP menores exibem maior atividade antibacteriana em comparação a nanopartículas com diâmetro maior (AYALA-NÚÑEZ et al., 2009; JEONG; LIM; CHOI, 2014; RAZA et al., 2016). AgNP com bordas e cantos mais pontiagudos, ou não esféricas, apresentaram maior ação biocida em comparação àquelas com bordas e cantos arredondados; ou seja, nanoesferas e nanobastões exibem menor potencial antibacteriano do que nanopartículas triangulares, ou hexagonais por exemplo (GOYAL et al., 2017; HOLMES et al., 2016; PAL; TAK; SONG, 2007; NATEGHI; HAJIMIRZABABA, 2014).

De maneira geral, AgNP agem contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Tabela 18), inclusive cepas de importância na clínica humana, para as quais a OMS requer desenvolvimento de antimicrobianos urgentemente, como espécies pertencentes ao grupo ESKAPEE. Exibem atividade contra MRSA, VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus* ou *S. aureus* resistente à vancomicina), bactérias Gram-negativas MDR produtoras de carbapenemases, como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (CARDOZO et al., 2013; CAVASSIN et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2019; LIAO et al., 2019; SCANDORIEIRO et al., 2016). Também possuem atividade contra bactérias relevantes na indústria de alimentos, como *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *Campylobacter jejuni* (DUFFY et al., 2018; SEONG; GUN, 2017; ZORRAQUÍN-PEÑA et al., 2020). Apresentam ação bactericida contra células planctônicas (BIASI-GARBIN et al., 2015; CAVASSIN et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2019; SCANDORIEIRO et al., 2016) e também previnem a formação de biofilme e erradicam biofilme pré-formado (MEZA-VILLEZCAS et al.,

2019; POMPILIO et al., 2018; SHAFREEN et al., 2017; SINGH et al., 2018).

A atividade antibacteriana de AgNP é dependente do microrganismo. Alguns estudos mostram que bactérias Gram-positivas são mais tolerantes à ação de nanopartícula de prata, possivelmente devido à espessura da peptidoglicana, uma vez que o valor de CIM e o tempo de ação de AgNP são menores para bactérias Gram-negativas; além de estudos de mecanismo de ação mostrarem que os danos estruturais causados em *E. coli* são mais intensos do que em *S. aureus* (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; DALIR et al., 2020; JAIN et al., 2009; KIM et al., 2011; SATHIYASEELAN et al., 2020; SCANDORIEIRO et al., 2016). Alguns estudos reportam que Gram-positivas e Gram-negativas apresentam mesmo grau de sensibilidade a AgNP, uma vez que o nanometal apresenta valor de CIM similar para os dois grupos bacterianos (CAVASSIN et al., 2015; GHOSH et al., 2013; SINGH et al., 2016). É importante destacar que os diferentes estudos variam com relação às cepas testadas (diferentes espécies e isolados clínicos são extensamente utilizados), aos fatores intrínsecos das nanopartículas (tamanho, morfologia e carga, por exemplo) e técnicas de ensaio microbiológico, e todos esses parâmetros podem interferir nas conclusões sobre a atividade antibacteriana de AgNP (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016).

Apesar da atividade antibacteriana de AgNP ser bem estabelecida, não é possível fazer conclusões microbiológicas mais específicas (por exemplo sobre uma faixa de CIM). É importante que os estudos microbiológicos envolvendo AgNP informem os parâmetros do nanomaterial, e também apresentem dados de eficiência antibacteriana seguindo metodologias padronizadas (regulamentação do CLSI, *Clinical & Laboratory Standards Institute*, por exemplo), informando valor de CIM para cepas de referência (ATCC, por exemplo) (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016).

A ação antibacteriana de AgNP (Figura 33) é explicada por quatro principais mecanismos: (1) adesão das nanopartículas à superfície bacteriana, (2) desestabilização de parede e membrana celulares, com alteração de sua permeabilidade, (3) indução de estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e (4) modulação das vias de transdução de sinal (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

A adesão de AgNP às células bacterianas é descrita como um dos primeiros mecanismos de ação. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem a superfície carregada negativamente. A parede celular de Gram-positivas apresenta

**Tabela 18** – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando métodos de síntese, morfologia, tamanho (nm), potencial zeta (mV), faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do nanometal e as bactérias testadas (continua)

<b>AgNP</b>				
<b>Síntese</b>	<b>Morfologia Tamanho Carga</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Referência</b>
AgNP estabilizada por citrato	Esférica 25-40 nm -23 mV	0,612 – 6,125	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Salmonella Typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Ghosh et al. (2013)
Dois métodos de síntese: infusão de açafrão ou <i>Curcuma longa</i> (a) e sobrenadante de <i>E. coli</i> (b)	Esférica (a) 11,1 nm (a) - Esférica (b) 27,28 nm (b) -	71,8 – 143,7 (a) 0,438 – 3,75 (b)	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Meroni et al. (2020)
Extrato das folhas de <i>Carya illinoensis</i>	Esférica 20,34 nm -	16 – 128	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Dalir et al. (2020)

**Tabela 18** – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando métodos de síntese, morfologia, tamanho (nm), potencial zeta (mV), faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do nanometal e as bactérias testadas  
(continuação)

<b>AgNP</b>				
<b>Síntese</b>	<b>Morfologia Tamanho Carga</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Referência</b>
Duas metodologias de síntese: AgNP preparada com peptídeo purificado de <i>Bacillus</i> sp. (a) e AgNP preparada com borohidreto de sódio e estabilizada com citrato (b)	Esférica (a, b) 20-30nm (a) 15–20 nm(b)	0,11 – 6,4 (a) 0,85 – 25 (b)	<i>E. coli</i> , <i>Chronobacter sakazakii</i> , <i>Salmonella enterica</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Patil et al. (2015)
Extrato de <i>Allium cepa</i> ou cebola (a) e <i>Zingiber officinale</i> ou gengibre (b)	Esférica 50-120 nm (a) 15-25 nm (b)	100	<i>S. aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hussein et al. (2019)
Filtrado de <i>Fusarium oxysporum</i> livre de biomassa fúngica	Várias morfologias 55 nm *	6,7	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Andrade et al. (2017)

**Tabela 18** – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando métodos de síntese, morfologia, tamanho (nm), potencial zeta (mV), faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do nanometal e as bactérias testadas (continuação)

<b>AgNP</b>				
<b>Síntese</b>	<b>Morfologia Tamanho Carga</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Referência</b>
Extratos de frutos do Amazonas: Açaí ou <i>Euterpe oleracea</i> (a), Cupuaçu ou <i>Theobroma grandiflorum</i> (b), Murici ou <i>Byrsonima crassifolia</i> (c) e Taperebá ou <i>Spondias mombin</i> (d)	-	8 – 16 (a) 16 – 31 (b) 16 – 31 (c) 31 (d)	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Lima et al. (2019)
Filtrado de <i>Fusarium oxysporum</i> livre de biomassa fúngica	Esférica 77,68 nm -34,6 mV	62,5 – 250 µM	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i>	Scandorieiro et al. (2016)
Filtrado de <i>F. oxysporum</i> livre de biomassa fúngica	-	125 µM	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Biasi-Garbin et al. (2015)
Filtrado de <i>F. oxysporum</i> livre de biomassa fúngica	Esférica 20 nm -13.2 mV	6,6-12	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Marcato et al. (2013)

**Tabela 18** – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando métodos de síntese, morfologia, tamanho (nm), potencial zeta (mV), faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do nanometal e as bactérias testadas  
(continuação)

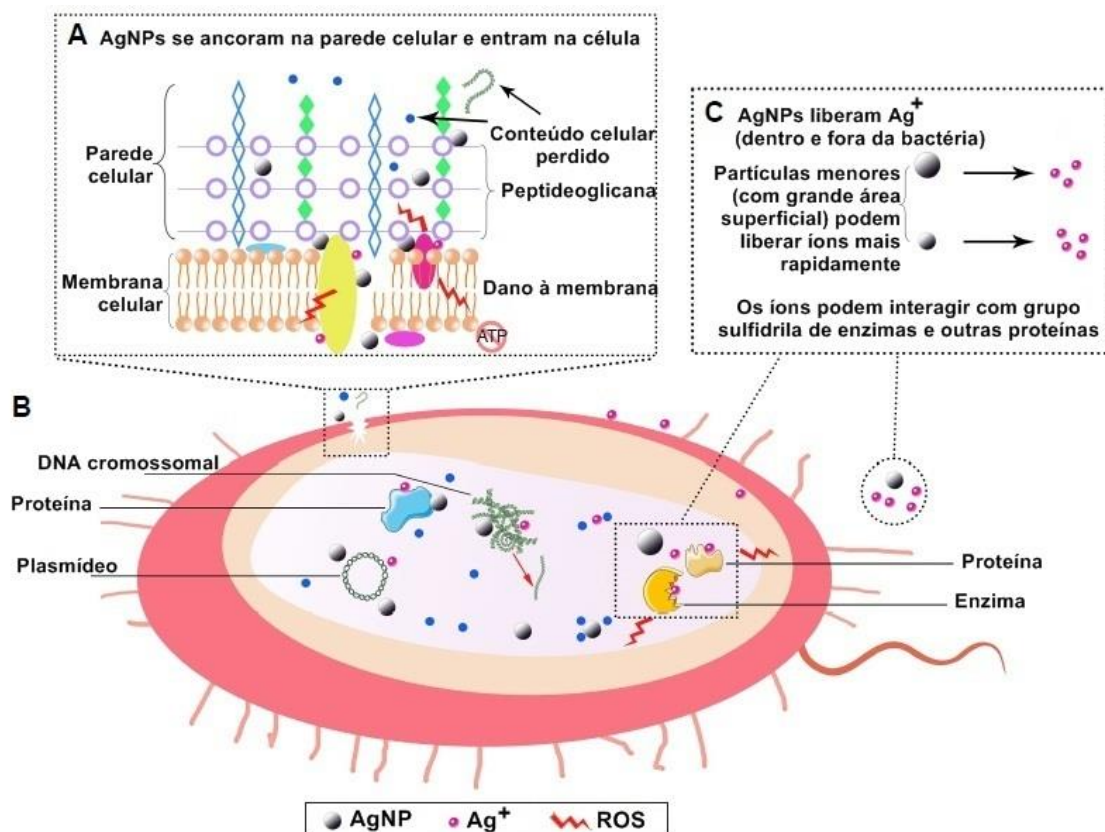
<b>AgNP</b>				
<b>Síntese</b>	<b>Morfologia Tamanho Carga</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Referência</b>
Filtrado de <i>F. oxysporum</i> livre de biomassa fúngica	-	125 µM	<i>S. aureus</i>	Cardozo et al. (2013)
Filtrado de <i>Fusarium scirpi</i> livre de biomassa fúngica	Quase esférica 2-20 nm -	0,025	<i>E. coli</i>	Rodríguez-Serrano et al. (2020)
Síntese com sobrenadante de <i>Streptomyces xinghaiensis</i>	Esférica 5–20 nm – 15.7 mV	16 - 256	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Wypij et al. (2018)
Síntese extracelular com <i>Sporosarcina koreensis</i>	Esférica 102 nm	3 – 3,5	<i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>S. aureus</i>	Singh et al. (2016)
Filtrado de <i>F. oxysporum</i> livre de biomassa fúngica	Esférica 20 nm	6,6 – 12	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Marcato et al. (2013)

**Tabela 18** – Estudos sobre atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNP), indicando métodos de síntese, morfologia, tamanho (nm), potencial zeta (mV), faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do nanometal e as bactérias testadas (conclusão)

AgNP				
Síntese	Morfologia Tamanho Carga	CIM (µg/mL)	Bactérias	Referência
NaBH <sub>4</sub> como redutor e três agentes estabilizantes: PVA (a), quitosana (b) e citrato (c)	10 nm (a)	≥57 (a)	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Enterococcus</i> spp.	Cavassin et al. (2015)
	25 nm (b)	6,7 (b)		
	40 nm (c)	6,7 (c)		
	-17 mV (a)			
	+ 41,1 mV (a)			
	-48,4 mV (a)			
Extrato de <i>Gynura procumbens</i> e encapsulada com quitosana fúngica	Esféricas, triangulares e hexagonais 79,65 nm 53,6 mV	4 – 6,5	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. enterica</i>	Sathiyaseelan et al. (2020)

- Não informado; x foi realizado apenas ensaio de disco difusão. \* Potencial zeta informado no material suplementar da referência.

**Fonte:** próprio autor. O levantamento de dados foi realizado no período de 2016 a 2020.



**Figura 33 – Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de prata (AgNP).** (A) A imagem ampliada mostra que as AgNP podem se ancorar na parede celular bacteriana e consequentemente entrar na célula. Essa ação pode causar danos à membrana e vazamento de conteúdo citoplasmático. Além disso, AgNP ou  $\text{Ag}^+$  podem se ligar a proteínas de membrana celular que estão envolvidas na geração de ATP. (B) AgNP ou  $\text{Ag}^+$  podem entrar na célula microbiana e, em seguida, interagir com estruturas celulares e biomoléculas, como proteínas, enzimas, lipídios e DNA. O aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) leva à peroxidação lipídica, dano ao DNA, oxidação de proteínas, entre outros. (C) AgNP podem liberar de forma sustentada íons  $\text{Ag}^+$  dentro e fora das bactérias, e o  $\text{Ag}^+$  pode interagir com proteínas e enzimas.

**Fonte:** adaptado Qing et al. (2018).

uma camada espessa de peptidoglicana e ácidos teicoicos com carga negativa (proveniente de grupos fosfato). Em Gram-negativas, a parede celular é uma estrutura um pouco mais complexa; além de uma camada delgada de peptidoglicana, possuem uma membrana externa fosfolipídica contendo lipopolissacarídeos (LPS) que contribuem para aumentar a carga superficial negativa do envelope celular (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). As paredes celulares bacterianas, com carga negativa, atraem nanopartículas carregadas positivamente por interações eletrostáticas. Nanopartículas metálicas com carga negativa normalmente apresentam menor atividade antibacteriana. Apesar da carga de superfície influenciar a atividade antibacteriana de AgNP, um aumento na concentração de nanopartículas atenua essa repulsão eletrostática por meio de método de saturação da superfície bacteriana (ABBASZADEGAN et al., 2015; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020).

Após adesão à superfície bacteriana, AgNP menores penetram diretamente na célula, enquanto as maiores ficam retidas fora da bactéria; em ambos casos, AgNP liberam continuamente os íons  $\text{Ag}^+$ . Esses íons se ligam à parede e membrana celulares, e danificam e interferem o funcionamento de tais estruturas; desestabilizam o potencial de membrana, alteram a permeabilidade da célula bacteriana e favorecem a entrada de AgNP maiores (DAKAL et al., 2016; DIBROV et al., 2002; DURÁN et al., 2016; LOK et al., 2006; NISAR et al., 2019; QING et al., 2018; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Análises de microscopia eletrônica mostram a formação de protruções na superfície de bactérias tratadas com AgNP, essas alterações morfológicas sugerem dano à parede celular e membrana citoplasmática (FIGUEIREDO et al., 2019; KIM et al., 2011; SCANDORIEIRO et al., 2016).

Uma vez no interior das células, AgNP e íons  $\text{Ag}^+$  interagem com inúmeras estruturas e biomoléculas, especialmente com grupamentos fosfato e tióis, resultando em disfunção celular a nível de ácido nucleico (por interagir com enxofre e fósforo, podem se ligar ao DNA e complicar o processo de replicação das bactérias) e cadeia respiratória (comprometimento da síntese de ATP, alteração da força próton-motriz) (BOVENKAMP et al., 2013; DURÁN et al., 2016; GORDON et al., 2010; HOLT; BARD, 2005; KIM et al., 2011; LOK et al., 2006; NISAR et al., 2019; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Sua ligação aos grupos fosfato inibe a fosforilação de proteínas, frequentemente envolvida na ativação enzimática; ou seja, AgNP podem inibir transdução de sinal em células bacterianas, resultando finalmente na inibição do crescimento bacteriano (DAKAL et al., 2016; GORDON et al., 2010; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020). Além disso, AgNP induzem a produção de EROs, suprimindo o mecanismo de defesa antioxidante das células; por sua vez, EROs são altamente reativas, com capacidade de oxidar estruturas celulares e biomoléculas, podendo causar desnaturação do DNA, modificações de proteínas e peroxidação lipídica (NISAR et al., 2019; QUINTEROS et al., 2018; THOMBRE et al., 2016).

Apesar da comprovada ação antibacteriana de AgNP, o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido. Diversas evidências sugerem que os íons  $\text{Ag}^+$  são importantes na atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (DURÁN et al., 2016). Nanopartículas com maior área superficial liberam mais íons e também exibem maior atividade antimicrobiana; enquanto nanopartículas com menor área superficial liberam menos íons e exibem atividade antibacteriana mais fraca (ZAWADZKA et al., 2014). Xiu et al. (2012) inferem que a liberação de  $\text{Ag}^+$  é o

mecanismo de ação relevante de AgNP e que características intrínsecas da nanopartícula (morfologia, tamanho e agente estabilizante) apenas influenciam a liberação de íons primariamente; pois em ambiente anaeróbio de síntese e teste de atividade, as AgNP, sem possibilidade de sofrerem oxidação e liberarem íons, apresentaram toxicidade negligenciável para *E. coli*.

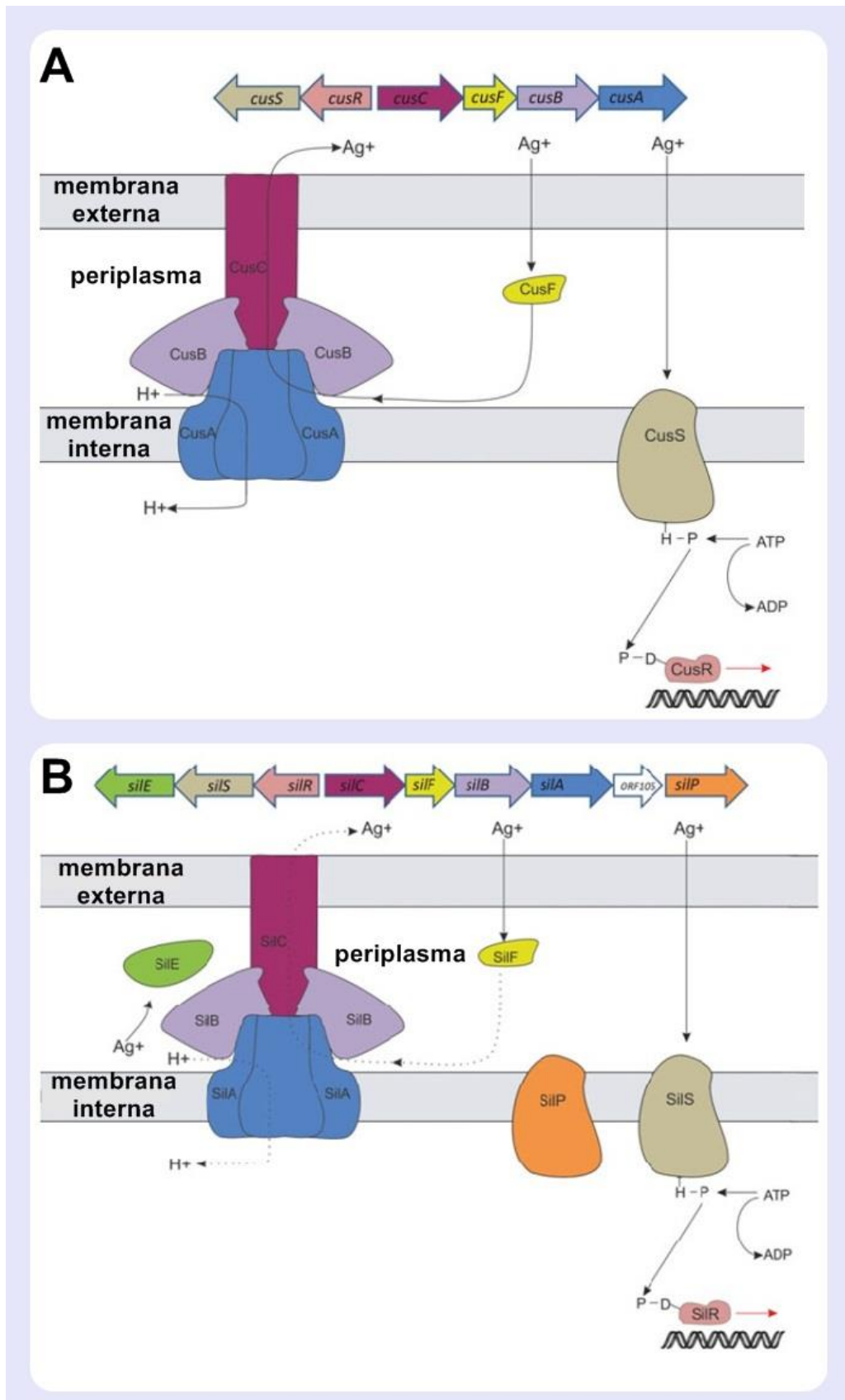
Outros estudos sugerem que o mecanismo de ação de AgNP envolve fatores intrínsecos das nanopartículas, que vão além da liberação dos íons de prata (LOK et al., 2006; YAN et al., 2018; YIN et al., 2011). Yan et al. (2018) mostram, por análise metabolômica, que tanto AgNP quanto AgNO<sub>3</sub> regulam proteínas de membrana que estão associadas ao mesmo padrão de funções em *P. aeruginosa* (como transporte de substâncias, montagem de flagelo ou síntese de ATP), mas apenas AgNP causaram perturbação nas enzimas responsáveis por mecanismo antioxidante de proteção; além disso, 16 proteínas foram afetadas pelos dois tratamentos com prata, 43 proteínas são exclusivamente afetadas por AgNP e 12 proteínas sofrem interferência exclusivamente de AgNO<sub>3</sub>. Lok et al. (2006) destacam que os valores de CIM estão na faixa de nanomolar para AgNP, e micromolar para íons de Ag. De maneira geral, o íon prata é importante no mecanismo de antibacteriano de AgNP; no entanto, a internalização de AgNP e a contribuição direta dessas nanopartículas para o modo de ação precisam ser consideradas (DURÁN et al., 2016).

Apesar de AgNP exibirem ampla atividade antimicrobiana (antifúngica, antiprotozoária, antibacteriana), inclusive contra cepas MDR, a resistência bacteriana à prata já é reportada (DAKAL et al., 2016; DURÁN et al., 2016; MULLER, 2018). O mecanismo de resistência a Ag<sup>+</sup> é bem conhecido, e ocorre por bloqueio da entrada dos íons metálicos na célula (devido a alteração de permeabilidade do envelope celular e por sequestro extracelular de íons que se ligam a polissacarídeos) ou por desintoxicação dos íons que entram no citoplasma (efluxo ativo, conversão enzimática ou sequestro intracelular de Ag<sup>+</sup> por ligação a proteínas) (KEDZIORA et al., 2018).

A resistência bacteriana à prata pode ocorrer por mecanismos endógeno (mutação) e exógeno (adquirido horizontalmente). O primeiro (endógeno) envolve dois pontos de mutação, nos genes *ompR* e *cusS*, que resulta na perda de porinas (OmpC/F) e expressão de sistema de efluxo (sistema CusCFBA). Tais mutações são efeitos da exposição prolongada de bactérias a AgNO<sub>3</sub>; após seis dias

de exposição a concentrações subinibitórias de íons Ag, *E. coli* resistente já é selecionada (RANDALL et al., 2015). O mecanismo exógeno está associado às proteínas Sil, localizadas na membrana celular bacteriana, responsáveis pelo efluxo de íons de prata da célula. Em 1975, *S. Typhimurium* causou a morte de vários pacientes da ala de queimados de um hospital de Massachusetts, nos EUA (*Massachusetts General Hospital*). O patógeno isolado era resistente à prata devido à presença de um plasmídeo de 180 kb, conhecido como pMG101; que também determina resistência a Hg, telurito, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina e ampicilina (KEDZIORA et al., 2018). A região do plasmídeo que confere resistência a prata é formada por nove genes codificadores de proteína Sil, reunidos em três unidades de transcrição (*silRS*, *silE* e *silCFBAP*) (RANDALL et al., 2015). A figura 34 ilustra os mecanismos de resistência a íon prata.

Genes *sil* foram identificados em *Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *S. aureus* (FINLEY et al., 2015). Aparentemente, a resistência à prata é um problema que ocorre amplamente em bactérias Gram-negativas. Mas não é comumente relatada em Gram-positivas, por exemplo, nenhuma linhagem fenotipicamente resistente à prata foi selecionada durante a exposição prolongada de MRSA, e apenas 2 dos 33 isolados apresentaram algum gene *sil*; é provável que o gene *sil* encontrado em bactérias Gram-positivas não é expresso (LOH et al., 2009). Sütterlin et al. (2012) mostraram que, mesmo após 2-14 meses de exposição ao metal, nenhuma cepa de *S. aureus* era positiva para gene *sil* e nem desenvolveu resistência fenotípica à prata. Apesar da maioria dos estudos sobre resistência à prata descrever mecanismos associados a íons metálicos, a resistência a AgNP também já vem sendo relatada, no entanto, assim como seu mecanismo de ação, seu mecanismo de resistência ainda não é bem esclarecido. Sabe-se que a bactéria pode desenvolver resistência a AgNP rapidamente (após 15 dias de exposição) devido a mutações genéticas (GRAVES et al., 2015; LOSASSO et al., 2014). Diante disso, é importante que o uso de AgNP como antimicrobiano seja feito de maneira mais cautelosa; estratégias que minimizem a seleção de cepas resistentes à prata são essenciais, e o emprego de AgNP combinadas a outros antimicrobianos tem se mostrado promissor para resolver esse problema.



**Figura 34 – O papel dos sistemas Sil e Cus nos mecanismos de resistência bacteriana à prata.** No topo da figura, há dois esquemas mostrando a arquitetura genética dos operons *sil* e *cus*. Abaixo, há um resumo esquemático do que é conhecido ou previsto com relação à organização e função desses sistemas. **(A)** O sensor quinase (CusS), ao ligar-se aos íons  $\text{Ag}^+$  ou  $\text{Cu}^+$ , responde fosforilando CusR. O regulador CusR fosforilado medeia a expressão de CusCFBA. CusCBA é um transportador de efluxo

que exporta íons  $\text{Ag}^+$  ou  $\text{Cu}^+$  do periplasma via mecanismo antiporte, no qual CusF é uma proteína periplasmática que se liga a Ag/Cu e transfere tais íons ao sistema CusCBA. **(B)** No sistema Sil, SilCFBA e SilRS possuem função similar aos seus homólogos Cus, mas inclui alguns componentes que estão ausentes no sistema Cus (SilE e SilP). SilE é uma proteína periplasmática de ligação a  $\text{Ag}^+$ , mas está envolvido na captação de íons de prata do espaço periplasmático, enquanto o SilF captura Ag que entrou do espaço extracelular. SilP é um transportador da membrana interna que transporta íons de prata do citoplasma para o espaço periplasmático, onde  $\text{Ag}^+$  será ligado a SilE.

**Fonte:** adaptado de Randal et al. (2015).

### 3.7 COMBINAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS

Atualmente, a combinação de antimicrobianos individuais busca atingir vários objetivos: (i) aumentar o espectro de ação de tratamento empírico, para infecção cujo patógeno não é conhecido, (ii) alcançar efeitos sinérgicos, potencializando o efeito dos antimicrobianos, (iii) redução de dose para minimizar a toxicidade ao hospedeiro, reduzir custos ou atenuar outros efeitos indesejáveis (como efeitos organolépticos por exemplo) e (iv) minimizar a seleção de cepas microbianas resistentes (TYERS; WRIGHT, 2019). Diante da necessidade de prevenir a resistência microbiana, as combinações de antimicrobianos são priorizadas em comparação à monoterapia (BOLLENBACH, 2015; TYERS; WRIGHT, 2019).

As combinações podem ser classificadas em congruente (*congruous*), sincrética (*syncretic*) ou “coalismo” (*coalistic*). A combinação congruente envolve compostos que individualmente possuem atividade antimicrobiana (este conceito é a base para a maioria das combinações entre antimicrobianos). Combinações sincréticas incluem pelo menos um componente que não possui atividade antibiótica (e.g., pares de betalactâmicos e inibidores de betalactamases). O terceiro tipo de combinação, denominado “coalismo”, ocorre entre compostos que por si só não possuem atividade antimicrobiana, mas que juntos são ativos contra microrganismos (TYERS; WRIGHT, 2019).

As interações antimicrobianas entre os compostos também podem ser classificadas em sinérgicas, aditivas ou antagônicas (BOLLENBACH, 2015; TYERS; WRIGHT, 2019). Sinergia acontece quando o efeito dos compostos combinados é maior do que a soma de seus efeitos individuais. O oposto da sinergia é o antagonismo, neste caso, os compostos combinados apresentam menor atividade do que individualmente. Sinergismo e antagonismo são formalmente calculados no laboratório de microbiologia utilizando índice da concentração inibitória fracionária (FICI, *fractional inhibitory concentration index*). A concentração inibitória fracionária

(FIC) é definida pela divisão do valor de CIM do composto em combinação pelo valor de CIM do mesmo composto individualmente, enquanto que o FICI é a soma dos valores de FIC dos dois compostos da combinação. A princípio,  $FICI \leq 1$  sugere sinergia; no entanto, devido a limitações do método de diluição em caldo (diluição de duas vezes acima ou abaixo da CIM), considera-se  $FICI \leq 0,5$  para sinergia e um valor  $\geq 4,0$  para antagonismo. Todos os outros valores são aceitos para indicar nenhuma interação (ODDS, 2003; TYERS; WRIGHT, 2019).

Mas essa abordagem, que considera apenas os dois extremos (sinergismo e antagonismo), pode mascarar interações mais sutis com potencial de informar o mecanismo de ação dos pares de compostos em combinação; desta forma, a aditividade é considerada, já que permite uma medição mais tênue de interações medicamentosas, que não são antagônicas e nem sinérgicas. Na interação aditiva, pressupõe-se que o efeito de dois antimicrobianos em combinação é igual à soma dos efeitos que os mesmos produzem individualmente (TYERS; WRIGHT, 2019). A vantagem de se utilizar FICI é sua simplicidade e velocidade; mas frequentemente, curvas de crescimento e morte bacterianas (testes *time-kill*) são utilizadas para confirmar sinergismo; nestes estudos, combinações sinérgicas devem reduzir o número de células viáveis (UFC/mL) em pelo menos 2 log por mL em comparação ao antimicrobiano isolado mais ativo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1999; TYERS; WRIGHT, 2019).

As diversas maneiras de categorizar as combinações atendem propósitos variados; ou seja, se o objetivo é potencializar o efeito antimicrobiano, torna-se interessante a busca por interações sinérgicas. Já se o propósito é minimizar a seleção de cepas resistentes em determinada população microbiana, tanto combinações sinérgicas, aditivas, bem como antagônicas são potenciais estratégias (CHAIT; CRANEY; KISHONY, 2007; TYERS; WRIGHT, 2019). Atualmente, diante do problema de saúde pública que enfrentamos, retardar a evolução da resistência é a motivação essencial para o uso de combinações de antimicrobianos (BOLLENBACH, 2015).

Se os antimicrobianos combinados possuem múltiplos alvos, várias mutações independentes seriam necessárias para ocorrência de “resistência mediada por mutação” (BOLLENBACH, 2015). Uma análise retrospectiva dos antibióticos já descobertos e desenvolvidos mostra que aqueles que possuem vários alvos, em seu mecanismo de ação, estão menos sujeitos à resistência via mutação de alvo (SILVER,

2007). Por exemplo, a resistência a sulfonamidas pode aparecer rapidamente já que esses compostos têm como alvo uma única enzima metabólica essencial (dihidropteroato sintetase), pois mutações pontuais no gene cromossômico codificador desta enzima já confere resistência. Por outro lado, antimicrobianos como betalactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclinas são mais lentos para sucumbir à resistência por mutação genética nos alvos moleculares. Penicilinas inativam não apenas uma, mas várias enzimas (PBPs) codificadas por muitos genes diferentes. Da mesma forma, tetraciclinas e aminoglicosídeos têm o ribossomo bacteriano como alvo, que consiste de cerca de 50 proteínas e três grandes RNAs ribossômicos (rRNAs) (SILVER, 2011; TYERS; WRIGHT, 2019).

Há mais de meio século, as combinações são exploradas em estudos científicos e aplicações clínicas. Por exemplo, a associação de estreptomicina e penicilina foi relatada em 1950 (JAWETZ et al., 1951), e o uso de trimetoprim com sulfonamidas em 1968 (BUSHBY; HITCHINGS, 1968); ambas associações com objetivo de melhorar o espectro de ação dos antibacterianos. Betalactâmicos associados a inibidores de betalactamases são estudados desde 1976, quando o ácido clavulânico (composto com atividade antibiótica fraca, mas potente ação inibidora de betalactamases) foi combinado com amoxicilina, cuja aplicação clínica com o medicamento conhecido como “Augmentin”. Nos anos seguintes, outros inibidores foram descobertos, como tazobactam e sulbactam. Recentemente, em 2016, o FDA aprovou outro tipo de inibidor, o avibactam (combinado com ceftazidima, com nome de “Avycaz”). Em 2017, o FDA aprovou “Vabomere”, que consiste em combinação do inibidor (vaborbactam) e meropenem (BUSH, 2018; TYERS; WRIGHT, 2019).

Combinações empíricas de antimicrobianos, para aumentar espectro de ação ou prevenir resistência, são comuns na prática clínica atual. Associações de colistina ou tigeciclina com outros antibióticos, por exemplo, têm sido opção de tratamento contra bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos (BASS et al., 2015; DOI, 2019; JACOBS et al., 2017). O tratamento da tuberculose requer terapia antimicrobiana combinada com pelo menos quatro agentes antimicrobianos aplicados sobre o curso de seis meses (KERANTZAS; JACOBS, 2017). Associações também são usadas no tratamento de infecções por Gram-positivas; por exemplo, linezolida combinada a um glicopeptídeo e/ou rifampicina está entre os tratamentos de escolha em infecções graves por MRSA (EADES et al., 2017).

Na atual crise dos antimicrobianos, devemos considerar um critério

adicional na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos: a necessidade desses medicamentos envolverem vários alvos celulares em seu mecanismo de ação. E optarmos por estudar combinação de compostos, ao invés de monoterapias, é uma estratégia que atende essa premissa (RAYMOND, 2019; TACCONELLI et al., 2018; TYERS; WRIGHT, 2019).

Na natureza, a atuação combinada de antimicrobianos provavelmente tem grande importância na corrida evolutiva que envolve efeito antibacteriano e resistência. Uma única cepa de *Streptomyces*, por exemplo, pode abrigar um conjunto de 35 genes para a biossíntese de produtos naturais. Uma única linhagem de *Micromonospora* pode produzir pelo menos 50 compostos naturais diferentes. Ao assumir que menos um quarto destes são antibióticos, ainda resta uma estimativa de 8 a 12 antibióticos de uma única cepa, o que tornaria viável a terapia combinada como uma estratégia natural (FISCHBACH, 2011). Além do mais, as biomoléculas (derivadas de microrganismos, animais ou plantas) possuem características químicas únicas, não encontradas em fármacos sintéticos, o que as tornam valiosíssimas no desenvolvimento de novos antimicrobianos (TYERS; WRIGHT, 2019).

Produtos naturais em combinação têm se destacado nos estudos que objetivam minimizar a emergência de resistência e inibir o crescimento de espécies MDR. Os óleos essenciais são promissores para serem utilizados em associações porque sua natureza multicomponente (várias biomoléculas em sua composição) tem potencial para minimizar a ocorrência de resistência. Além do mais, um dos principais mecanismos de ação desses óleos é a membrana bacteriana, alterações estruturais ou de composição da membrana facilmente afetariam a viabilidade da célula, sugerindo que os agentes que a tem como alvo apresentam baixo potencial para o desenvolvimento de resistência (YAP et al., 2014).

O OEO, bem como seus principais bioativos, CAR e Thy, apresentam efeito sinérgico ou aditivo quando associados com diversos antimicrobianos (e.g., tosufloxacina, levofloxacino, ciprofloxacino, eritromicina, fluoroquinolonas, doxiciclina, lincomicina, vancomicina, amoxicilina, ceftiofur, ceftriaxona, gentamicina, canamicina, polimixina, ampicilina, bacitracina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, penicilina, estreptomicina, sulfametoxazol, tetraciclina e amicacina), inclusive contra cepas bacterianas resistentes a tais fármacos convencionais (HAMOUD et al., 2014; LANGEVELD et al., 2014; MAGI; MARINI; FACINELLI, 2015; XIAO et al., 2020; YAP et al., 2014). Os terpenoides derivados do orégano também apresentam atividade

antibacteriana aditiva ou sinérgica quando combinados a outros óleos essenciais e seus principais componentes (tomilho, canela, hortelã-pimenta, manjeriço, eucalipto, melaleuca ou *tea tree*, *Lippia multiflora*, erva-cidreira, alecrim, *Salvia triloba* ou sálvia-grega, eugenol, cominho, linalol, mentol e cinemaldeído) (AYARI et al., 2020; BASSOLÉ; JULIANI, 2012; CHO et al., 2020; PEI et al., 2009; STOJKOVIĆ et al., 2013).

AgNP também aumentam a atividade de vários antibacterianos convencionais, inclusive contra cepas MDR, uma vez que efeito sinérgico ou aditivo tem sido reportado em associações contendo nanopartícula de prata e diversos fármacos (e.g., amoxicilina, clindamicina, eritromicina, penicilina, vancomicina, ampicilina, canamicina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina) (DAKAL et al., 2016; DURÁN et al., 2010; KORA; RASTOGI, 2013; SHAHVERDI et al., 2007; VAZQUEZ-MUÑOZ et al., 2019). O efeito sinérgico da associação entre alguns antimicrobianos convencionais e AgNP muito provavelmente se deve ao fato desses nanometais agirem como carreadores dos fármacos tradicionais. A amoxicilina possui sítios de ligação para AgNP, como grupos hidroxila, amida e pontes de enxofre, e isso pode explicar a interação entre os dois antimicrobianos (DURÁN et al., 2010; LI et al., 2005). AgNP estabilizadas com PVP, por exemplo, atuam como carreadores ativos para cloranfenicol, já que PVP age como sítio de ligação para este fármaco convencional (DURÁN et al., 2010; PATIL et al., 2009).

AgNP também são associadas a outros antimicrobianos alternativos, por exemplo, as nanopartículas sintetizadas extracelularmente utilizando *F. oxysporum* (DURÁN et al., 2005) exibiram efeito sinérgico ou aditivo com *nanodots* de carbono (ANDRADE; NAKAZATO; DURÁN, 2017), o fármaco sinvastatina (BOCATE et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2019), fenazina-1-carboxamida (CARDOZO et al., 2013), eugenol (BIASI-GARBIN et al., 2015), óleo de copaíba ou *Copaifera multijuga* (OTAGUIRI et al., 2017), OEO ou óleo de *O. vulgare* (SCANDORIEIRO et al., 2016). Cardozo et al. (2013) reportaram que a combinação de um composto extracelular (fenazina-1-carboxamida), produzido por *P. aeruginosa*, com AgNP (obtidas pelo método de Duran et al., 2005) reduziu o valor de CIM da fenazina em 32 vezes contra MRSA. O estudo de Biasi-Garbin et al. (2015) mostra que eugenol e as mesmas AgNP apresentam efeito inibitório sinérgico sobre isolados clínicos e cepa referência de *S. agalactiae*.

Um estudo anterior, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa,

mostrou que a associação de OEO e AgNP (sintetizada com componentes de *F. oxysporum*) apresenta ação bactericida de amplo espectro e em curto tempo (principalmente para bactérias Gram-negativas) contra célula planctônicas, bem como exibe efeito antibacteriano sinérgico ou aditivo contra diversos patógenos, como *S. mutans*, MRSA, *S. enterica* Enteritidis, *S. enterica* Typhimurium, *K. pneumoniae* e bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos, como *E. coli* e *A. baumannii* (SCANDORIEIRO et al., 2016). Além da ação rápida contra diversas espécies bacterianas, tanto de referência como MDR, essa associação tem potencial para minimizar as limitações de cada um dos antimicrobianos envolvidos; uma vez que o óleo em combinação é utilizado em menor dose, pode-se reduzir seus efeitos organolépticos e conseqüentemente amplia-se as possibilidades para sua aplicação, por outro lado, a combinação provavelmente retarda a emergência de resistência a AgNP.

A resistência a múltiplos antimicrobianos associada à falta de fármacos eficazes para tratar essas infecções é catastrófica para a saúde pública, justificando a necessidade de pesquisa de novos antimicrobianos (O'NEILL, 2016). Uma vez que o OEO combinado a AgNP apresentou excelente ação antibacteriana, tornou-se importante investigar e esclarecer alguns aspectos dessa associação, tais como mecanismo de ação antibacteriano, efeito antibiofilme, impacto que possuem na seleção de cepas resistentes, potencial citotóxico, bem como a combinação de compostos majoritários do OEO (CAR e Thy) com tais nanopartículas, visando ampliar o conhecimento sobre a atividade antibacteriana dessas composições.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\* Segundo ABNT NBR 6023:2018

ABBASZADEGAN, A. et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015.

ABDULLAHI, U. F. et al. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. **Veterinary World**, v. 9, n. 1, p. 12–18, 2016.

ABISADO, R. G. et al. Bacterial *quorum sensing* and microbial community interactions. **mBio**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2018.

ADAM, R. D. Antimicrobial resistance at a community level. **The Lancet Planetary Health**, v. 2, n. 11, p. 473–474, 2018.

ADEDEJI, W. A. The treasure called antibiotics. **Annals of Ibadan Postgraduate Medicine**, v. 14, n. 2, p. 56–57, 2016.

AFROJA, S. et al. Antibacterial Activity of Different Citrus Fruits. **Specialty Journal of Medical research and Health Science**, v. 2, n. 1, p. 25–32, 2017.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Cartilha sobre nanotecnologia**. 2010. Disponível em: <[http://lqes.iqm.unicamp.br/images/publicacoes\\_teses\\_livros\\_resumo\\_cartilha\\_abdi.pdf](http://lqes.iqm.unicamp.br/images/publicacoes_teses_livros_resumo_cartilha_abdi.pdf)>. Acesso em: jun. 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Lista de antimicrobianos registrados na ANVISA**. 2017. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_174\\_2017\\_.pdf/81f8ec51-3db9-42b7-9ed8-0e30586430c3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_174_2017_.pdf/81f8ec51-3db9-42b7-9ed8-0e30586430c3)>. Acesso em: mar. 2020.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

AGRIPINO, D. G. et al. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest – ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, 2004.

AIRI, S. et al. Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus* and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, 2020.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73, n. 8, p. 2003–2020, 2018.

ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. **Surgical Infections**, v. 10, n. 3, p. 289–292, 2009.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p.201–2017, 2012.

ALVAREZ, M. V. et al. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-*quorum sensing* and food antimicrobial agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. DEC, p. 1–7, 2014.

AL-WABEL, N. A.; FAT'HI, S. M. Antimicrobial activities of spices and herbs. **II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012**, 2012.

AMARAL, V. C. S. et al. Effect of carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. biofilms on polypropylene. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 12, p. 2639–2643, 2015.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Use of prophylactic antibiotics in labor and delivery. **Obstetrics & Gynecology**, v. 117, n. 6, p. 1472–1483, 2011.

AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 134, p. 1–7, 2010.

ANDRADE, P. F.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N. Additive interaction of carbon dots extracted from soluble coffee and biogenic silver nanoparticles against bacteria. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 838, 2017.

ANDRÉS, M. F. et al. Nematicidal activity of essential oils: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 371–390, 2012.

ASIF, M.; ALVI, I. A.; UR REHMAN, S. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1249–1260, 2018.

ATKI, Y. EL et al. Antibacterial efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 2, p. 306–309, 2019.

ÁVILA, Janaína Medeiros de. **Fitoquímica, atividades antimicrobiana e de inibição enzimática de *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) e *Valeriana polystachya* (Caprifoliaceae) e obtenção de derivados de metabólitos de *V. polystachya***. 2018. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

AYALA-NÚÑEZ, N. V. et al. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter. **Nanobiotechnology**, v. 5, n. 1, p. 2–9, 2009.

AYARI, S. et al. Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus* and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A. **Microbial Pathogenesis**, 2020.

AZEREDO, J. et al. Critical Reviews in biofilm methods, **Critical Reviews In Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2017.

BAHAR, A. A. et al. Controlling persister and biofilm cells of Gram-negative bacteria with a new 1,3,5-triazine derivative. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 696–710, 2015.

BAKSHANI, C. R. et al. Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 4, n. 14, 2018.

BALCÁZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1216, p. 1–9, 2015.

BARKAT, A. et al. Silver Nanoparticles and their Antimicrobial Applications. **Current Nanomedicine**, v. 8, 2018.

BARROS, J. C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1139–1143, 2009.

BASS, S. N. et al. Mortality risk factors for critically ill patients with carbapenem-resistant bacteremia: impact of combination antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3748–3753, 2015.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.

BÉBÉAR, C. M.; PEREYRE, S. Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v. 5, p. 263–271, 2005.

BENGOECHEA, J. A.; PESSOA, J. S. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, p. 123–144, 2019.

BENTO, M. H. L. et al. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals - Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 9, p. 449–458, 2013.

BERCK, V. et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 236–239, 2012.

BERTHOLD-PLUTA, A. et al. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 5, p. 1137–1147, 2019.

BETANCOURT, L. et al. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 21–31, 2012.

- BHUSHAN, B. Biomimetics: Lessons from nature - an overview, **Philosophical Transactions of The Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Science**, v. 2009, n, 367, 2009.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.
- BOCATE, K. P. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 79–86, 2019.
- BOGINO, P. C. et al. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838–15859, 2013.
- BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 1–9, 2015.
- BOUYAHYA, A. et al. *Origanum compactum* Benth: A review on phytochemistry and pharmacological properties. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 5, n. 4, 2016.
- BOVENKAMP, G. L. et al. The interaction of silver ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* – an X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopy study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 20, p. 6385–90, 2013.
- BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **The American Perfumer and Essential Oil Review**, v. 66, p. 25-28, 1955.
- BRAZIL FLORA GROUP. Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v.69 n. 4, 2018.
- BRIGHENTI, F. L. et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. **Caries Research**, v. 48, n.5, p. 353–360, 2014.
- BURDUSEL, A.-C. et al. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 681, p. 1–25, 2018.
- BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162–167, 2003.

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

BUSH, K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, 2018.

BUSHBY, M.; HITCHINGS, G. H. Trimethoprim, a sulphonamide potentiator, **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 90, p. 72–90, 1968.

CABALLERO, N. E. D. et al. **Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e no tratamento dos efluentes produzidos**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. Procurador: Maria Cristina Valim Lourenço Gomes. BR n° PI 0605681-4 A. Depósito: 27 de setembro de 2006.

CAILLET, S. et al. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. 499–508, 2009.

CARAHER, E. et al. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm *in vitro*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 213–216, 2006.

CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 12, 2013.

CAVASSIN, E. D. et al. Comparison of methods to detect the *in vitro* activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 64, p. 1–16, 2015.

CAZELLA, L. N. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. January, p. 1–9, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About antibiotic resistance**. 2020c. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. Acesso em: mar. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance: a global threat**. 2020a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/stories/ar-global-threat.html>>. Acesso em: mar. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Biggest threats and data**, 2020b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>>. Acesso em: mar. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Infographic: antibiotic resistance the global threat**. 2019. Disponível em:

<[https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/antibiotic-resistance/antibiotic\\_resistance\\_global\\_threat.htm](https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/antibiotic-resistance/antibiotic_resistance_global_threat.htm)>. Acesso em: mar. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **One Health Basics**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html>>. Acesso em: mar. 2020.

CERI, H. et al. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilm. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771–1776, 1999.

CHAFTAR, N. et al. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2016.

CHAIT, R.; CRANEY, A.; KISHONY, R. Antibiotic interactions that select against resistance. **Nature**, v. 446, n. 7136, p. 668–671, 2007.

CHALHOUB, H. et al. Loss of activity of ceftazidime-avibactam due to Mex-AB-OprM efflux and overproduction of AmpC cephalosporinase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients suffering from cystic fibrosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2018.

CHAMBERLAIN, G. British maternal mortality in the 19th and early 20th centuries. **Journal of The Royal Society of Medicine**, v. 99, p. 559–563, 2006.

CHAN, S. et al. Perioperative antibiotics for preventing post-surgical site infections in solid organ transplant recipients. **Cochrane Database of Systematic Review**, 2018.

CHANDKI, R.; BANTHIA, P.; BANTHIA, R. Biofilms: A microbial home. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 2, p. 111–114, 2011.

CHO, Y. et al. Synergistic activities of gaseous oregano and thyme thymol essential oils against *Listeria monocytogenes* on surfaces of a laboratory medium and radish sprouts. **Food Microbiology**, v. 86, 2020.

CHYLKOVA, T. et al. Susceptibility of salmonella biofilm and planktonic bacteria to common disinfectant agents used in poultry processing. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 7, p. 1072–1079, 2017.

CLÉBIS, V. H. et al. Antibacterial effect and clinical potential of honey collected from *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier (1836) and Africanized bees *Apis mellifera* Latreille and their mixture. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, 2019.

CLEFF, M. B. et al. *In Vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 116–123, 2010.

CLEFF, M. B. et al. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704–709, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**. Document M07 – A10. Wayne, PA. 2015.

CODJOE, F. S.; DONKOR, E. S. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, 2017.

COLLIGNON, P. et al. Articles Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 2, n. 9, p. e398–e405, 2018.

COLOMB-COTINAT, M. et al. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 5, n. 56, 2016.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Pareceres**. 2015. Disponível em: <<http://www.cremesp.org.br/?siteAcao=Pareceres&dif=s&ficha=1&id=13237&tipo=PA RE CER&orgao=Conselho%20Regional%20de%20Medicina%20do%20Estado%20de%20S%EA3o%20Paulo&numero=82003&situacao=&data=22-04-2015>>. Acesso em: jun. 2015.

CORLETT, R. T. Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. **Plant Diversity**, v. 38, n. 1, p. 10–16, 2016.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, 2017.

COSTERTON, J. W. Antifouling. *In*: NATIONAL RESEARCH COUNCIL, DIVISION ON EARTH AND LIFE STUDIES, COMMISSION ON LIFE SCIENCES, OCEAN STUDIES BOARD, BOARD ON BIOLOGY. **Opportunities for Environmental Applications of Marine Biotechnology**. EUA: National Academy Press, 1999. 186 p.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, 1978.

COTTON, L.; GRAHAM, R.; LEE, R. The role of alginate in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 13, p. 58–62, 2009.

COUTO, C. S. F. et al. Chemical composition and antifungal properties of essential oil of *Origanum vulgare* linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 1207–1212, 2015.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRADER, M. F.; VARACALLO, M. Preoperative antibiotic prophylaxis. **New England Journal of Medicine**, 2020.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 2005.

D’COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457–461, 2011.

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils as antiviral agents. Potential of essential oils to treat SARS–Cov–2 infection: An in–silico investigation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, 2020.

DAKAL, T. C. et al. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–17, 2016.

DALIR, S. J. B. et al. Characterization and the evaluation of antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized from *Carya illinoensis* leaf extract. **Heliyon**, v. 6, 2020.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

DE CAMPOS, A. C. L. P. et al. Virulence genes and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from cheese made from unpasteurized milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, 2018.

DELGADO-GARDEA, M. C. E. et al. Multidrug-resistant bacteria isolated from surface water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 597, p. 1–15, 2016.

DENG, S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 847, 2020.

DHAWDE, R. et al. Antibiotic resistance characterization of environmental *E. coli* isolated from river, Pune District, India. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1247, p. 1–15, 2018.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303–336, 2012.

DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668–2670, 2002.

DOI, Y. Treatment options for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, p. 565–575, 2019.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

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

DREADEN, E. C. et al. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

DU, E. et al. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2015.

DU, E. et al. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 58, 2015.

DUARTE, F. C. P. et al. Knowledge and practice of nursing professionals about prophylaxis of ophthalmia neonatorum. **Escola Anna Nery**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2019.

DUFFY, L. L. et al. Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. **Food Control**, 2018.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1609–1624, 2011.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, 2005.

DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949–959, 2010.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2016.

DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; SEABRA, A. B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6555–6570, 2016.

EADES, C. et al. Antimicrobial therapies for Gram-positive infections. **Clinical Pharmacist**, 2017.

EBANI, V. V. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* strains isolated from canine dermatitis. **Microorganisms**, v. 8, n. 252, p. 1–16, 2020.

EL-KALAMOUNI, C. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 30, 2017.

EL-NOUR, K. M. M. A.; AL-WARTHAN, A.; AMMAR, R. A. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 135–140, 2010.

EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 19200–19213, 2020.

ETYMOLOGIA: *Klebsiella*. **Emerging Infectious Diseases**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294997/>>. Acesso em: jul. 2020.

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR FEED ADDITIVES. **Evaluation report on the analytical methods submitted in connection with the application for authorisation of a feed additive according to regulation (EC) No 1831/2003(2019)**. 2018. Disponível em: <[https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/finrep\\_fad-2010-0381\\_oreganooil.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/finrep_fad-2010-0381_oreganooil.pdf)>. Acesso em: jun. 2020.

FALCÓ, I. et al. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 51, n. 2017, p. 220–228, 2018.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

FEYNMAN, R. P. **There's Plenty of Room at the Bottom**. 1960. Disponível em: <<http://www.nanoparticles.org/pdf/Feynman.pdf>>. Acesso em: nov. 2019.

FIGUEIREDO, E. P. et al. New approach for simvastatin as an antibacterial: synergistic effect with bio-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 7975–7985, 2019.

FINLEY, P. J. et al. Unprecedented silver resistance in clinically isolated Enterobacteriaceae: Major Implications for burn and wound management. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4734–4741, 2015.

FISCHBACH, M. A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 519–523, 2011.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, 1929.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H.-C.; WUERTZ, S. Bacteria and Archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Substances Generally Recognized As Safe**. 2019. Disponível em:

<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=182.20>>. Acesso em: jun. 2020.

FORTESCUE-BRICKDALE, J. M.; M.A.; OXON., M. D. Collargol: a review of some of its clinical applications, with experiments on its antiseptic action. **Bristol Medical-Chirurgical Journal**, v. 21, n. 82, 1903.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 430–449, 2017.

FOURNOMITI, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, 2015.

FREESTONE, I.; MEEKS, N. The Lycurgus Cup – A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, p. 270–277, 2007.

GALDIERO, S. et al. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. **Molecules**, v. 16, p. 8894–8918, 2011.

GALIÉ, S. et al. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 898, 2018.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 2019.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049–1056, 2008.

GAVAHIAN, M. et al. Essential oils as natural preservatives for bakery products: Understanding the mechanisms of action, recent findings, and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, 2018.

GHOSH, I. N. et al. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4721–4731, 2013.

GILLING, D. H. et al. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 5, p. 1149–1163, 2014.

GIL-PEROTIN, S. et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: A state of concept. **Critical Care**, v. 16, n. 3, 2012.

GLOAG, L. et al. Advances in the Application of Magnetic Nanoparticles for Sensing. **Advanced Materials**, v. 31, n. 48, p. 1–26, 2019.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Essential Oils Market Size By Application (Orange oil, Lemon oil, Eucalyptus oil, Clove oil, Peppermint oil, Jasmine oil, Rosemary oil, Corn mint oil, Citronella oil, Geranium, Spearmint oil, Lavender oil, Tea tree**

oil and others), **By Application (Food & beverage, Aromatherapy, Cosmetics & Toiletries, Pharmaceuticals, Cleaning & Home care, Animal Feed, Fragrances and Others) Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Competitive Market Share & Forecast, 2019 – 2026**. 2019. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/essential-oil-market>>. Acesso em: jun. 2020.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Silver Nanoparticles Market Size By Application (Healthcare & Lifesciences, Textiles, Electronics & IT, Food & Beverage), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2018 – 2024**. 2018. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/silver-nanoparticles-market>>. Acesso em: abr. 2020.

GNANAMANI, A.; HARIHARAN, P.; PAUL-SATYASEELA, M. *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. In: ENANY, Shymaa; ALEXANDER, Laura Crotty. **Frontiers in *Staphylococcus aureus***. IntechOpen, 2017.

GONG, J. et al. Susceptibility of *Mutans streptococci* in the Planktonic and Biofilm State to Erythrosine. **the Journal of the Korean Academy of Pedatric Dentistry**, v. 46, n. 2, p. 135–138, 2019.

GORDON, O. et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4208–4218, 2010.

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572–575, 2016.

GOUNARIS, Y. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum x intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 249–258, 2002.

GOVENDER, T. et al. Antimicrobial properties of the skin secretions of frogs. **South African Journal of Science**, v. 108, n. 5-6, p. 1–6, 2012.

GOYAL, D. et al. Correlation of edge truncation with antibacterial activity of plate-like anisotropic silver nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 20429–20437, 2017.

GRAND VIEW RESEARCH. **Essential Oils Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Food & Beverages, Spa & Relaxation), By Product (Orange, Peppermint), By Sales Channel, And Segment Forecasts, 2020 - 2027**. 2020. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market>>. Acesso em: jun. 2020.

GRAVES, J. L. et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 42, p. 1–13, 2015.

GRIGORE-GURGU, L. et al. Biofilms formed by pathogens in food and food processing environments. In: **Bacterial Biofilm**. IntechOpen, 2019.

- GUAZZELLI, M. J.; PEREZ, J. **Nanotecnologia - A manipulação do invisível**. 2009. Disponível em:  
<[http://www.centroecologico.org.br/novastecnologias/novastecnologias\\_1.pdf](http://www.centroecologico.org.br/novastecnologias/novastecnologias_1.pdf)  
<http://www.fundacentro.gov.br/arquivos/projetos/nanotecnologia/literatura/Nanotecnologia-A-Manipulacao-do-Invisivel.pdf> >. Acesso em: mai 2020.
- GUENTHER, E. **The Essential Oils - History - Origin in Plants - Production – Analysis**. Read Books Ltd, 1948. 452.
- GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. Synthesis of silver nanoparticles mediated by Fungi: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–16, 2019.
- GUIMARÃES, A. C. et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 1–12, 2019.
- GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1–15, 2016.
- GUPTA, S.; LASKAR, N.; KADOURI, D. E. Evaluating the effect of oxygen concentrations on antibiotic sensitivity, growth, and biofilm formation of human pathogens. **Microbiology Insights**, v. 9, p. 37–46, 2016.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, 2007.
- GÜZEL, R.; ERDAL, G. Synthesis of silver nanoparticles. In: MAAZ, Khan. **Silver Nanoparticles - Fabrication, Characterization and Applications**. IntechOpen, 2018.
- HAJAR, R. The Air of History (Part II) Medicine in the Middle Ages. **Heart Views**, v. 13, n. 4, p. 158–162, 2012.
- HAMOUD, R. et al. Phytomedicine synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 21, n. 4, p. 443–447, 2014.
- HAN, F. et al. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 18, n. 1, p. 79–84, 2017.
- HANAN, N. A. et al. Cytotoxicity of plant-mediated synthesis of metallic nanoparticles: a systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1725, 2018.
- HANEY, E. F. et al. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. **Biomolecules**, v. 8, n. 2, p. 1–22, 2018.
- HANNIG, C. et al. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 1–7, 2010.

HENTZER, M. et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5395–5401, 2001.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **Acta Pathologica, Microbiologica e Immunologica Scandinavica**, v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017.

HØIBY, N.; AXELSEN, N. H. Identification and quantitation of precipitins against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis by means of crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel. **Acta Pathologica, Microbiologica e Immunologica Scandinavica**, v. 81B, n. 3, 1973.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1663–1674, 2010.

HOLLMANN, B.; PERKINS, .M; WALSH, D. [20--?]. **Biofilms and their role in pathogenesis**. Disponível em: <<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/biofilms-and-their-role-in#:~:text=The%20role%20of%20biofilms%20in%20pathogenesis&text=However%2C%20biofilms%20are%20more%20often,human%20diseases%20and%20plant%20infections.&text=The%20persistence%20of%20these%20mucoid,of%20a%20distinct%20antibody%20response>>. Acesso em: nov. 2010.

HOLMES, A. M. et al. Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against micro-organisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 10, p. 1503–1514, 2016.

HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. **Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 13214–13223, 2005.

HUSSEIN, E. A. M. et al. Biologically synthesized silver nanoparticles for enhancing tetracycline activity against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

HYLDGAARD, M. et al. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1–24, 2012.

IDRIS, F. N.; NADZIR, M. M. Antimicrobial activity of centella asiatica on *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 56, p. 1381–1386, 2017.

INITIATIVE NATIONAL NANOTECHNOLOGY. **Nanotechnology Timeline**. Disponível em: <<https://www.nano.gov/timeline>>. Acesso em: jun. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Expectativa de vida do brasileiro sobe para 75,2 anos**. 2018. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-12/expectativa-de-vida-do-brasileiro-sobe-para-752-anos-mostra-ibge>>. Acesso em: mar. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Expectativa de vida dos brasileiros aumenta para 76,3 anos em 2018**. 2019. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/26103-expectativa-de-vida-dos-brasileiros-aumenta-para-76-3-anos-em-2018#:~:text=A%20expectativa%20de%20vida%20dos,longevidade%3A%2079%2C9%20anos.>>. Acesso em: mar. 2020.

INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **Future Global Governance for Antimicrobial Resistance**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG\\_Future\\_global\\_governance\\_for\\_AMR\\_120718.pdf?ua=1](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_Future_global_governance_for_AMR_120718.pdf?ua=1)>. Acesso em: mar. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Methyleugenol**. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373178/>>. Acesso em: jun. 2020.

IRAVANI, S.; KORBKANDI, H.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p.385–406, 2014.

ISO 9235:2013. **Aromatic natural raw materials — Vocabulary**. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en>>. Acesso em: jun. 2010.

JACOBS, D. M. et al. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 76, p. 1–12, 2017.

JAIN, J. et al. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 2009.

JAWETZ, E. et al. Studies on antibiotic synergism and antagonism. **Journal of Bacteriology**, v. 64, n. 1), p. 29–39, 1951.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050–1074, 2018.

JENDRESEN, M. D. et al. Microtopography and clinical adhesive-ness of an acid etched tooth surface. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 39, p. 47–53, 1981.

JENDRESEN, M. D.; GLANTZ, P.-O. Clinical adhesiveness of selected dental materials. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 39, n. 1, p. 39–45, 1981.

JEONG, Y.; LIM, D. W.; CHOI, J. Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2014, 2014.

JIANG, Q. et al. Quorum Sensing: A prospective therapeutic target for bacterial diseases. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

JOHNJULIO, W. et al. Introduction to biofilms in family medicine. **Southern Medical Journal**, v. 105, n. 1, p. 24–29, 2012.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–12, 2019.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p.123–140, 2004.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300–305, 2017.

KARADAĞLIOĞLU, Ö. İ. et al. Antibacterial activities of herbal toothpastes combined with essential oils against *Streptococcus mutans*. **Pathogens**, v. 8, n. 1, 2019.

KARAM, L. et al. Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, n. January 2018, p. 42–47, 2019.

KASMAR, A. G.; HOOPER, D. Farmacologia das infecções bacterianas: síntese da parede celular. In: GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica e da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Ed.), 2009. p. 562 – 578.

KEDZIORA, A. et al. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

KERANTZAS, C. A.; JACOBS, W. R. Origins of combination therapy for tuberculosis: lessons for future antimicrobial development and application. **mBio**, v. 8, n. 2, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019.

KI, V.; ROTSTEIN, C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 173–184, 2008.

KIEVIT, T. R.de; IGLEWSKI, B. H. *Quorum sensing* and microbial biofilms low. In: WILSON, Michael; DEVIN, Deirdre (Ed.). **Medical Implications of Biofilms**. Cambridge University Press, 2003, p. 18–35.

KIM, S. H. et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77–85, 2011.

KOBAYASHI, R. K. T., NISHIO, E. K.; SCANDORIEIRO, S., SAIKAWA, G. I. A., DA ROCHA, S. P. D., AND NAKAZATO, G. Metallic nanoparticles as a potential

antimicrobial for catheters and prostheses. In: GRUMEZESCU, Alexandru; BUTU, Alina (Org.). **Materials for Biomedical Engineering**. Elsevier, 2019, p. 153–196.

KOCIĆ-TANACKOV, S. D. et al. Antifungalna aktivnost ekstrakta origana (*Origanum vulgare* L.) na rast *Fusarium* i *Penicillium* vrsta izolovanih iz hrane. **Hemijska Industrija**, v. 66, n. 1, p. 33–41, 2012.

KOGA, V. L. et al. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 6, p. 479–485, 2015.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1991. 24 p.

KOKKINI, S. et al. *Autumn* essential oils of Greek oregano. **Chemotaxonomy**, v. 44, n. 5, p. 883–886, 1997.

KOLAHALAM, L. A. et al. Review on nanomaterials: Synthesis and applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 18, p. 2182–2190, 2019.

KORA, A. J.; RASTOGI, I. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model Gram-Negative and Gram-positive bacteria. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2013.

KOZICS, K. et al. The effect of ten essential oils on several cutaneous drug-resistant microorganisms and their cyto/genotoxic and antioxidant properties. **Molecules**, v. 24, n. 4570, p. 1–15, 2019.

KUMAR, S. V. et al. High conversion synthesis of nanoparticles using microwave technology. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 169–174, 2011.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.

LANE, N. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences**, v. 370, n. 1666, 2015.

LANGVELD, W. T. et al. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, 2014.

LAXMINARAYAN, R.; CHAUDHURY, R. R. Antibiotic resistance in India: drivers and opportunities for action. **Plos Medicine**, v. 13, n. 3, 2016.

LEBRETON F, WILLEMS RJL, GILMORE MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: GILMORE, Michael S. et al. (Ed.) **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014, p. 5–63.

LEE, J. H. et al. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 12, p. 4819–4827, 2011.

LEE, K.; YOON, S. Y. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1053–1064, 2017.

LEMIRE, J. A; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature reviews Microbiology**, v. 11, p. 371–384, 2013.

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

LI, B. et al. LFB: A novel antimicrobial brevinin-like peptide from the skin secretion of the Fujian large headed frog, *Limnonectes fujianensi*. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, 2019.

LI, P. et al. Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 1912–1917, 2005.

LIAO, S. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 1469–1487, 2019.

LIGON, B. L. et al. Sir Howard Walter Florey — The force behind the development of penicillin. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 109–114, 2004.

LIMA, K. O. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Amazon fruits. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 179–188, 2019.

LIU, Q. et al. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1283, 2017.

LIYA, S. J.; SIDDIQUE, R. Determination of antimicrobial activity of some commercial fruit (apple, papaya, lemon and strawberry) against bacteria causing urinary tract infection. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 8, n. 3, p. 95–99, 2018.

LOH, J. V et al. Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. **International Wound Journal**, v. 6, n. 1, p. 32–38, 2009.

LOK, C. N. et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916–924, 2006.

LONGHI, C. et al. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 54, p. 428–432, 2016.

LOSASSO, C. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 227, 2014.

LOUDON, I. Maternal mortality in the past and its relevance to developing countries today. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, 2000.

LUNA, A. et al. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 366–370, 2010.

LUQMAN, S. et al. Antimicrobial activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 69–75, 2008.

MACHADO, L. F. et al. Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. **Experimental Parasitology**, v. 211, n. 107853, 2020.

MACIÀ, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 981–990, 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 165, 2015.

MAGIORAKOS, A. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 194, 2016.

MARCATO, P. D. et al. New hybrid material based on layered double hydroxides and biogenic silver nanoparticles: Antimicrobial activity and cytotoxic effect. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 266–272, 2013.

MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S12–S22, 2017.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 337–348, 1971.

MCCANN, C. M. et al. Understanding drivers of antibiotic resistance genes in high Arctic soil ecosystems. **Environment International**, v. 125, p. 497–504, 2019.

- MEKONNEN, A. et al. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, 2016.
- MELO, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.
- MERONI, G.; FILIPE, J. F. S.; MARTINO, P. A. *In vitro* antibacterial activity of biological-derived silver nanoparticles: Preliminary data. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 1, 2020.
- MEZA-VILLEZCAS, A. et al. Effect of antimicrobial nanocomposites on *Vibrio cholerae* lifestyles: Pellicle biofilm, planktonic and surface-attached biofilm. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 2019.
- MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.
- MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2485–2489, 2004.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Aditivos**. 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>>. Acesso em: jun. 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Princípio Ativo: sulfadiazina de prata**. 2015. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/12/Sulfadiazina-de-Prata.pdf>>. Acesso em: mar. 2020.
- MIR, M. et al. Enhancement in site-specific delivery of carvacrol for potential treatment of infected wounds using infection responsive nanoparticles loaded into dissolving microneedles: A proof of concept study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 147, p. 57–68, 2020.
- MITH, H. et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 403–416, 2014.
- MOHAMED, S. H. et al. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 84–95, 2018.
- MONNET, V.; GARDAN, R. Micro commentary quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: 'cherchez le peptide'. **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 181–184, 2015.
- MONZOTE, L.; ALARCÓN, O.; SETZER, W. N. Antiprotozoal activity of essential oils. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 77, n. 4, p. 167–175, 2012.

- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.
- MORENO, P. R. H.; COSTA-ISSA, F. I.; RAJCA-FERREIRA, A. K. Native Brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on their potential and the antimicrobial methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3040–3078, 2014.
- MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES A, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, p. 12871–12934, 2018.
- MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 539, 2019.
- MULFINGER, L. et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007.
- MULLER, M. Bacterial silver resistance gained by cooperative interspecies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, 2018.
- MUNITA, J. M.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Evolving resistance among Gram-positive pathogens. **Clinical Infection Diseases**, v. 61, p. 48–57, 2015.
- NAKAZATO, G. et al. Applications of nanometals in cutaneous Infections. *In*: RAI, Mahendra (Org.). **Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections**. Springer International Publishing, 2020, p. 71–92.
- NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K.; SEABRA, A. B.; DURAN, N. Use of nanoparticles as a potential antimicrobial for food packaging. *In*: GRUMEZESCU, Alexandru Mihai (Org.). **Food Preservation**. Elsevier, 2017, p. 413–447.
- NANCY, B. A.; ELUMALAI, K. Synthesis of silver nanoparticles using *Pelargonium graveolens* essential oil and anti-fungal activity. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 176–185, 2019.
- NATEGHI, M. R.; HAJIMIRZABABA, H. Effect of silver nanoparticles morphologies on antimicrobial properties of cotton fabrics. **Journal of The Textile Institute**, v. 105, n. 8, p. 806–813, 2014.
- NATIONAL BIOFILMS INNOVATION CENTRE. **Harnessing the UK's Academic & Industrial Strength in Biofilms**. 2020. Disponível: < <https://www.biofilms.ac.uk/>>. Acesso em: nov. 2019.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents**. Document M26 – A. Wayne, PA, 1999.
- NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (NNI). **Nanotechnology Timeline**. [20--]. Disponível em: < <https://www.nano.gov/timeline> >. Acesso em: jun. 2020.

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

NAZZARO, F. et al. Essential Oils and Microbial Communication. *In: Essential Oils - Oils of nature*. IntechOpen, 2019.

NEGUT, I.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M. Treatment strategies for infected wounds. **Molecules**, v. 23, n. 2392, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NISAR, P. et al. Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, p. 929–941, 2019.

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera:Apidae:Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Apicultural Research**, 2016a.

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille. **Scientific Reports**, v. 6, n. 21641, 2016b.

NobelPrize.org. **Richard P. Feynman**. 2020. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1965/feynman/biographical/>>. Acesso em: jun. 2020.

NobelPrize.org. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945**. 2020. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>>. Acesso em: jun. 2020.

NÓBREGA, R. D. O. et al. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2591–2596, 2016.

NORBERG, P. et al. The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. **Nature Communications**, v. 2, n. 268, 2011.

NORONHA, V. T. et al. Silver nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**, v. 33, n. 10, p. 1110–1126, 2017.

NOSTRO, A. et al. *In vitro* activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 791–797, 2009.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191–195, 2004.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177–1183, 2011.

NUNES et al. **Metal Oxide Nanostructures: Synthesis, Properties and Applications**. Elsevier, 2018. 328 p.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**. 2014. Disponível em: <[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)>. Acesso em: mar. 2016.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations**. 2016. Disponível em: <[http://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)>. Acesso em: maio. 2016.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003.

OLIVEIRA, D. M. P. DE et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86–92, 2002.

OTAGUIRI, E. et al. Antibacterial combination of oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and biogenic silver nanoparticles towards *Streptococcus agalactiae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 177–190, 2017.

OTERO-GONZALEZ, A. J. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **FASEB Journal**, v. 24, n. 5, p. 1320–1334, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.

PADULOSI, S. Oregano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano 8-12 May 1996, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy 1994). **Biodiversity International**, 1997. 176 p.

PAGARE, S. et al. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, 2015.

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The Staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 2007.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377–1383, 2010.

PANDEY, N.; CASCELLA, M. **Beta Lactam Antibiotics**. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>>. Acesso em: abr.2020.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* signal – response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 9, p. 576–588, 2016.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, n.1, p. 27–33, 2005.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. 1–61, 2018.

PATIL, S. D. et al. Antibacterial potential of a small peptide from *Bacillus* sp. RPT-0001 and its capping for green synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 643–652, 2015.

PATIL, S. S. et al. Synthesis and antibacterial studies of chloramphenicol loaded nano-silver against *Salmonella typhi*. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 65–72, 2009.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 71, 2018.

PEI, R. et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. M379–M383, 2009.

PÉREZ, M. J.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, 2016.

PETERS, L. et al. Multiple antibiotic resistance as a risk factor for mortality and prolonged hospital stay: A cohort study among neonatal intensive care patients with hospital-acquired infections caused by Gram-negative bacteria in Vietnam. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, 2019.

PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

POMPILIO, A. et al. Electrochemically synthesized silver nanoparticles are active against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* and other cystic fibrosis-associated bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1349, 2018.

PRADO, J. **Nanopartículas de Prata: Biossíntese, Investigação das Atividades Antibacteriana, Antifúngica e Citotoxicidade**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte e do Metabolismo) - Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2014.

PUDLARZ, A.; SZEMRAJ, J. Nanoparticles as carriers of proteins, peptides and other therapeutic molecules. **Open Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 285–298, 2018.

PULIT-PROCIAK, J.; BANACH, M. Silver nanoparticles – a material of the future ...? **Open Chemistry**, v. 14, p. 76–91, 2016.

PUŠKÁROVÁ, A. et al. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

QING, Y. et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3311–3327, 2018.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

QUINN, R. Research and development World War ii and the penicillin collaborative. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 3, p. 426–434, 2013.

QUINTEROS, M. A. et al. Biosynthesized silver nanoparticles: decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 104, p. 87–93, 2018.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.

RAEISI, M. et al. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 30–33, 2012.

RAHMAN, S. et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed Research International**, v. 2012, 2018.

RAI, M. K. et al. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 841–852, 2012.

RAI, M. et al. (Ed.) **Nanotechnologies in Food and Agriculture**. Switzerland: Springer, 2015. 347 p.

RANDALL, C. P. et al. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1037–1046, 2015.

RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062–5069, 2010.

RASAMIRAVAKA, T. et al. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2015.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 614–619, 2010.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, L.-H. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: a review. **Foods**, v. 9, n. 3, 2020.

RAYMOND, B. Five rules for resistance management in the antibiotic apocalypse, a road map for integrated microbial management. **Evolutionary Applications**, v. 12, n. 6, p. 1079–1091, 2019.

RAZA, M. A. et al. Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. **Nanomaterials**, v. 6, n. 4, 2016.

REICHLING, J. Anti-biofilm and Virulence factor-reducing activities of essential oils and oil components as a possible option for bacterial infection control. **Planta Medica**, v. 86, n. 8, p. 520–553, 2020.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

RIVAS, L. et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 70–78, 2010.

ROCHA, A. J. et al. *Pseudomonas Aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

RODRÍGUEZ, F. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones from Paraguayan children. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 3, p. 290–297, 2020.

RODRÍGUEZ-SERRANO, C. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–20, 2020.

ROYAL BOTANIC GARDENS-KEW. ***Origanum vulgare* L.** 2020. Disponível em: <<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:453395-1>>. Acesso em: jun. 2020.

RUNCIE, H. Infection in a pre-antibiotic Era. **Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine**, v. 3, n. 2, 2015.

SAGHI, H. et al. Antibacterial effects of *Origanum vulgare* essence against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from selected hospitals of Tehran, Iran. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, n. 1, 2015.

SAHA, S. et al. Biological activities of essential oils and methanol extracts of five *Ocimum* species against pathogenic bacteria. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 2, p. 194–202, 2013.

SAID-AL AHL, H.; HIKAL, W.; TKACHENKO, K. G. Essential Oils with Potential as Insecticidal Agents: A Review. **International Journal of Environmental Planning and Management**, v. 3, n. 4, p. 23–33, 2017.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27, n. 3, p. 429–438, 2017.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. **Nanomaterials**, v. 10, n. 292, 2020.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria in ESKAPE pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27902/1/com.tec.99.pdf4>>. Acesso em: maio 2015.

SATHIYASEELAN, A. et al. Biocompatible fungal chitosan encapsulated phyto-genic silver nanoparticles enhanced antidiabetic, antioxidant and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 63–71, 2020.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v. 4, n. 6, 2003.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 760, 2016.

SCHMID, G.; CORAIN, B. Nanoparticulated gold: syntheses, structures, electronics, and reactivities. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 2003, n. 17, p. 3081–3098, 2003.

SCOTT, K.; YU, E. H. (Ed.). **Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. 410 p.

SEONG, M.; GUN, D. Silver nanoparticles against *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: role of inner membrane dysfunction. **Current Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 661–670, 2017.

SHAFREEN, R. B. et al. Inhibitory effect of biosynthesized silver nanoparticles from extract of *Nitzschia palea* against curli-mediated biofilm of *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1351–1361, 2017.

SHAH, M. et al. Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. **Materials**, v. 8, p. 7278–7308.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 168–171, 2007.

SHAIK, M. R. et al. Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their microbicidal activities. **Sustainability**, v.10, n. 4, 2018.

SHARMA, K.; GULERIA, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum gratissimum* leaf extract: characterization, antimicrobial activity and toxicity analysis. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 29, p. 213–222, 2019.

SHIRTLIFF, M. E. 2012. **Bill Costerton: leader as servant**. Disponível em:< <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1574-695X.12011>>. Acesso em: nov. 2019.

SI et al. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 145-285, 2008

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n.5, 2010.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Review**, v. 24, n. 1, p. 71–109, 2011.

SILVER, L. L. Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 41–55, 2007.

SIM, J. X. F. et al. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 6, 2019.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 833 p.

SINGH, A. K. et al. Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

SINGH, P. et al. Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the *Rhodiola rosea* rhizome extracts. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, p. S886–S899, 2018.

SINGH, P. et al. Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, 2016.

SINGH, S. et al. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. **Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 2017.

SINGLA, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 2, p. 61–66, 2013.

SIPOS, P. et al. Special wound healing methods used in ancient Egypt and the mythological background. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 2, p. 211–6, 2004.

SMIJS, T. G.; PAVEL, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, n. 1, p. 95–112, 2011.

SOKOVIĆ, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. **Global Science Books**, v. 1, p. 220–226, 2007.

SONAM CHOUHAN; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 4, p. 58, 2017.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.

STOJKOVIĆ, D. et al. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. **Archives of Biological Sciences**, v. 65, n. 2, p. 639–644, 2013.

STRAHL, H.; ERRINGTON, J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 519–538, 2017.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. **Infection Epidemiology and Medicine**, v. 2, n.1, p. 25–32, 2016.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2017.

SUFFREDINI, I. B. et al. Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 400–402, 2006.

SUN, Y.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science, New Series**, v. 298, n. 5601, p. 2176–2179, 2002.

SÜTTERLIN, S. et al. Effects of silver-based wound dressings on the bacterial flora in chronic leg ulcers and its susceptibility *in vitro* to silver. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, n. 1, p. 34–39, 2012.

SUZUKI, É. Y. et al. Essential oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: an alternative against microorganisms responsible for bad perspiration odor. **Journal of Young Pharmacists**, v. 7, n. 1, p. 12–20, 2015.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet - Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TADROS, T. Electrostatic and steric stabilization of colloidal dispersions. *In*: OHSHIMA, Hiroyuki (Ed.). **Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces: Fundamentals and Applications in Nano-, Bio-, and Environmental Sciences**. John Wiley & Son, 2012. p. 153–172.

TAN, K. H.; NISHIDA, R. Methyl eugenol: Its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **Journal of Insect Science**, v.12, n. 1, 2012.

TARAFDAR, J. C.; ADHIKARI, T. Nanotechnology in Soil Science. *In*: GOSWAMI, N. N. et al. (Ed.). **Soil Science in the Service of Nation**. Indian Society of Soil Science, 2012, P.326–334.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, n. June, p. 103580, 2019.

TEXAS TECH UNIVERSITY. **Oregano**. 2020. Disponível em:< [https://www.depts.ttu.edu/plantresources/Pages/Landscape\\_Information\\_Sheets/Edibles\\_Info/Origanum\\_vulgare.php](https://www.depts.ttu.edu/plantresources/Pages/Landscape_Information_Sheets/Edibles_Info/Origanum_vulgare.php)>. Acesso em: jun. 2020.

THIELMANN, J.; MURANYI, P.; KAZMAN, P. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01860, 2019.

THOMAS, L.; DELVES-BROUGHTON, J. Applications of the natural food preservative natamycin. **Advances in Food Sciences**, 2001

THOMBRE, R. S. et al. Antimicrobial activity and mechanism of inhibition of silver nanoparticles against extreme halophilic Archaea. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

TINCU, J.; TAYLOR, S. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3645–3654, 2004.

TOMLIN, K. L. et al. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5208–5218, 2005.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231–1249, 2014.

TORTORELLA, E.; TEDESCO, P.; ESPOSITO, F. P. Antibiotics from deep-sea microorganisms: current discoveries and perspectives. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, 2018.

TREVISAN, D. A. C. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 2018.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95–103, 2011.

tv2lorry.dk. **Niels Høiby**. Disponível em: <<https://www.tv2lorry.dk/profil/niels-hoiby>>. Acesso em: jun. 2020.

TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 141–155, 2019.

ULTEE, A; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

UNIVERSITY OF COPENHAGEN. **Biofilm Test Facility**. 2020. Disponível em: <<https://biofilmtestfacility.ku.dk/>>. Acesso em: nov. 2019.

UNIVERSITY OF COPENHAGEN. **Costerton Biofilm Center**. 2020. Disponível: <<https://biofilm.ku.dk/>>. Acesso em: nov. 2019.

UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA. **Adelaide Biofilm Test Facility**. 2020. Disponível em: <<https://www.unisa.edu.au/research/cri/laboratories-and-facilities/adelaide-biofilm-test-facility/>>. Acesso em: nov. 2019.

UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. **BioMed Research International**, 2014.

USDA (United States Department of Agriculture). ***Origanum vulgare* L., oregano**. Disponível em: <<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ORVU>>. Acesso em: jun. 2020.

VALERIANO, C. et al. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 673–677, 2012.

VALERO, M.; SALMERO, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 73–81, 2003.

VALONES, M. A. A. et al. Clinical Assessment of Rosemary-base toothpaste (*Rosmarinus officinalis* Linn.) - A Randomized Controlled Double-blind Study. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 2, p. 146–151, 2019.

VASCONCELOS, N. G. et al. Short communication *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. et al. *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians. **Antibiotics**, v. 9, n. 205, 2020.

VAZQUEZ-MUÑOZ, R. et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, 2019.

VERMA et al. BACTERIOCINS | Potential in Food Preservation. *In*: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Org.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Elsevier, 2016. p. 4006.

VESTBY, L. K. et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, 2020.

VILA, J. et al. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1302–1308, 2012.

VIVAS, M. C.; CAICEDO, L. D.; CASTILLO, J. E. Occurrence of  $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacterial isolates in water sources in Cali city, Colombia. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 2019.

VOLCÃO, L. M. et al. Biological activity of aqueous extracts of Southern Brazilian mushrooms. **International Journal of Environmental Health Research**, 2019.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 173, 2016.

WALSH, D. J. et al. Antimicrobial activity of naturally occurring phenols and derivatives against biofilm and planktonic bacteria. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 653, 2019.

WATNICK, P. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WATT, J.; CHEONG, S.; TILLEY, R. D. How to control the shape of metal nanostructures in organic solution phase synthesis for plasmonics and catalysis. **Nano Today**, v. 8, n. 2, p. 198–215, 2013.

WIEDENBECK, J.; COHAN, F. M. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 957–976, 2011.

WIJESUNDARA, N. M.; RUPASINGHE, H. P. V. Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 118–127, 2018.

WILEY, B. J. et al. Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice. **Nano Letters**, v. 7, n. 4, p. 1032–1036, 2007.

WILSON, B. A. et al. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. Washington: ASM Press, 2011. 526 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety**. 2020c. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections**. 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>>. Acesso em: mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. 2017. Disponível em: <[https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/prioritization-of-pathogens/en/](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/)>. Acesso em: mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. 2020a. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 17 set. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Technical brief on water, sanitation, hygiene and wastewater management to prevent infections and reduce the spread of antimicrobial resistance**. 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/wash-wastewater-management-to-prevent-infections-and-reduce-amr/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/wash-wastewater-management-to-prevent-infections-and-reduce-amr/en/)>. Acesso em: mar. 2020.

WYPIJ, M. et al. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 1–13, 2018.

XIAO, S. et al. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 99, 2020.

XIU, Z. et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano letters**, v. 12, n. 8, p. 4271–4275, 2012.

XU, F. et al. Preparation and cold welding of silver nanowire based transparent electrodes with optical transmittances >90% and sheet resistances <10 ohm/sq. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 512, p. 208–218, 2017.

XU, J. et al. The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 6, p. 1667–1670, 2013.

XUE, B. et al. Towards high quality triangular silver nanoprisms: improved synthesis, six-tip based hot spots and ultra-high local surface plasmon resonance sensitivity. **Nanoscale**, 2015.

YADAV, M. K. et al. Eugenol: A phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

YAMAZAKI, K. et al. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. **Food Microbiology**, v. 21, p. 283–289, 2004.

YAN, X. et al. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach. **Metalomics**, v. 10, n. 4, p. 557–564, 2018.

YAP, P. S. X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 6–14, 2014.

YIN, L. et al. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 2360–2367, 2011.

ZAHEDI, M. et al. Effect of nanoclay particles on the hardness strength of polypropylene / Canola straw flour composites Effect of nanoclay particles on the hardness strength of polypropylene / Canola straw flour composites. n. February, 2011.

ZAMORA, C. M. P.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.

ZAMORA, C. M. P.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 544, 2018.

ZAWADZKA, K. et al. Surface area or diameter – which factor really determines the antibacterial activity of silver nanoparticles grown on TiO<sub>2</sub> coatings? **New Journal of Chemistry**, v. 38, p. 3275–3281, 2014.

ZHOU, F. et al. The Antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Safety**, v. 27, p. 124–133, 2007.

ZORRAQUÍN-PEÑA, I. et al. Silver nanoparticles against foodborne bacteria. Effects at intestinal level and health limitations. **Microorganisms**, v. 8, n. 132, 2020.

ZUMLA, A.; LULAT, A. Honey-a remedy rediscovered. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 82, n. 7, p. 384–385, 1989.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão, juntamente com a metodologia necessária ao desenvolvimento deste trabalho de doutorado, foram apresentados na forma de dois artigos, seguindo as normas de formatação da revista *Frontiers in Microbiology* para qual um dos artigos já foi submetido (com modificações para se adequar à presente tese).

## 5.1 ARTIGO 1

## ARTIGO 1

**Antibacterial combinations composed of oregano derivatives and biogenic silver nanoparticles: effect against multidrug-resistant strains and mechanism of action against *Escherichia coli***

Sara Scandorieiro<sup>1</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

**\*Autor correspondente:** Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 Km 380, s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil. (kobayashirkt@uel.br)

## Abstract

Multidrug-resistant bacteria have become a public health problem worldwide, reducing treatment options against several pathogens. *Origanum vulgare* derivatives, such as oregano essential oil (OEO), carvacrol (CAR), and thymol (Thy), and biogenically synthesized silver nanoparticles are potent alternative antimicrobials. This study evaluated the effect of two-drugs combinations composed of oregano derivatives and bioAgNP (silver nanoparticles synthesized with *Fusarium oxysporum* components) against Gram-negative and Gram-positive bacteria, including multidrug-resistant strains. The following combinations were tested: OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy. The antimicrobials alone and in combination were bactericidal against all ten tested strains. For antimicrobials individually, the minimal bactericidal concentration (MBC) ranges were: 0.30 – 2.38 mg/mL (OEO), 0.31 – 1.22 mg/mL (CAR), 0.25 – 1 mg/mL (Thy), and 92.5 – 185  $\mu$ M (bioAgNP). AgNO<sub>3</sub> (control) MBC range was 62.5 – 250  $\mu$ M. Time-kill assays showed that oregano derivatives acted very fast (at least 10 s), while bioAgNP took at least 30 min to kill Gram-negative bacteria and 7 h to kill methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The four combinations resulted in additive antibacterial effect against almost all tested strains (none showed antagonistic interaction), reducing significantly minimal inhibitory concentration (MIC) values and acting faster than bioAgNP alone. *Escherichia coli* developed resistance to bioAgNP after 12 days of daily exposition, bacteria which received long treatment with Thy plus bioAgNP did not develop tolerance to both antimicrobials. Mechanism of action of Thy, bioAgNP, and combination of both against *E. coli* involves oxidative stress by enhancing intracellular reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation, disruption of cytoplasmic membrane and cell wall (surface blebbing observed by electron microscopy), resulting in leakage of cellular proteins, DNA, RNA, and ATP. OEO and CAR did not cause oxidative stress, however they also affected cytoplasmic membrane and cell wall integrity, resulting in physical damage (surface protrusions) and high cellular contents leakage. All treatments showed very low hemolytic activity. This study describes for the first time the effect of CAR and Thy combined with bioAgNP (produced with *F. oxysporum* components) against bacteria for which efficient antimicrobials are urgently needed, such as carbapenem-resistant strains (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*) and MRSA.

**Keywords:** oregano oil, carvacrol, thymol, *Fusarium oxysporum*, eco-friendly, ESKAPEE pathogens, carbapenem-resistance, MRSA

## 1 Introduction

Multidrug-resistant bacteria have become a global clinical and public health problem. There are several possible causes of antibacterial resistance such as natural selection, mutations, antibiotic selection pressure due to overuse, spread of resistance since horizontal gene transfer is common among bacteria, bacterial rapid reproduction, patients not finishing the entire antibiotic course, absence of new antimicrobials being discovered, and others (O'Neill, 2016; CDC, 2020a; WHO, 2020). Infections due multidrug-resistant pathogens prolong length of hospital stay, cause hospital outbreaks, increase economic costs for health care, and cause high morbidity and mortality (Colomb-Cotinat et al., 2016; Peters et al., 2019; CDC, 2020b; WHO, 2020). If no action is taken, it is estimated that by 2050 one person will die every three seconds, causing 10 million deaths a year. Multidrug-resistant bacteria plus lack of effectiveness of current antimicrobials to treat infections are emerging disaster to public health. Therefore, there is need for research and development of new antimicrobials with potential to combat resistant bacteria and also prevent emergence of resistance (Llor and Bjerrum, 2014; Viens, 2015; O'Neill, 2016; CDC, 2020b).

ESKAPEE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.) are commonly associated with antimicrobial resistance and are the leading cause of nosocomial infections worldwide (Santajit and Indrawattana, 2016; Partridge et al., 2018; Mulani et al., 2019). Such bacterial strains lead to prolonged hospital stays and deaths, and have been highlighted by CDC and WHO among the microorganisms for which antimicrobials are urgently needed (CDC, 2020b; WHO, 2020). Multidrug-resistant strains have been found in domestic and industrial wastewater, rivers, lakes, food for human consumption, colonizing or infecting humans at community level; therefore, it is not a problem restricted to hospitals, it also affects our community and environment (Koga et al., 2015; Delgado-Gardea et al., 2016; Adam, 2018; de Campos et al., 2018; Dhawde et al., 2018; Vivas et al., 2019; CDC, 2020c; Rodríguez et al., 2020).

In Gram-negative bacteria,  $\beta$ -lactamases are an important defense mechanism against antibiotics. Enzymatic degradation of antimicrobials is a resistance mechanism prevalent and efficient in those bacteria, since enzymes remain and are concentrated in periplasmic space (Ruppé et al., 2015; Codjoe and Donkor, 2018). Carbapenem-resistant strains have challenged health-care settings; these microorganisms produce carbapenemases that extremely reduce treatment options, since they inactivate penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems, namely imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem, panipenem, and biapenem (Codjoe and Donkor, 2017; Nordmann and Poirel, 2019). These enzymes are encoded by plasmids which may carry resistance genes to other non- $\beta$ -lactam antimicrobials (quinolones, tetracyclines, cotrimoxazole, trimethoprim, and aminoglycosides, for example) (Dhillon and Clark, 2012; Patel and Bonomo, 2013; Nordmann and Poirel, 2019). Bacteria easily exchange genes, spreading multidrug-resistance among different strains and genera (Codjoe and Donkor, 2017; Nordmann and Poirel, 2019). Gram-positive strains also secrete  $\beta$ -lactamases; once these enzymes are not concentrated in bacterial cell, a common mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam occurs due to alteration or replacement of an antibiotic target site (enzyme or cell wall, for example). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) harbor *mecA* gene, which encodes alternative transpeptidases with very low affinity for several  $\beta$ -lactams. MRSA may also harbor other resistance genes, reducing treatment options (Turlej et al., 2011; Munita et al., 2015; Foster, 2017).

Antimicrobial alternatives to combat bacterial resistance include bioactive compounds from several natural sources (animals, plants, bacteria, and fungi for example), metallic nanoparticles, and antimicrobial combinations (Cardozo et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015; Scandorieiro et al., 2016; Swamy et al., 2016; Pisoschi et al., 2017; Tyers and Wright, 2019; Raveau et al., 2020; Sánchez-López et al., 2020).

Studies have shown the potent antimicrobial activity of plant essential oils (Biasi-Garbin et al., 2015; Gavahian et al., 2018; Kozics et al., 2019; Ebani et al., 2020; Xiao et al., 2020). *Origanum vulgare* (oregano) essential oil (OEO) and its main bioactive components (carvacrol – CAR e thymol – Thy) stand out as excellent bactericidal agents against several strains, including multidrug-resistant microorganisms (Nazzaro et al., 2013; Magi et al., 2015; Scandorieiro et al., 2016; Khan et al., 2017; Khan et al., 2019; Wijesundara and Rupasinghe, 2018; Sim et al., 2019; Cho et al., 2020; Xiao et al., 2020). However, terpenoids derived from oregano present strong taste and smell, which may limit their use, so strategies are required to minimize these undesirable organoleptic effects (Alvarez et al., 2014; Kotronia et al., 2017).

For centuries, humans have made use of metal antimicrobial properties. Silver containers were used by ancient civilizations (Persians, Phoenicians, Greeks, Romans, and Egyptians) to preserve food and water. Silver has also been used to treat eye infections and wounds (Alexander, 2009; Lemire et al., 2013). Nanotechnology has provided possibilities to revive the use of silver to combat microbial resistance. Silver nanoparticles, which have been used for over 100 years and are currently incorporated into various products of our daily lives, have been studied to combat several pathogens. Silver nanoparticles have large surface area and high oxidation-reduction potential, which provide them great effect against bacteria, including multidrug-resistant strains (Nowack et al., 2011; Cardozo et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015; Ebrahiminezhad et al., 2016; Scandorieiro et al., 2016; Calderón-Jiménez et al., 2017; Nakazato et al., 2017, 2020; Sim et al., 2018; Simbine et al., 2019; Kobayashi et al., 2019; Dalir et al., 2020). Due their antimicrobial property, silver nanoparticles have been widely explored by nanotechnology industry, since they are incorporated in formulation of surface cleaners, textiles, toys, air and water disinfection processes, antimicrobial inks, food packages, wound dressing and other materials for cutaneous infections, coating for bone implants, dental prostheses, catheters, among other applications (Calderón-Jiménez et al., 2017; Nakazato et al., 2017, 2020; Kobayashi et al., 2019; Simbine et al., 2019). Other physico-chemical properties of silver nanoparticles (high electrical and thermal conductivity, surface-enhanced Raman scattering, catalytic activity, and non-linear optical properties) allow development of new products and scientific applications (Calderón-Jiménez et al., 2017).

Green nanotechnology has led to silver nanoparticles production by eco-friendly and low-cost methods (Durán et al., 2005; Lima et al., 2012, 2019; Marcato et al., 2012; Behravan et al., 2019; Nisar et al., 2019). Our research group has shown that silver nanoparticles, synthesized with *Fusarium oxysporum* components as reducing and capping agents (bioAgNP), have activity against bacteria, fungi and protozoa, including multidrug-resistant strains (Cardozo et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015; Longhi et al., 2016; Scandorieiro et al., 2016; Bocate et al., 2019; Figueiredo et al., 2019; Machado et al., 2019). Despite their excellent antimicrobial activity, resistance to ionic silver and silver nanoparticles is already reported (Losasso et al., 2014; Graves et al., 2015; Panáček et al., 2017; Muller, 2018).

Combination of antimicrobials are potential strategies to prevent emergence of resistant strains and reduce unwanted characteristics of compounds (odor, taste, toxicity, or costs) (Fischbach, 2011; Bollenbach, 2015; Suzuki et al., 2017; Raymond, 2019; Tyers and Wright, 2019). In previous study, our research group reported that combination containing OEO plus

bioAgNP (synthesized with *F. oxysporum* components) shows excellent activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with synergistic effect against extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *E. coli* and carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (Scandorieiro et al., 2016).

For the first time, this current study evaluated the effect of two double-drug combinations containing these bioAgNP and oregano bioactive terpenoids (CAR and Thy) against bacterial reference and multidrug-resistant strains. In this research, study of mechanism of action against reference *E. coli* was also performed for combination strategically composed of Thy and bioAgNP.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Bacterial Strains

Bacterial reference strains mainly from American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolates were used in this study. The reference strains were as follows: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *A. baumannii* ATCC 19606, methicillin-sensitive *S. aureus* ATCC 25923, and MRSA N315. All clinical isolates tested are multidrug-resistant bacteria, and their antimicrobial susceptibility profile is shown in Table 1. Two isolates were provided by Dra. Eliana Carolina Vespero (*Hospital Universitário de Londrina*, Londrina, Brazil); KPC-producing *E. coli* from urinary tract infection and KPC-producing *K. pneumoniae* from surgical wound swab. One isolate of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* from trochanter secretion swab was provided by Ma. Érika Kushikawa Saeki (*Instituto Adolfo Lutz*, Presidente Prudente, Brazil). One isolate of carbapenem-resistant *A. baumannii* from inguinal-rectal swab was provided by Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni (*Hospital das Clínicas de Londrina*, Londrina; Brazil). All bacterial samples were stored in Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia) broth containing 25% (v/v) glycerol (Merck) at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Antimicrobial Agents

#### 2.2.1 Oregano-derived compounds

OEO was obtained from Ferquima Industry and Commerce of Essential Oil (São Paulo, Brazil). Oil (batch 227) was extracted by steam distillation and its main components (72% carvacrol, 2% thymol, 4.5% gamma-terpinene, 4% para-cymene, and 4% linalool) were described in company technical report. Carvacrol-W224502 (CAR) and thymol-T0501 (Thy) were purchased from Sigma-Aldrich. OEO and CAR densities are 0.95 g/mL and 0.976 g/mL, respectively. Individual stock solutions of OEO, CAR and Thy were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). DMSO maximum concentration in assays was 2.5% (v/v).

#### 2.2.2 Biogenically synthesized silver nanoparticles (bioAgNP)

The bioAgNP synthesis was performed according to previously established method (Durán et al., 2005; Caballero et al., 2006), which has been patented (Patent, 2006, PI0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). *F. oxysporum* (strain 551) from ESALQ-USP Genetic and Molecular Biology Laboratory (Piracicaba, São Paulo, Brazil) was used to prepare bioAgNP. Fungus was grown in medium containing 0.5% (w/v) yeast extract (Becton, Dickinson and Company), 2% (w/v) malt extract, 2% (w/v) agar (Acumedia), and distilled water at  $28^{\circ}\text{C}$  for 7 days. *F. oxysporum* biomass was added to distilled water at 0.1 g/mL and incubated at  $28^{\circ}\text{C}$  for 72 h in agitation (150 rpm). Thereafter, aqueous solution components were separated by

vacuum filtration (qualitative filter having average pore size from 4 to 12  $\mu\text{m}$ , Unifil).  $\text{AgNO}_3$  (Sigma-Aldrich) at 0.01 M was added to this solution; the system was kept at 28°C for 15 days in absence of light (static condition). The bioAgNP were obtained after reduction of silver nitrate by fungal-free solution components. Aliquots of system were removed for measuring absorption spectra, using an ultraviolet-visible spectrophotometry (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), to verify surface plasmon resonance peak of bioAgNP. Washing of bioAgNP was performed by centrifugation (27,000g, 4°C, 30 min) followed by incubation in ultrasonic bath (30 min), both steps were repeated three times. Ag quantification was performed by Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer EDX-7000. Nanoparticles diameter was determined by photon correlation spectroscopy using ZetaSizer NanoZS (Malvern), and zeta potential measurement was performed using the same instrument. Scanning electron microscopy (SEM, FEI Quanta 200) was used for bioAgNP morphology analysis.

## **2.3 Antibacterial Activity against Reference and Multidrug-Resistant Strains**

### **2.3.1 Antibacterial activity of oregano-derived compounds and bioAgNP separately**

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of each antimicrobial individually (OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and  $\text{AgNO}_3$ ) was performed by broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2015), with necessary modifications. Tested concentrations ranged as follows: (i) 0.07 – 9.5 mg/mL for OEO, (ii) 0.08 – 9.76 mg/mL for CAR, (iii) 0.008 – 1 mg/mL for Thy, (iv) 2.89 – 370  $\mu\text{M}$  for bioAgNP, and (v) 7.81 – 1000  $\mu\text{M}$  for  $\text{AgNO}_3$ . The  $\text{AgNO}_3$  (Sigma Aldrich) antibacterial activity was analysed for comparison with bioAgNP. Mueller-Hinton broth (Difco, MHB) alone and MHB containing each antimicrobial separately were tested as sterility controls. Untreated bacteria inoculated on MHB alone and containing DMSO at 1.25% (v/v) were tested as growth control with solvent.

MIC was defined as the lowest antimicrobial concentration that inhibited visible growth after 24 h of treatment at 37°C. Minimal bactericidal concentration (MBC) of each antimicrobial was determined by subculturing 10  $\mu\text{L}$  from broth dilution MIC and above concentrations in Mueller-Hinton agar (Acumedia) without antimicrobials. MBC was defined as the lowest concentration required to kill  $\geq 99.9\%$  of bacteria after 24 h antimicrobial treatment (NCCLS, 1999). All assays were performed in triplicate, at least on three different occasions against reference and multidrug-resistant bacterial strains.

### **2.3.2 Antibacterial combination assay**

Four antimicrobial combinations were tested; they are as follow: (i) OEO and bioAgNP, (ii) CAR and bioAgNP, (iii) Thy and bioAgNP, and (iv) CAR and Thy. Antibacterial interaction of both combined compounds was determined by broth dilution in double-antimicrobial gradient as described by Traub and Kleber (1975), with necessary modifications. To standardize the inoculum density for susceptibility test, bacterial isolated colonies grown in MHA medium were suspended in saline solution (0.9% NaCl, w/v, Merck), and this suspension was adjusted to achieve turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard which corresponds approximately to  $1.5 \times 10^8$  colony-forming units (CFU)/mL. The equivalent 0.5 McFarland suspension was diluted 1:100 in MHB to obtain concentration of approximately  $10^6$  CFU/mL. A volume of 0.05 mL of bacterial inoculum at  $10^6$  CFU/mL was added to 0.05 mL of MHB containing antimicrobial combination whose final concentrations ranged as follows: (i) 0.02 – 1.19 mg/mL for OEO, (ii) 0.02-0.61 mg/mL for CAR, (iii) 0.03 – 0.5 mg/mL for Thy, and 5.78 – 92.5  $\mu\text{M}$

for bioAgNP. Lastly bacteria at  $5 \times 10^5$  CFU/mL in MHB with double antimicrobials in combination were incubated at 37°C for 24 h. Sterility and growth controls were performed as described above for MIC determination assay. The antibacterial interaction of both compounds in each combination was analysed by fractional inhibitory concentrations index (FICI) according Yadav et al. (2013) using the following equations:

$$\text{FICI} = \text{FIC}_{1\text{st antimicrobial}} + \text{FIC}_{2\text{nd antimicrobial}}$$

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC}_{\text{combination}}}{\text{MIC}_{\text{individual}}}$$

The interaction based on FICI is interpreted as follows: “synergistic” if  $\text{FICI} \leq 0.5$ , as “additive” if  $> 0.5$  and  $\leq 1$ , as “indifferent” (no interaction) if  $> 1$  and  $\leq 2$ , and as “antagonist” if  $> 2$ . All assays were performed in triplicate, at least on three different occasions against reference and multidrug-resistant bacterial strains.

### 2.3.3 Time kill assay

Time-kill assay was performed using the viable cells count method, according to NCCLS (1999). Five conditions of treatment were tested: bacterial cultures treated with individual antimicrobials (OEO, CAR, Thy, and bioAgNP) and combination of Thy plus bioAgNP. Bacterial culture with no antimicrobial was tested as growth control. At nine time points (0 h, 30 s, 10 min, 30 min, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, and 24 h) of treatment at 37°C, 10  $\mu\text{L}$  from serial dilutions (in saline solution composed of 0.9% NaCl, w/v) of treated and non-treated cultures were subcultured in MHA for CFU/mL determination. MBC antimicrobials were tested against four bacterial strains with initial cellular density of  $5 \times 10^5$  CFU/mL (*E. coli* ATCC 25922, carbapenemase-producing *K. pneumoniae* KPC 5795, carbapenem-resistant *A. baumannii*, MRSA N315). All assays were carried out in triplicate, at least on two different occasions.

## 2.4 Characterization of Antibacterial Action Mechanism

### 2.4.1 Determination of subinhibitory antibacterial concentrations

Characterization of antibacterial mode of action was performed to five treatments: (i) OEO, (ii) CAR, (iii) Thy, (iv) bioAgNP, and (v) combination containing Thy and bioAgNP. Previously, time-kill assay was carried out to determine subinhibitory antimicrobial concentrations that do not inhibit bacterial growth. Antimicrobials were tested against *E. coli* ATCC 25922 at approximately  $10^9$  CFU/mL; at 25°C. The treatments were tested in phosphate-buffered saline (0.1 M PBS, pH 7.2) in the time-kill and others characterization assays. PBS was composed of 0.9% (w/v) NaCl, 0.2 M monobasic sodium phosphate (Chemco) and 0.2 M dibasic sodium phosphate (Nuclear).

### 2.4.2 Measurement of reactive oxygen species (ROS)

The production of ROS by treated and untreated (control) *E. coli* ATCC 25922 was evaluated using fluorescent dye-based assay (Total ROS Assay Kit 520 nm, Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer’s recommendations. Briefly, 2 mL bacteria cells at approximately  $10^9$  CFU/mL were pelleted (5,500g, 6 min, 25°C) and resuspended with ROS stain solution at final concentration of 1X. Thereafter, cells were incubated to be labelled (37°C, 1 h, in absence of light). After label time, extracellular fluorescent dye was removed by two washing steps using centrifugation (5,500g, 6 min, 25°C) and PBS (0.1M, pH 7.2); finally, the labelled cells were resuspended in 1 mL of PBS. A volume of 0.1 mL of labelled cells was

added to 0.1 mL of PBS containing individual or combined antimicrobials, whose concentrations were as follows: (i) OEO at 0.15 mg/mL, (ii) CAR at 0.15 mg/mL, (iii) Thy at 0.12 mg/mL, (iv) bioAgNP at 92.5  $\mu$ M, and (v) combination with Thy and bioAgNP at 0.03 mg/mL and 46.25  $\mu$ M respectively. PBS without antimicrobial plus labelled cells were used as control (untreated sample). At nine time points of treatment at 25°C (0 h, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, and 120 min), the fluorescence emission was measured at 520 nm using fluorescent microplate reader (PERKIN ELMER 1420 MULTILABEL COUNTER VICTOR 3) with an excitation wavelength of 495 nm. The background fluorescence of PBS was measured and discounted from fluorescence of each bacterial sample. Experiment was conducted in triplicate, at least on three different occasions.

### 2.4.3 Evaluation of lipid peroxidation

Lipid peroxidation is evaluated by malondialdehyde (MDA) quantification (Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, *E. coli* ATCC 25922 at  $10^9$  CFU/mL were pelleted (5,500g, 6 min, 25°C) and resuspended in PBS 0.1M pH 7.2 containing antimicrobial individually (Thy and bioAgNP) and in combination (Thy plus bioAgNP), at same subinhibitory antimicrobial concentrations described previously for ROS assay. PBS alone (untreated bacterial) was used as control. After 3 time points of treatment at 25°C (1 h, 2 h, and 3 h), bacterial cells of each sample were pelleted and resuspended in MDA Lysis Buffer containing 1X butylated hydroxytoluene (BHT). Insoluble material was removed by centrifugation (13,000g, 10 min), and a volume of 0.2 mL of supernatant was added to 0.6 mL of TBA solution, then incubation at 95°C for 1 h was performed to form the MDA-TBA adduct. The samples were cooled to room temperature in ice bath for 10 min; 0.2 mL of reaction mixture were transferred into a 96 well plate which was read at 532 nm (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). Known concentrations of MDA were used to construct calibration curve; the concentration of MDA in each sample (treated and untreated) was determined by linear regression analysis. PBS was used as control, and the background absorbance was subtracted. The assay was carried out in triplicate, at least on three different occasions.

### 2.4.4 Quantification of extracellular ATP levels

Extracellular ATP levels of *E. coli* ATCC 25922 (treated and untreated) were determined by luciferin-luciferase bioluminescence assay, according to the manufacturer's recommendations (ATP Determination Kit – A22066, Molecular Probes). Briefly, *E. coli* at  $10^9$  CFU/mL were pelleted (5,500g, 6 min, 25°C) and new inoculum at  $2 \times 10^{10}$  CFU/mL (20 $\times$  concentrated) were prepared in PBS (0.1M pH 7.2). A volume of 0.05 mL of 20 $\times$  concentrated bacteria was added to 0.05 mL of PBS containing antimicrobial at concentrations described in other activity characterization tests or PBS alone (control). At 0 h of treatment, a volume of 0.01 mL of each sample (treated or untreated bacteria) was mixture to 0.09 mL of standard reaction solution (which contain reaction buffer at 1X, 1 mM DTT, 0.5 mM D-luciferin, 1.25  $\mu$ g/mL luciferase, and water) in 96-well black microplate. At five time points of treatment (at 25°C), the fluorescence emission was measured at 560 nm using fluorescent microplate reader (PERKIN ELMER 1420 MULTILABEL COUNTER VICTOR 3). Standard curve for ATP concentrations were constructed, and by linear regression analysis the concentration of ATP in each sample (treated and untreated) was determined. PBS was used as control, and the background luminescence was subtracted. The assay was carried out in duplicate, at least in 3 different occasions.

#### 2.4.5 Quantification of biomolecules leakage

*E. coli* ATCC 25922 at  $10^9$  CFU/mL, untreated and treated with subinhibitory concentrations of antimicrobials (as described previously), was incubated at 25°C for 30 min, bacterial cells were pelleted (5,500g, 6 min, 25°C) and supernatant was analysed by quantification of several extracellular biomolecules, total proteins, single stranded DNA (ssDNA), double stranded DNA (dsDNA) and RNA, using Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer.

#### 2.4.6 Cellular alterations seen by electron microscopy

The preparation of samples (treated and untreated bacteria), for scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) analyses, was performed according de Souza (2007) guidelines. For Scanning electron microscopy (SEM) study, *E. coli* ATCC 25922 at  $10^9$  CFU/mL was exposed to five different treatments for 30 min (25°C); OEO at 0.15 mg/mL, CAR at 0.15 mg/mL, Thy at 0.12 mg/mL, bioAgNP at 92.5  $\mu$ M, and combination containing Thy at 0.03 mg/mL and bioAgNP at 46.25  $\mu$ M. Bacteria in PBS was used as untreated control. After treatment time, 0.25 mL of bacterial cell suspensions of each sample were spotted onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)-coated glass slides. Thereafter, each sample was fixed (for 20 h at 4°C) by immersion in 1 mL of 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH7.2) containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 2% (v/v) paraformaldehyde, following post-fixation in OsO<sub>4</sub> 1% for 2 h at room temperature. All reagents for both chemical fixations were provided from Electron Microscopy Sciences. Both after fixation and post-fixation, three washing steps (15 min each) with 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH7.2) were performed. Post-fixed cells were dehydrated in an ethanol gradient (Sigma-Aldrich) (30, 50, 70, 90, and 100°GL), critical point-dried using CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under scanning electron microscope (FEI Quanta 200).

For transmission electron microscopy (TEM) study, *E. coli* ATCC 25922 at  $10^9$  CFU/mL was exposed to bioAgNP (46.25  $\mu$ M) for 1 h, and bacteria in PBS were used as untreated control. After treatment, cells from 1 mL were washed twice with PBS by centrifugation (5,500g, 4°C, 10 min), and fixed, post-fixed and dehydrated in an ethanol series as described for SEM. The samples were embedded and blocked in Araldite. The block was cut into ultrathin sections of 60–70 nm (Leica ULTRACUT UCT Leica UCT) that were stained with 2% uranyl acetate for 15 min, washed with distilled water, post-stained with 0.2% lead citrate for 15 min, washed with distilled water again, and observed under a Zeiss EM900 transmission electron microscope. At least 18 microscope fields were observed for each sample.

#### 2.5 Cytotoxicity Assay

Hemolytic activity of antimicrobials individually (OEO, CAR, Thy, and bioAgNP) and in combinations (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy) was determined according to Izumi et al., 2012, with necessary modifications. The assay was also performed for *F. oxysporum*-free solution used in bioAgNP synthesis and AgNO<sub>3</sub>. Blood was obtained in tubes containing sodium heparin (Vacuplast) from healthy human donor with voluntary consent, which was approved by the human ethics committee (CAAE 47661115.0.0000.5231, No. 1.268.019 – UEL). Erythrocytes were separated by centrifugation (5,500g, 4°C, 5 min), and they were inoculated at 3% (v/v) in PBS (0.1 M, pH 7.2) containing different antimicrobials individually and in combination in 96-well plates. Tested concentrations of antimicrobials individually ranged as follows: (i) 0.07 – 9.5 mg/mL for OEO,

(ii) 0.08 – 9.76 mg/mL for CAR, (iii) 0.008 – 1 mg/mL for Thy, (iv) 5.78 – 740  $\mu$ M for bioAgNP, (v) 15.62 – 2000  $\mu$ M for AgNO<sub>3</sub>, and (vi) 0.15 – 20 % (v/v) for fungal-free solution. Antimicrobials concentrations in combination ranged as follows: (i) 0.15 – 1.19 mg/mL for OEO, (ii) 0.08 – 0.61 mg/mL for CAR, (iii) 0.03 – 0.5 mg/mL for Thy, and (iv) 5.78 – 92.5  $\mu$ M for bioAgNP.

After 3 h of treatment at 37°C, supernatants were read at 550 nm to evaluate release of hemoglobin. Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at 1% (v/v) was used as positive control for 100% hemolytic activity, and PBS with no antimicrobial was used as negative control. The hemolysis percentage of each antimicrobial treatment was calculated using the following equation:

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

$$A = \text{OD}_{550} \text{ of treated sample} - \text{OD}_{550} \text{ of negative control}$$

$$B = \text{OD}_{550} \text{ of positive control} - \text{OD}_{550} \text{ of negative control}$$

The 50% cytotoxicity concentration (CC<sub>50</sub>) as defined as the antimicrobial concentration required to cause 50% of hemolysis compared to untreated control. CC<sub>50</sub> of individual antimicrobials was determined by regression analysis.

## 2.6 Prolonged Exposure of Bacteria to Thy and bioAgNP

Prolonged exposure of *E. coli* ATCC 25922 to Thy and bioAgNP (individually and in combination) was carried out to analyse if bacteria develop tolerance to antimicrobials. Before starting experiment, *E. coli* was cultivated in MHB in a shaking incubator (130 rpm) at 37°C for 72 h (every 24 h, the medium was renewed). Then *E. coli* was exposed for 25 days to Thy and bioAgNP (individually and in combination), at 37°C and 130 rpm. During 25 days, daily transfers of 0.05 mL of each previous culture into 0.95 mL of MHB alone (untreated control) or containing antimicrobials were carried out. At the beginning of experiment, bacterial samples were exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials, then concentrations were increased gradually. All details of daily antimicrobial concentrations are shown in supplementary material (Supplementary Table 2). Every three days of experiment, bacteria were inoculated in nutrient agar (NA, HiMedia), MacConkey agar (MAC, HiMedia), EPM, MILi (Probac commercial kit EPM-MILi), and Simon's citrate agar (Merck), and analysed by Gram staining to ensure no contamination.

## 2.7 Statistical Method

Results were analysed using R Statistical Software (version 3.5.1). Firstly, Shapiro-Wilks and Bartlett tests were used to verify residues normality and variances homogeneity, respectively. Then, data were analysed by parametric (ANOVA – one way, followed by Tukey, and Student's t) or non-parametric tests (Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc method, and Wilcoxon-Mann-Whitney).

## 3 Results

### 3.1 Characterization of bioAgNP

Fungal-free solution was pale yellow color before adding AgNO<sub>3</sub>. Immediately after adding silver salt, the solution color changed to brownish and its color intensity increased over

15 days of incubation at 28°C. The UV-Vis spectra of bioAgNP is shown in Figure 1A. The strong plasmon resonance of bioAgNP is centered at 420 nm, while fungal-free solution (without AgNO<sub>3</sub>) that was used as negative control showed no absorption peak at this wavelength. Average bioAgNP diameter and zeta potential were 72.57 nm and -22.5 mV, respectively. Nanoparticles size and zeta potential distributions are shown in supplementary material (Supplementary Figures 1 and 2). SEM micrograph of bioAgNP shows spherical nanoparticles (Figures 1B).

### 3.2 MIC of Oregano-Derived and Silver-Based Antibacterials Separately

All Oregano-derived compounds (OEO, CAR, and Thy), bioAgNP, and AgNO<sub>3</sub> inhibited the growth of all bacteria species tested in this study, including multidrug-resistant strains. The mean MIC and MBC (respectively) were  $0.84 \pm 0.66$  mg/mL ( $0.86 \pm 0.66$  mg/mL) for OEO,  $0.48 \pm 0.19$  mg/mL ( $0.67 \pm 0.39$  mg/mL) for CAR,  $0.47 \pm 0.22$  mg/mL ( $0.52 \pm 0.27$  mg/mL) for Thy,  $92 \pm 50$  μM ( $117 \pm 40$  μM) for bioAgNP, and  $106.25 \pm 64.55$  μM ( $131.25 \pm 68.78$  μM) for AgNO<sub>3</sub>. MIC ranged from 0.15 to 2.38 mg/mL for OEO, from 0.15 to 1.22 mg/mL for CAR, from 0.25 to 1 mg/mL for Thy, from 46.25 to 185 μM for bioAgNP, and from 31.25 to 250 μM for AgNO<sub>3</sub>. No statistical difference was observed among OEO, CAR, and Thy with regard to their MIC values ( $p > 0.05$ ). There was also no statistical difference between bioAgNP and AgNO<sub>3</sub> MIC mean values ( $p > 0.05$ ). The mean MIC and MBC values of all antimicrobials for each bacterial strain are shown in Table 2.

No statistical difference was observed between standard and multidrug-resistant strains susceptibility to OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and AgNO<sub>3</sub> with regard to MIC values ( $p > 0.05$ ). Antimicrobials showed the following average MIC values for reference strains:  $0.78 \pm 0.95$  mg/mL (OEO),  $0.37 \pm 0.19$  mg/mL (CAR),  $0.4 \pm 0.14$  mg/mL (Thy),  $92 \pm 50$  μM (bioAgNP),  $131.25 \pm 77.81$  μM (AgNO<sub>3</sub>). The average MIC values for multidrug-resistant strains are the following:  $0.91 \pm 0.28$  mg/mL (OEO),  $0.58 \pm 0.00$  mg/mL (CAR),  $0.55 \pm 0.27$  mg/mL (Thy),  $92 \pm 50$  μM (bioAgNP),  $81.25 \pm 41.93$  μM (AgNO<sub>3</sub>).

There was no statistical difference between Gram-negative and Gram-positive strains with regard to MIC values of OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and AgNO<sub>3</sub> ( $p > 0.05$ ). Antimicrobials showed the following average MIC values for Gram-negative:  $0.61 \pm 0.38$  mg/mL (OEO),  $0.45 \pm 0.19$  mg/mL (CAR),  $0.41 \pm 0.13$  mg/mL (Thy),  $92.5 \pm 60$  μM (bioAgNP),  $109.37 \pm 70.87$  μM (AgNO<sub>3</sub>). The average MIC values for Gram-positive are the following:  $1.76 \pm 0.87$  mg/mL (OEO),  $0.91 \pm 0.41$  mg/mL (CAR),  $0.75 \pm 0.35$  mg/mL (Thy),  $92.5 \pm 0.00$  μM (bioAgNP),  $93.75 \pm 44.19$  μM (AgNO<sub>3</sub>).

### 3.3 Antibacterial Interaction of Double-Combined Compounds

All four double-antimicrobial combinations inhibited growth of ten tested bacterial strains. They showed significantly lower MIC values when compared with individual treatments ( $p < 0.05$ ); two-compounds association resulted in synergistic, additive, and indifferent antibacterial activity (Tables 3, 4, 5, and 6). In combination containing OEO and bioAgNP (Table 3), maximum reductions of dose were 84.94% for OEO and 71.43% for bioAgNP. In treatment containing CAR and bioAgNP (Table 4), maximum dose reductions were 72.17% for CAR and 67.51% for bioAgNP. Thy plus bioAgNP (Table 5) resulted in maximum MIC reductions of 60.67% for Thy and 77.64% for bioAgNP. In combination composed of CAR and Thy (Table 6), maximum MIC reductions were 78.18% for CAR and 74.75% for Thy. The reported reductions of MIC (%) refer to average values.

### 3.4 Time-Kill Curve

OEO, CAR, and Thy reduced number of CFU/mL fastly. For all tested four strains (*E. coli* ATCC 25922, KPC-producer *K. pneumoniae*, carbapenem-resistant *A. baumannii*, and MRSA N315), after at least 30 min of treatment at MIC, there were no detected viable cells ( $p < 0.05$ ; Figures 2A-D).

After immediate treatment (10 s), OEO reduced bacterial population by 5.15 log ( $p < 0.05$ ) on average for KPC-producer *K. pneumoniae* (Figure 2B), carbapenem-resistant *A. baumannii* (Figure 2C), and MRSA N315 (Figure 2D). OEO decreased *E. coli* ATCC 25922 population (Figure 2A) by 3.07 log ( $p < 0.05$ ) and 5.44 log ( $p < 0.05$ ) after 10 s and 10 min-treatment respectively.

After 10 s of CAR treatment, bacterial populations reduced by 2.4 log ( $p > 0.05$ ) on average for KPC-producing *K. pneumoniae*, approximately 5 log ( $p < 0.05$ ) on average for standard *E. coli* (Figure 2A), carbapenem-resistant *A. baumannii* (Figure 2C), and MRSA N315 (Figure 2D). CAR decreased carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Figure 2B) by 3.63 log ( $p < 0.05$ ) and 5.15 log ( $p < 0.05$ ) after 10 min and 30 min-treatment respectively.

After 10 s, Thy caused approximately 5 log ( $p < 0.05$ ) reduction on average in reference *E. coli* (Figure 2A), carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Figure 2B), and MRSA N315 (Figure 2D) bacterial populations. The population of carbapenem-resistant *A. baumannii* (Figure 2C) was reduced by 2.66 log ( $p < 0.05$ ) and 5.09 log ( $p < 0.05$ ) after 10 s and 10 min of exposition to Thy respectively.

Treatment with bioAgNP resulted in no detected viable cells ( $p < 0.05$ ), reducing approximately 5 log on average, after 30 min (*E. coli* ATCC 25922, Figure 2A), 2 h (carbapenem-resistant *A. baumannii* Figure 2C), 4 h (KPC-producer *K. pneumoniae*; Figure 2B), and 7 h (MRSA N315, Figure 2D) of exposition. BioAgNP-treated *E. coli*, *A. baumannii*, and *K. pneumoniae* were reduced by 2.84 log (after 10 min of exposition), 2.04 log (30 min), and 3.03 log (2 h) ( $p < 0.05$ ) respectively.

The combination containing Thy and bioAgNP caused faster reduction of Enterobacteriaceae strains CFU/mL than individual treatment with bioAgNP. After 10 s of treatment, Thy plus bioAgNP (both at  $0.5 \times$  individual MIC) decreased *E. coli* ATCC 25922 (Figure 2A) by 2.2 log ( $p < 0.05$ ) and KPC-producer *K. pneumoniae* (Figure 2B) by 2.04 log ( $p < 0.05$ ); both bacterial population resulted in no detected viable cells (approximately 5 log reduction on average) after 10 min of exposition to that double-antimicrobial combination.

### 3.5 Antibacterial Subinhibitory Concentrations

Subinhibitory concentrations of OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and combination of Thy plus bioAgNP (for *E. coli* ATCC 25922) are shown in supplementary material (Supplementary Table 1). Time kill assay showed that individual OEO, CAR, Thy at MIC, and combination of Thy plus bioAgNP at additive MIC (which FICI is 0.75) inhibited *E. coli* growth, even though bacterial cell density was at  $10^9$  CFU/mL approximately. The subinhibitory concentrations shown in this experiment were as follows: OEO, CAR and Thy at  $0.5 \times$  MIC, bioAgNP at MIC, and combination containing Thy and bioAgNP (in which Thy was at  $0.5 \times$  additive MIC and bioAgNP at additive MIC); OEO at 0.15 mg/mL, CAR at 0.15 mg/mL, Thy at 0.12 mg/mL, bioAgNP at 92.5  $\mu$ M, and Thy at 0.03 mg/mL plus bioAgNP at 46.25  $\mu$ M. MIC values were defined as concentrations that inhibited visual growth of  $5 \times 10^5$  CFU/mL previously.

### 3.6 Effect of Antimicrobials on Bacterial Intracellular ROS

The Figure 3A shows the ROS production levels, expressed as relative light units (RLU), by treated and non-treated *E. coli* ATCC 25922. Untreated *E. coli* showed natural production of ROS that ranged from 21,463.5 (at 0h) to 27,628.5 RLU (after 2h of treatment) on average. Three-treated bacterial samples presented higher levels of ROS than untreated control ( $p < 0.05$ ), showing mean ranges of 27,114 – 41,218.5 RLU (Thy), 17,422 – 34,648.5 RLU (bioAgNP), and 20,756.5 – 34,473.5 RLU (combination containing Thy and bioAgNP) (the ranges indicate mean values of RLU from 0 to 2 h treatment).

Thy, bioAgNP and combination of both increased significantly ( $p < 0.05$ ) ROS levels compared to control as follows: increase of 45.08% on average for Thy-treated sample during 2 h of exposition to antimicrobial, 19.99% for bioAgNP (after 1 h of treatment), and 25.83 % for combinations containing Thy plus bioAgNP (after 1 h of treatment). Thy-treated bacteria showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher ROS amount when compared to bioAgNP and combination during all experiment. There was no significant ( $p > 0.05$ ) difference between bioAgNP-treated sample and combination-treated sample during all treatment time.

Unlike, OEO and CAR-treated bacterial samples showed lower levels of ROS than untreated control, which mean ranges (0h – 2h) were 6,504 – 7,662 for OEO, and 6,509.5 – 7,512 for CAR. OEO and CAR reduced significantly ( $p < 0.05$ ) ROS levels compared to control by 72.93 and 72.63 % on average respectively (during 2 h of treatment). There was no significant ( $p > 0.05$ ) difference between OEO- and CAR-treated samples regard with ROS amount.

### 3.7 Effect of Antimicrobials on Membrane Lipid Peroxidation of Bacteria

The Figure 3B shows MDA production (nmol/well, it means nmol of MDA per 100  $\mu$ L) of treated and untreated *E. coli* ATCC 25922. Non-treated *E. coli* showed natural production of MDA, which amounts were 0.26 nmol/well (after 1 h of incubation), 0.24 nmol/well (after 2 h), and 0.25 nmol/well (after 3 h) on average. MDA amounts (average) of treated samples were as follow: 0.35 nmol/well (Thy), 0.32 nmol/well (bioAgNP), and 0.33 nmol/well (combination containing Thy and bioAgNP) after 1 h of treatment; 0.40 nmol/well (Thy), 0.29 nmol/well (bioAgNP), and 0.32 nmol/well (Thy plus bioAgNP) after 2 h treatment; 0.40 nmol/well (Thy), 0.31 nmol/well (bioAgNP), and 0.35 nmol/well (Thy plus bioAgNP) after 3 h treatment.

After 1 h treatment, Thy, bioAgNP and combination of both increased ( $p < 0.05$ ) MDA levels by 33.51, 22.72, and 25.40% respectively compared to untreated control. After 2 h, the MDA amounts increased by 67.14, 20.27, and 33.64 % ( $p < 0.05$ ). After 3 h treatment, the percentage increases were 60.44, 22.90, and 41.07% ( $p < 0.05$ ). Thy treatment caused significantly ( $p < 0.05$ ) more lipid peroxidation than other two treatments; bioAgNP caused the lowest ( $p < 0.05$ ) MDA levels (data related to 3 h of treatment).

### 3.8 Bacterial Extracellular ATP Levels

Figure 4A-D shows extracellular ATP concentrations (nM) of treated and untreated *E. coli* ATCC 25922. The mean ATP leakages in non-treated *E. coli* were 0.17 nM (0 h incubation), 0.01 nM (after 15 min incubation), 0.05 nM (after 30 min); no ATP was detected after 45 min. OEO-treated *E. coli* showed 0.11 nM, 0.03 nM, and 0.02 nM ATP on average at 0 h, 15 min, and 30 min of treatment respectively; no ATP was detected after 45 min of exposition to oil-treated sample. CAR-treated bacteria showed 1.61 nM, 1.35 nM, and 1.06 nM

ATP on average at 0 h, 15 min, and 30 min of treatment respectively; no ATP was detected after 45 min of exposition. Thy-treated sample presented 23.40 nM (0 h), 20.71 nM (15 min), 18.03 nM (30 min), and 16.59 nM ATP (45 min). BioAgNP-treated bacteria showed 0.92 nM (0 h), 0.49 nM (15 min), 0.57 nM (30 min), and 0.63 nM ATP (45 min). *E. coli* treated with combination (Thy plus bioAgNP) presented 1.14 nM (0 h), 0.92 nM (15 min), 0.97 nM (30 min), and 1.13 nM ATP (45 min).

CAR, Thy, bioAgNP, and combination (Thy plus bioAgNP) increased ATP leakage by 9.29 times ( $p>0.05$ ), 135.42 times ( $p<0.05$ ), 5.32 times ( $p>0.05$ ), and 6.59 times ( $p>0.05$ ) respectively compared to untreated control (these values were related to 0h-time point). After 15 min of treatment, antimicrobials increased bacterial ATP leakage by 2 times ( $p>0.05$ ; OEO), 106.7 times ( $p>0.05$ ; CAR), 1,632.80 times ( $p<0.05$ ; Thy), 38.67 times ( $p>0.05$ ; bioAgNP), and 72.93 times (Thy plus bioAgNP). Thy samples showed higher ( $p<0.05$ ) amount of extracellular ATP than other treated samples and control. Although statistical analysis showed no significant difference between three treatments (CAR, bioAgNP, or Thy plus bioAgNP) and control ( $p>0.05$ ), CAR, bioAgNP and combination containing Thy and bioAgNP resulted in higher extracellular ATP amounts (absolute values) than untreated control, and these data are biologically relevant.

### 3.9 Effect of Antimicrobials on Membrane Leakage of Biomolecules

Figure 5A-D shows extracellular biomolecules (total proteins, ssDNA, dsDNA, and RNA) of treated and untreated *E. coli* ATCC 25922. After 30 min the mean biomolecules leakages of untreated control were as follows: 0.139 mg/mL (total proteins), 3.4 ng/ $\mu$ L (ssDNA), 4.8 ng/ $\mu$ L (dsDNA), and 3.4 ng/ $\mu$ L (RNA).

OEO, CAR, Thy, and combination composed of Thy plus bioAgNP resulted in higher leakage amounts ( $p<0.05$ ) of biomolecules than non-treated *E. coli*. Sample treated with bioAgNP did not showed statistically ( $p>0.05$ ) greater leakage amount of biomolecules than control, but resulted in higher extracellular DNA and RNA amounts (absolute values) than untreated control, and these data are biologically relevant. The leakage amounts were 1.43 mg/mL (total proteins), 26.1 ng/ $\mu$ L (ssDNA), 39.7 ng/ $\mu$ L (dsDNA), and 31.5 ng/ $\mu$ L (RNA) for OEO-treated bacteria. CAR-treated *E. coli* showed the following leakage amounts: 1.568 mg/mL (total protein), 27.95 ng/ $\mu$ L (ssDNA), 42.25 ng/ $\mu$ L (dsDNA), 34.15 ng/ $\mu$ L (RNA). Thy-treated *E. coli* showed the following leakage amounts: 1.99 mg/mL (total protein), 30.15 ng/ $\mu$ L (ssDNA), 46.25 ng/ $\mu$ L (dsDNA), and 37.1 ng/ $\mu$ L (RNA). The leakage amounts were 0.185 mg/mL (total protein), 7.8 ng/ $\mu$ L (ssDNA), 12.1 ng/ $\mu$ L (dsDNA), and 9.9 ng/ $\mu$ L (RNA) for bioAgNP. Combination-treated *E. coli* (Thy plus bioAgNP) showed the following leakage amounts: 0.733 mg/mL (total protein), 15.55 ng/ $\mu$ L (ssDNA), 23.4 ng/ $\mu$ L (dsDNA), and 18.55 ng/ $\mu$ L (RNA).

### 3.10 Electron Microscopy Study of Bacteria

Figure 6A-F shows the scanning electron micrographs of effect of OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and combination of Thy plus bioAgNP against *E. coli* ATCC 25922. Untreated bacterial sample showed typical size and rod-shaped cells after 30 min of incubation (Figure 6A). Inset images (higher magnification) show intact surface of standard *E. coli* (Figure 6A – inset). OEO-treated cells were damaged (surface protrusions), with no typical size of bacterial species, and their population showed slightly less amount of cell compared to untreated control (Figure 6B). Inset image shows details, in higher magnification, of morphological changes on cell surface (Figure 6B – inset). CAR-treated cells were also damaged (surface protrusions) and

their population presented slightly lower density compared to untreated control (Figure 6C). Inset image shows (high magnification) of cell surface damages (Figure 6C – insets). Treatment with Thy showed cell-density decrease and caused similar surface protrusions (Figure 6D). Inset show, in higher magnification, the morphological surface changes (Figure 6D – inset). BioAgNP-treated sample showed very deformed cells, with no typical size and shape of *E. coli*, and damages appeared as cell surface blebbing (Figure 6E). Inset image shows details, in higher magnification, of cell injuries (Figure 6E – inset). Cells treated with combination of Thy plus bioAgNP (Figure 6F) were quite deformed (surface protrusions) and with no *E. coli* common size; such changes are shown in detail in inset image. Slightly cell density decrease was observed in OEO, CAR, and Thy-treated samples compared to untreated control. This reduction does not represent decrease in viable cells amount, since the concentrations of antimicrobials were subinhibitory; possibly it is result of cell loss during preparation of samples for microscopy analysis, such as several washes steps.

Figure 7A-D shows transmission electron micrographs of antibacterial effect of bioAgNP against *E. coli* ATCC 25922. Control cells (without treatment) showed no changes in cell morphology, presenting intact cell wall and cytoplasmic membrane. Untreated bacterial cells also showed regular electron density (Figure 7A). BioAgNP-treated *E. coli* showed morphological changes such as disruption of cellular wall and cytoplasmic membrane, corroborating the SEM results. Treated bacterium also presented decrease in electron density compared to untreated *E. coli* (Figures 7B-D).

### 3.11 Cytotoxicity in Human Erythrocytes

Figure 8A-F shows hemolytic activity of antimicrobials individually (OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and AgNO<sub>3</sub>) and *F. oxysporum*-free solution used in bioAgNP synthesis. Antimicrobial CC<sub>50</sub> in red blood cells (RBC) were 8.27 mg/mL (OEO; Figure 8A), 4.29 mg/mL (CAR; Figure 8B), 0.61 mg/mL (Thy; Figure 8C), 770 μM (bioAgNP; Figure 8C), and >2000 μM (AgNO<sub>3</sub>; Figure 8E). Fungal-free solution showed extremely low hemolytic activity even at highest tested concentration (Figure 8F).

Table 7 shows hemolytic activity of antimicrobials in combination (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy). All four double-antibacterial combinations showed slightly higher activity to erythrocytes compared to individual compounds. However, all combined treatments showed no CC<sub>50</sub> in RBC at tested concentrations, especially at MIC.

### 3.12 Prolonged Exposure of *E. coli* to Antimicrobials

Results of initial studies on prolonged exposure to antimicrobials are shown in supplementary material (Supplementary Table 2). *E. coli* grew in the presence of bioAgNP subinhibitory concentrations during the first 11 days of treatment; after 12 days of prolonged exposure to silver, bacterial grew at bioAgNP MIC, since then this microorganism was no longer susceptible to bioAgNP concentrations that were gradually increased. After 25 days of bioAgNP treatment, mean MIC value was >16-fold greater than before, changing from 92.5 μM to >1480 μM. After prolonged treatment with subinhibitory concentrations of Thy individually or combined to bioAgNP, *E. coli* did not change its sensitivity, since mean MIC values were the same before and after experiment; 0.25 mg/mL for Thy, and 0.06 mg/mL and 46.25 μM for Thy and bioAgNP in combination respectively. Sample that received combination-prolonged treatment also did not develop tolerance to bioAgNP. Bacterial samples did not show changes (after prolonged exposure to all antimicrobials) with regard to biochemical characteristics,

colony morphology and response to the Gram-staining according the following test results: positive for glucose fermentation, gas production, bacterial movement, production of lysine de carboxylase, indole production, lactose fermentation; negative for hydrogen sulphide production, presence of urease and L-tryptophan deaminase, citrate utilization, and negative Gram-staining.

#### 4 Discussion

This study shows for the first-time antibacterial effect of combinations containing bioAgNP (synthesized with *F. oxysporum* components) and oregano bioactive molecules such as CAR and Thy. Our results highlight the powerful action of these antimicrobial combinations against Gram-negative bacteria, including carbapenem-resistant strains such as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa* that have become a major concern in hospitals worldwide. BioAgNP combined with oregano derivatives may previne emergence of bacterial resistance, besides also expanding application of these terpenoids, since additive interaction reduce their organoleptic effects.

This research showed that oregano-derived antimicrobials have potent bactericidal activity at low doses, in agreement with previous studies, but with slight variations in MIC and time of action due to differences in OEO composition and purification processes of CAR and Thy (Barros et al., 2009; Magi et al., 2015; Scandorieiro et al., 2016; Wijesundara and Rupasinghe, 2018; Sim et al., 2019; Kozics et al., 2019; Ebani et al., 2020). As seen in Table 1, MIC values obtained in our study ranged from 0.15 to 2.38 mg/mL for OEO, from 0.15 to 1.22 mg/mL for CAR, and from 0.25 to 1 mg/mL for Thy. Furthermore, oregano-derived compounds were bactericidal against all tested multidrug-resistant strains. OEO MBC values were 0.59 mg/mL against KPC-producing Enterobacteriaceae (*E. coli* and *K. pneumoniae*), and 1.19 mg/mL against carbapenem-resistant non-Enterobacteriaceae strains (*A. baumannii* and *P. aeruginosa*) and MRSA. CAR MBC values were 0.61 mg/mL against carbapenem-resistant strains such as Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa*. Thy MBC values were 0.5 mg/mL against carbapenem-resistant Gram-negative strains (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*) and 1 mg/mL for MRSA. Similar results were found by other researchers, Kozics et al. (2019) reported that OEO MIC values were 0.5 mg/mL against *K. pneumoniae* and 1.25 mg/mL for *P. aeruginosa*; both multidrug-resistant strains. Sim et al. (2019) reported that MBC of oregano compounds against *P. aeruginosa* strains ranged from 0.563 to 1.173 mg/mL (OEO), 0.585 to 1.12 mg/mL (CAR), and 0.4 to 0.8 mg/mL (Thy).

Our time kill assays showed that the three oregano compounds have bactericidal and extremely fast action (within a few seconds), corroborating with other studies (Barros et al., 2009; Scandorieiro et al., 2016; Wijesundara and Rupasinghe, 2018; Sim et al., 2019). Figure 2 shows that OEO, CAR, and Thy (at MIC) reduced bacterial population by approximately 5 log after at least 10 s of treatment. There were no detected viable cells after 10 s of exposition to OEO (carbapenem-resistant strains such as *K. pneumoniae* and *A. baumannii*, and MRSA), CAR (reference *E. coli*, carbapenem-resistant *A. baumannii*, and MRSA), and Thy (reference *E. coli*, KPC-producing *K. pneumoniae*, and MRSA). Sim et al. (2019) showed that OEO, CAR, and Thy reduced approximately 6.5 log of *P. aeruginosa* cells after 1 h of treatment. Wijesundara and Rupasinghe (2018) research showed that OEO caused 99.9 % elimination of initial *Streptococcus pyogenes* inoculum after 5 min of exposure.

Antimicrobial activity of essential oils may not rely exclusively on their main constituents, but it results from interactions among main compounds and minor components such as phenols, aldehydes, ketones, alcohols, esters, ethers, hydrocarbons, and others (Bassolé

and Juliani, 2012; Hyldgaard et al., 2012). Our study shows that combination containing pure CAR and Thy presented synergistic and additive antibacterial interactions (Table 6); CAR plus Thy showed higher antibacterial activity than both compounds individually, since combination reduced significantly MIC values by 78.18% for CAR and 74.75% for Thy, such results are in agreement with Pei et al. (2009), Rivas et al. (2010), and Zhou et al. (2007). However, antibacterial activity of crude OEO alone is similar to pure CAR or pure Thy individually (Table 1), since their average MIC values were statistically similar ( $p > 0.05$ ). In our result, even though OEO has CAR and Thy in its composition, synergistic interaction between main components is not evident in oil activity; small amount of Thy (2%) or crude OEO trace components may interfere with oil activity and may mask synergism between CAR and Thy. Unlike what we observed in our results, some studies reported that trace components in crude oil may help in its activity, showing that oil present higher antimicrobial activity compared to main components (individually or in combination) or synergistic interaction between p-cymene and CAR (Burt, 2004; Lambert et al., 2001; Lambert et al., 2001; Rattanachaiakunsopon and Phumkhachorn, 2010; Hyldgaard et al., 2012). Some studies suggest that minor components may cause antagonistic interactions, since main component alone is more effective than crude oil (Rao et al., 2010; Hyldgaard et al., 2012; Magi et al., 2015). Regarding our data, it is important to highlight that such oil trace elements were not antagonistic since OEO did not show worse antibacterial effect than CAR and Thy alone. Some slight variations in antimicrobial data from different studies (with oregano compounds) may occur because such antimicrobials derive from plants and undergo variations in their chemical composition, which depend on climatic, geographical and extraction methods, among others (Leyva-López et al., 2017; Gavahian et al., 2018).

Some studies have found that Gram-positive strains are more sensitive to essential oil, including oregano derivatives. It may happen due such oils directly impair the cytoplasmic membrane, since that bacteria cell wall lacks the outer membrane which is barrier that prevents easy access of hydrophobic molecules (Stojković et al., 2013; Sakkas and Papadopoulou, 2017; Khan et al., 2019; Sim et al., 2019). Our study indicates that OEO, CAR and Thy have broad-spectrum action in agreement with results reported by other researches (Rosato et al., 2010; Alvarez et al., 2014; Scandorieiro et al., 2016), showing all three compounds have similar activity with regard to time of action (Figure 2) and MIC (Table 2) against Gram-positive and Gram-negative, including *P. aeruginosa* whose wall cell is rich in porins. The variation of results among different studies may rely on oregano derivatives chemical composition and methods of extraction, as mentioned before. In addition, different bacterial strains used in several studies may have structural and metabolic variations, for example some strains have more porins than others, such differences may make them more or less sensitive to such compounds.

Our RBC toxicity assay (Figure 8) showed that  $CC_{50}$  values were 8.27 mg/mL (OEO), 4.29 mg/mL (CAR) and 0.61 mg/mL (Thy). OEO, CAR, and Thy show low toxicity to RBC, since most of the tested bacteria were inhibited by oregano derivatives at concentrations below  $CC_{50}$ . The low toxicity of OEO and CAR to RBC are reported by other studies (Türkez and Aydin, 2013; Mancini et al., 2014; Cacciatore et al., 2015). Our previous study with another OEO batch showed that this oil was not toxic to human blood cells (Scandorieiro et al., 2016). Cacciatore et al. (2015) reported that CAR did not show hemolytic activity at its MIC values. Türkez and Aydin (2013) studies showed that CAR exhibited non-mutagenic and antioxidant properties against human lymphocytes.

Due their strong antimicrobial property, oregano derivatives such as OEO, CAR and Thy have potential to be applied as antibiotics in food industry (Alvarez et al., 2014; Gavahian et

al., 2018; Karam et al., 2019), in cosmetic products (Suzuki et al., 2015; Laothaweerungsawat et al., 2020), human and veterinary clinical and hospital sectors (Mir et al., 2019; Tahmasebi et al., 2019; Arafa et al., 2020; Laothaweerungsawat et al., 2020). However, high volatile character and remarkable organoleptic features of oregano-derived compounds may limit their use, thus alternatives to solve these limitations are required (Alvarez et al., 2014; Kotronia et al., 2017). In order to overcome such problems, our research group proposes the association of these oregano-derived compounds with bioAgNP; undesired organoleptic effects of oregano derivatives maybe be reduced, since synergistic or additive combination decrease the necessary concentration of each antimicrobial. So, our team synthesized silver nanoparticles; with regard to biogenic synthesis of nanoparticles, the appearance of yellowish-brown color in AgNO<sub>3</sub> solution containing fungal components suggested bioAgNP formation. This changing of color (from transparent to brown) and solution absorption peak centered at 420 nm (plasmonic band, showed by Figure 1) indicated that bioAgNP were synthesized. Photon correlation spectroscopy (Supplementary material) and scanning microscopy analysis (Figure 1) confirmed nanoparticles formation. Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer analysis confirmed the presence of Ag in nanoparticle samples.

In this study, bioAgNP exhibited broad-spectrum antibacterial action (Table 2), inhibiting growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, in agreement with literature (Durán et al., 2016a, 2016b; Scandorieiro et al., 2016; Singh et al., 2016; Lima et al., 2019; Dalir et al., 2020; Sathiyaseelan et al., 2020; Urzedo et al., 2020). Our results showed that mean bioAgNP MIC ( $92 \pm 50 \mu\text{M} = 9.94 \pm 5.40 \mu\text{g/mL}$ ) is similar to values reported by previous studies about same nanoparticles, which were produced with *F. oxysporum* components, showing spherical shape, similar size, zeta potential and capping agents (Cardozo et al., 2013; Marcato et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015; Scandorieiro et al., 2016). With regard to MIC, bioAgNP were equally effective against Gram-positive and negative strains, these results are in line with other studies (Ghosh et al., 2013; Cavassin et al., 2015; Singh et al., 2016). Some researchers have found that Gram-positive strains are more tolerant to these nanoparticles, since their MIC values were higher compared to their values against Gram-negative (Kim et al., 2011; Dalir et al., 2020; Sathiyaseelan et al., 2020). However, our data showed that bioAgNP time of action (Figure 2) was faster against Gram-negative in agreement with some studies (Jain et al., 2009; Agnihotri et al., 2014; Scandorieiro et al., 2016). Our data of SEM micrographs also show that bioAgNP cause greater surface alterations in *E. coli* (Figure 6) than *S. aureus* (Scandorieiro et al., 2016). It was difficult to compare our results with literature, since silver nanoparticles may vary according many aspects that interfere in their antimicrobial activity such as size, morphology, type and presence of stabilizing agents, and surface charge (Ayala-Núñez et al., 2009; Agnihotri et al., 2014; Durán et al., 2016a; Nisar et al., 2019; Sánchez-López et al., 2020). Besides that, different studies employ distinct techniques for nanoparticles characterization and microbiological analysis, which affect the conclusion with regard to their antimicrobial activity. We highlight the importance of standardization of bioAgNP characterization and their microbiological assays (Durán et al., 2016b).

BioAgNP produced with *F. oxysporum* method were not cytotoxic to human RBC (Figure 8); since their CC<sub>50</sub> was 740  $\mu\text{M}$  (80  $\mu\text{g/mL}$ ) and MIC ranged from 46.25 to 185  $\mu\text{M}$ . Spectrophotometric analysis indicated that bioAgNP caused minimal damage to blood cells and very little hemoglobin loss at concentrations which are efficient against bacteria. Other studies also have shown the minimal toxicity of bioAgNP (Choi et al., 2011; Lima et al., 2012; Marcato et al., 2013; Scandorieiro et al., 2016). Marcato et al. (2013) reported that bioAgNP (also produced with *F. oxysporum*) showed no toxic effect to fibroblast at their effective concentrations against bacteria. Choi et al. (2011) studied AgNP whose CC<sub>50</sub> against RBC was 700  $\mu\text{g/mL}$ .

The same bioAgNP studied by our research team showed toxicity against HEP-2 cells at MIC against bacteria (Longhi et al., 2016; Scandorieiro, 2016); probably due to their antitumor action (Shi et al., 2016; da Silva et al., 2018; Hembram et al., 2018). Several studies indicate that toxicity of these metal nanoparticles is dependent on several factors, such as size, morphology and capping agents (Hanan et al., 2018; Hembram et al., 2018). However, biogenic AgNP are eco-friendly and less toxic than chemically synthesized nanoparticles, since chemical reagents are not used as reducing or stabilizing agents (Lima et al., 2012). Our results indicated that fungal-free solution showed no hemolytic activity or antibacterial activity (Figure 8); suggesting that these bioAgNP biological activity is due to silver nanoparticle and not to fungal traces.

BioAgNP and AgNO<sub>3</sub> showed similar antibacterial efficiency with regard to their MIC values (Table 1). Some studies suggest that silver nanoparticles have mechanisms of action different from salt-derived silver ion (Despax et al., 2011; Xiu et al., 2012; Yan et al., 2018). In this current study, bioAgNP show 72.57 nm on average; probably the relatively large size did not interfere with their antibacterial activity, and also it may result in no toxicity (data shown in hemolytic assay). However, it is necessary to investigate how coat-proteins of these AgNP (Durán et al., 2005) influence their antibacterial activity to know in details the mechanism of action as antibacterial.

Although bioAgNP show low toxicity and broad antibacterial action, bacteria can easily develop resistance to these nanoparticles by simple and fast genetic changes (Losasso et al., 2014; Graves et al., 2015; Panáček et al., 2017; Muller, 2018). In this study, we show that *E. coli* ATCC 25922 became tolerant to bioAgNP after only 12 days of daily treatment with this nanometal; MIC value increased from 92.5 to >1480 µM after 25 days of daily treatment (data is shown in supplementary material, Supplementary Table 2). Thus, alternative studies are needed to work around bioAgNP emergence of resistance. However, *E. coli* ATCC 25922 did not develop resistance to Thy plus bioAgNP, neither to bioAgNP, after daily exposition to combination composed of Thy plus bioAgNP (Supplementary Table 2).

Combinatory antimicrobial therapy is recommended as a strategy to control antimicrobial resistance and extend the life of antimicrobial agents, since multiple drug treatment may disrupt many bacterial functions and reduce selection of resistant strains (Yap et al., 2014; Suzuki et al., 2017; Raymond, 2019; Tyers and Wright, 2019). Combinations containing conventional antibacterials are already practiced in clinical settings to combat resistant Gram-positive and Gram-negative strains (Jacobs et al., 2017; Doi, 2019; Eades et al., 2017). BioAgNP showed antimicrobial synergistic or additive effect when combined with several essential oils, their main constituents, and other natural compounds (Cardozo et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015; Otaguiri et al., 2016; Scandorieiro et al., 2016; Dehkordi et al., 2019), some conventional antimicrobials and other materials or drugs (Kora and Rastogi, 2013; Longhi et al., 2016; Andrade et al., 2017; Bankier et al., 2019; Bocate et al., 2019; Figueiredo et al., 2019; Vazquez-Muñoz et al., 2019; Meroni et al., 2020), such as phenazine-1-carboxamide, eugenol, oregano oil, copaiba oil, carbon dots, tungsten carbide nanoparticles, copper nanoparticles, simvastatin, fluconazole, carbenicillin, streptomycin, ampicillin, tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol. Other studies have also reported antimicrobial synergistic or additive effect of oregano derivatives in combination with others natural compounds (Airi et al., 2020; Cho et al., 2020) and several conventional antimicrobials (Magi et al., 2015; Yap et al., 2014; Hamoud et al., 2014; Langeveld et al., 2014; Xiao et al., 2020) such as cinnamon essential oil, thyme-derived Thy, cinnamon bark essential oil, erythromycin, fluoroquinolones, doxycycline, lincomycin, vancomycin, amoxicillin, gentamicin, levofloxacin, ciprofloxacin, rifampin, polymyxin, and others.

Our double-combined compounds assays showed that the four combinations (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy) inhibited the growth of all tested bacteria, including multidrug-resistant strains (Tables 3-6). Combinations reduced the MIC values when compared to individual treatments in agreement with other studies involving essential oils and/or bioAgNP (Pei et al., 2009; Rivas et al., 2010; Cardozo et al., 2013; Biasi-Garbin et al., 2015; Longhi et al., 2016; Otaguiri et al., 2016; Scandorieiro et al., 2016; Figueiredo et al., 2019; Ayari et al., 2020; Cho et al., 2020). Two combinations (Thy plus bioAgNP-Table 5 and CAR plus Thy-Table 6) reduced significantly MIC values for 90% of tested strains, showing additive antibacterial interaction. None of the four combinations showed antagonistic antimicrobial interaction for all tested strains (Tables 3-6).

This study showed, by first time, the potent antibacterial activity of bioAgNP (produced with *F. oxysporum* components) combined to CAR and Thy, and also that combinations between oregano derivatives (OEO, CAR, and Thy) and these bioAgNP have potent activity against carbapenem-resistant strains such as *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. The combination composed by Thy and bioAgNP not only reduced required dose of each compound to inhibit bacterial growth; also showed antibacterial action in shorter time compared to individual bioAgNP, decreasing time required for 5 log reduction from 4 h to 10 min to KPC-producing *K. pneumoniae*.

The compounds in combination were non-toxic to erythrocytes at MIC values, since they did not cause even 50% of hemolysis ( $CC_{50}$  of combinations was not found). All tested combined concentrations between oregano compounds and bioAgNP (OEO + bioAgNP, CAR + bioAgNP, Thy + bioAgNP, and CAR + Thy) did not caused high degree of hemolysis; even additive effect (shown as antibacterial) between compounds did not affect RBC. Thy alone showed greater hemolytic activity than other compounds (Figure 8), however Thy in combination with CAR or bioAgNP was not toxic to RBC at their MIC values (Table 7).

Reference and multidrug-resistant strains showed similar sensitivity to oregano derivatives (OEO, CAR, and Thy) and bioAgNP; individually and in combination (Table 2). Resistance mechanisms to conventional antimicrobials did not make bacteria also tolerant to terpenoids or bioAgNP. Therefore, mechanism of action of these alternative antimicrobials may not be related to these resistance mechanisms. It is also the first time that initial characterization of mechanism of action of Thy plus bioAgNP (produced by *F. oxysporum*), against *E. coli*, was performed. This combination was chosen among others because we observed that Thy is the oregano derivative with less organoleptic effect, and this combination also showed additive effect against most tested strains.

MIC represents one particular degree of antibacterial effect, which produce dramatic changes in bacteria. Subinhibitory concentration also produce effects on bacterial growth, cell morphology, ultrastructure and virulence (Zhanel et al., 1992; Vasilchenko and Rogozhin, 2019). Our short time kill assay showed ideal concentrations of antibacterials to be used in antibacterial activity characterization (initial study of their mechanisms of action). Concentrations that did not cause reduction in bacterial inoculum were chosen, so the identified bacterial alterations may be due to action of antimicrobials; not due to cell death process which represent indirect bacterial changes.

In our study, SEM analysis (Figure 6) showed that all tested antimicrobials (OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and combination between Thy and bioAgNP) resulted in highly deformed cells, causing physical damage and considerable morphological changes (surface blebbing) in *E. coli* as confirmed by other assays (ATP, membrane leakage of biomolecules, and oxidative stress

tests). The surface protrusions indicate disruption of cellular wall and cytoplasmic membrane, and cytoplasmic material being released in agreement with other studies (Kim et al., 2011; Scandorieiro et al., 2016a; Figueiredo et al., 2019). Thy, bioAgNP, and combination caused oxidative stress that resulted in high MDA production; lipid peroxidation reduce membrane fluidity, which alters the properties of this structure and may disrupt membrane-bound proteins (Cabisco et al., 2000). This suggests that Thy, bioAgNP, and combination between them may damage the cell membrane directly or indirectly by oxidative stress. OEO and CAR acted as antioxidants, which suggests that both damage the cell membrane directly.

In our microscopy experiments, cells with no typical size are observed in all treatments. Increase in cell size is evident in samples treated with OEO or Thy plus bioAgNP (cells looked turgid compared to control), such results probably is related to release of internal cells material that may effect on bacterial osmoregulatory capacity (Hartmann et al., 2010), and also to cell wall damage that probably lost ability to limit bacterial volume.

Our MET study (Figure 7) indicated that bioAgNP treatment cause disruption of cellular wall and cytoplasmic membrane, and decrease in electron density compared to untreated control, corroborating the SEM and other assays results; which confirmed that bioAgNP induce bacteria to release cellular material. Cytoplasmic membrane is one of the most active structures of bacterium, being responsible for most of its cellular functions. BioAgNP can sustainably release  $\text{Ag}^+$  that binds to sulfhydryl groups in enzymes and proteins (Qing et al., 2018). Some studies suggest bioAgNP antibacterial action involves mainly Ag ion, others researchers highlight the importance of intrinsic effects of nanoparticle (Despax et al., 2011; Yin et al., 2011; Levard et al., 2012; Xiu et al., 2012; Kedziora et al., 2018; Qing et al., 2018). Although their mechanism of action is not fully understood, it is known which bacterial structures are affected by bioAgNP. Since bioAgNP cause damage to bacterial membrane, countless negative consequences may happen to cell such as dissipation of proton motive force, destabilization of outer membrane of cell wall, collapse of membrane potential, depletion of intracellular ATP level, damage to respiratory chain, among other (Lok et al., 2006; Li et al., 2010; Kim et al., 2011; Dakal et al., 2016; Qing et al., 2018). Huq (2020) reported that green-synthesized silver nanoparticles cause morphological and ultrastructural changes in *S. aureus* and *P. aeruginosa*; SEM analysis showed irregularly wrinkled, damaged, deformed and cracked outer surfaces. Feng et al. (2000), Li et al. (2010), Ninganagouda et al. (2014) showed by electron microscopy that nanosilver cause damage to bacterial cell membrane and wall, leading to disruption of such structures and causing release of cytoplasmic material.

If ROS increase intensely, it can lead to oxidative stress. Oxidative stress can result in damage to cells lipids, proteins and DNA. Example of ROS include superoxide ( $\text{O}_2^-$ ), Hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ), Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), among other (Woolley et al., 2013; Flores-López et al., 2019). In this study we used probe fluorescein isothiocyanate (FITC), which reacts with nucleophiles such as amine, sulfhydryl groups, and phenolate ion of tyrosine on proteins; oxidation-reduction process occurs between ROS and reduced probe, which fluoresces upon oxidation (Woolley et al., 2013; Hermanson, 2013). Lipid peroxidation is also marker for oxidative stress; it indicates the lipid degradation that happens as result of oxidative damage. Polyunsaturated lipids are susceptible to oxidative attack by ROS, resulting in end products such as malondialdehyde (MDA) (Cabisco et al., 2000; Tsikas, 2017). In this study, lipid peroxidation was detected by reaction between thiobarbituric acid (TBA) and MDA.

In this study, healthy untreated bacterial cells produced ROS as natural bioproducts of aerobic respiration (Muras et al., 2019). Thy and bioAgNP significantly caused ROS production in *E. coli* compared to untreated control in line with other studies (Kim et al., 2011; Li et al.,

2014; Ninganagouda et al., 2014; Shen et al., 2016; Yan et al., 2018; Al-kandari et al., 2019; Al-sharqi et al., 2019; Liao et al., 2019); combination of both Thy plus bioAgNP also increased ROS production by *E. coli*. In addition to protein oxidation, lipid oxidation also occurred. Lipid peroxidation assay showed that Thy, bioAgNP and combination of both caused oxidative stress in line with ROS assay, since treated bacterial samples presented significantly higher levels of MDA than untreated control; other studies also reported that Thy and AgNP stimulate MDA production (Gao et al., 2016; Thombre et al., 2016; Qing et al., 2018; Quinteros et al., 2018; Yuan et al., 2018). The oxidative stress data are shown in Figure 3.

In our study, exactly at the beginning of treatment with Thy (0 h), *E. coli* produced significantly higher amount of ROS than untreated control (Figure 3A) Although antioxidant activity of Thy has been reported for animal cells (Chauhan and Kang, 2014; Coccimiglio et al., 2016; Meeran et al., 2017), some studies have shown that its antimicrobial activity involves ROS production (Shen et al., 2016; Al-kandari et al., 2019). Yuan et al. (2018) showed that genes related to oxidative stress defense were upregulated in Thy-treated *E. coli* O157:H7. It suggests that Thy might impose oxidative stress on bacteria cells, since their biological aspects of oxidative stress differ from animal. Our time kill assay (Figure 1) and ROS assay (Figure 3A) show that Thy acted against bacterial populations immediately at beginning of treatment, at this stage bacteria was not growing up and this condition exposed cells permanently to all produced amount of ROS; rapid cell division that happens in log phase is character that reduce damages caused by oxidative stress, since ROS amount is shared among cells (Sigler et al., 1999).

Our data showed that bioAgNP individually or in combination with Thy increased ROS production later (after 1 h of treatment) (Figure 3A). Liao et al. (2019) reported excessive ROS-production in AgNP-treated *P. aeruginosa*, and also showed that antioxidants (reduced glutathione and ascorbic acid) partially antagonized AgNP antibacterial action. Same researchers showed that AgNP destroyed the REDOX homeostasis in that Gram-negative bacterium, causing alteration in gene expression and activity of redox relevant enzyme (superoxide dismutase, catalase, and peroxidase). Ninganagouda et al. (2014) studied biogenically synthesized AgNP; their results showed that nanoparticles induced ROS production in *E. coli*, and ascorbic acid reacted as a scavenger hindering excessive ROS-production. Quinteros et al. (2018) reported that AgNP generate oxidative stress in *E. coli* and *S. aureus* mediated by increase of ROS, which cause high levels of oxidized proteins and lipids, DNA fragmentation and modification in membrane potential.

Data regard to ROS (Figure 3A) are in line with time kill (Figure 2) that showed immediate antibacterial action of Thy (10 s), and later action of bioAgNP (30 min) and combination (10 min). ROS amount was higher in Thy-treated sample than bioAgNP or combination-treated samples, suggesting that ROS production contributes slightly more to antibacterial action of Thy than bioAgNP individually or in combination.

OEO and CAR presented antioxidant activity (Figure 3A), reducing significantly ROS production compared to control in agreement to literature (Rodriguez-Garcia et al., 2015; Gutiérrez-Grijalva et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2018; Hać-Szymańczuk et al., 2019). It has been reported that oregano antioxidant effect is due to flavonoids and phenolic acids such as rosmarinic acid, (-)-epicatechin, chicoric, caffeic acid, eriodictyol, naringenin, among others (Gutiérrez-Grijalva et al., 2017). Hać-Szymańczuk et al. (2019) reported that addition of OEO helped in prolonging the storage stability chickens for 9 months (vacuum-packed stored at frozen temperature) by limiting lipid peroxidation. CAR improves activity of enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in rat plasma for

example. CAR also preserve quality of seed oils, inhibiting formation of oxidative products that cause deterioration and undesirable flavors; it can be applied in poultry and fish feeding to improve growth performance and improve immunity, it also can extend shelf-life of food in package due to antioxidant property (Quiroga et al., 2014; Sharifi-Rad et al., 2018).

This present study indicate that oxidative stress is not a mechanism involved in antimicrobial activity of OEO and CAR against *E. coli*, but it is important in the mechanism of Thy, bioAgNP, and combination of both. Despite oxidizing action of Thy, our results suggest that CAR antioxidant action is prevalent in OEO, perhaps due this oil has high amount of CAR and a small amount of Thy. However, different extraction methods and variation in oil composition may lead to different results (Gutiérrez-Grijalva et al., 2017; Leyva-López et al., 2017; Gavahian et al., 2018).

ATP assay (Figure 4), measurement of cellular released materials (Figure 5), and electron microscopy (Figures 6-7) analysis suggest that tested oregano derivatives (OEO, CAR, and Thy), bioAgNP (synthesized with *F. oxysporum*) affected cytoplasmic membrane integrity of *E. coli* ATCC 25922, in agreement to literature. The same result observed for Thy and bioAgNP individually was detected for combination of both compounds. In this study, we used bioluminescence assay based on luciferin-luciferase reaction to measure ATP release from cells. ATP permeates cell membrane and reacts with external luciferase to produce luminescence with luciferin (Hara, 2009). ATP assay and quantification of extracellular biomolecules strongly suggest that oregano compounds and bioAgNP (individually or in combination) caused membrane damage. All tested antimicrobials caused higher loss of bacterial ATP and/or led to higher cellular contents leakage (total proteins, ssDNA, dsDNA, and RNA) compared to untreated cells in agreement to other studies (Lok et al., 2006; Caillet et al., 2009; Li et al., 2010; Kim et al., 2011; Nazzaro et al., 2013; Souza et al., 2013; Thombre et al., 2016; Khan et al., 2017; Nowotarska et al., 2017; Qing et al., 2018). Khan et al. (2017) showed that CAR altered membrane permeabilization in *E. coli*, since this terpenoid caused release of cellular material such as DNA and proteins, induced significant reduction on membrane electrical potential, increased crystal violet uptake, and induced structural disruption on cell surfaces detected by SEM and fluorescence microscopy using acridine orange and ethidium bromide. Several studies indicate that OEO, CAR and Thy displayed several effect on bacterial surface structures such as increased membrane permeability, cellular material release, membrane depolarization, physical change in cell surface, inhibition of efflux pumps, inhibition of membrane ATPases, reduction in intracellular ATP levels, inorganic phosphate and other ions, bacterial lysis, among others (Xu et al., 2008; Nazzaro et al., 2013; Scandorieiro et al., 2016b; Khan et al., 2017; Kachur and Suntres, 2019).

We highlight that Thy caused statistically greater release of ATP (Figure 4) compared to other treatments. In absolute values, CAR, bioAgNP and combination containing Thy plus bioAgNP caused greater loss of cellular ATP compared to untreated control. Oregano derived compounds (OEO, CAR and Thy) caused higher proteins, DNA and RNA loss than control and other treatments (that also caused intracellular material lost (Figure 5). ATP and biomolecules leakage assays suggest that damage to cell membrane contributes more to antibacterial mechanism of action of essential oils (or terpenoids) than bioAgNP.

In conclusion, the combination of Thy plus bioAgNP showed additive antibacterial action against multidrug-resistant Gram-positive and negative strains, at low doses and with extremely fast action. Its mechanism of action involves oxidative stress by enhancing intracellular ROS, which consequently caused a significant increase in MDA production (marker for lipid peroxidation); Thy plus bioAgNP also disrupted *E. coli* cytoplasmic membrane and cell wall

(microscopy-proven damage), resulting in releasing of cellular proteins, DNA, RNA, and ATP. Therefore, Thy combined to these bioAgNP has potential to be applied in industry (food package, cosmetic products, formulation of surface cleaners, for example), human and veterinary clinical and hospital settings (wound care supplies, for treating infection in burns, disinfectant products, for example), among others.

## 5 Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found in pages 297 – 299 (*Anexos A, B e C*).

## 6 References

- Adam, R. D. (2018). Antimicrobial resistance at a community level. *Lancet Planet. Heal.* 2, 473–474. doi:10.1016/S2542-5196(18)30239-0.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., and Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 4, 3974–3983. doi:10.1039/C3RA44507K.
- Alexander, J. W. (2009). History of the medical use of silver. *Surg. Infect.* 10:3, 289–292. doi:10.1089/sur.2008.9941.
- Al-Kandari, F., Al-temaimi, R., Vliet, A. H. M., and Woodward, M. J. (2019). Thymol tolerance in *Escherichia coli* induces morphological, metabolic and genetic changes. *BMC Microbiol.* 19:294, 1–11. doi: 10.1186/s12866-019-1663-8.
- Al-Sharqi, A., Apun, K., Vincent, M., Kanakaraju, D., and Bilung, L. M. (2019). Enhancement of the Antibacterial Efficiency of Silver Nanoparticles against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using Blue Laser Light. *Int. J. Photoenerg.* 2019. doi:10.1155/2019/2528490.
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., Bernal-Mercado, A. T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G. A., et al. (2014). Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Front. Microbiology.* 5:699, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2014.00699.
- Andrade, P. F., Nakazato, G., and Durán, N. (2017). Additive interaction of carbon dots extracted from soluble coffee and biogenic silver nanoparticles against bacteria. *J. Phys. Conf. Ser.* 838. doi: 10.1088/1742-6596/838/1/012028.
- Arafa, W. M., Abolhadid, S. M., Moawad, A., Abdelaty, A. S., Moawad, U. K., Shokier, K. A. M., et al. (2020). Thymol efficacy against coccidiosis in pigeon (*Columba livia domestica*). *Prev. Vet. Med.* 176:104914. doi:10.1016/j.pvetmed.2020.104914.
- Ayala-Núñez, N. V., Lara Villegas, H. H., Turrent, L. C. I., and Padilla, C. R. (2009). Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*, 5:4. doi:10.1007/s12030-009-9029-1.
- Ayari, S., Shankar, S., Follett, P., Hossain, F., and Lacroix, M. (2020). Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus*

- and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A. *Microb. Pathog.*, 141:104008. doi:10.1016/j.micpath.2020.104008.
- Bankier, C., Matharu, R. K., Cheong, Y. K., Ren, G. G., Cloutman-Green, E., and Ciric, L. (2019). Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Sci. Rep.* 9:16074. doi:10.1038/s41598-019-52473-2.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., Basílio Júnior, I. D., et al. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 1139–1143. doi:10.1016/j.lwt.2009.01.010.
- Bassolé, I. H. N., and Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006. doi:10.3390/molecules17043989.
- Behravan, M., Ayat, H. P., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R., and Mirzapour, A. (2019). Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 124, 148–154. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.101.
- Biasi-Garbin, R. P., Otaguiri, E. S., Morey, A. T., Silva, M. F., Morguette, A. E. B., Lancheros, C. A. C., et al. (2015). Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced Silver Nanoparticles. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015. doi:10.1155/2015/861497.
- Bocate, K. P., Reis, G. F., Souza, P. C., Souza, D., Oliveira, A. G., Durán, N., et al. (2019). Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *Int. J. Food Microbiol.* 291, 79–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.012.
- Bollenbach, T. (2015). Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 27, 1–9. doi:10.1016/j.mib.2015.05.008.
- Caballero, N. E. D., Alves, O. L., Esposito, E., and Souza, G. I. M., Gaspari, P. D. M. (2006). Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e no tratamento dos efluentes produzidos. Braz. Patent PI0605681-4A. Campinas : BR. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).
- Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internat. Microbiol.* 3:1, 3–8.
- Cacciatore, I., Giulio, M. Di, Fornasari, E., Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., et al. (2015). Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. *Plos One*, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0120937.
- Caillet, S., Ursachi, L., Shareck, F., and Lacroix, M. (2009). Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 74, 499–508. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01368.x.
- Calderón-Jiménez, B., Johnson, M. E., Bustos, A. R. M., Murphy, K. E., Winchester, M. R., and Baudrit, J. R. V. (2017). Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. *Front. Chem.* 5:6, 1–26.

doi:10.3389/fchem.2017.00006.

- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira, W. D., et al. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12:12. doi:10.1186/1476-0711-12-12.
- Cavassin, E. D., de Figueiredo, L. F. P., Otoch, J. P., Seckler, M. M., de Oliveira, R. A., Franco, F. F., et al. (2015). Comparison of methods to detect the *in vitro* activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J. Nanobiotechnology* 13:64, 1–16. doi:10.1186/s12951-015-0120-6.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention (2020a). Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR) - About Antibiotic Resistance. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> [Accessed March, 2020].
- CDC, Center for Disease Control and Prevention (2020b). Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR) - Biggest Threats and Data. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html> [Accessed March, 2020].
- CDC, Center for Disease Control and Prevention (2020c). Antibiotic Resistance, Food, and Food-Producing Animals. <https://www.cdc.gov/features/antibiotic-resistance-food/index.html> [Accessed March, 2020].
- Chauhan, A. K., and Kang, S. C. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. Typhimurium *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an *ex vivo* model. *Res. Microbiol.* 165, 559–565. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.001.
- Cho, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., and Ryu, J. (2020). Synergistic activities of gaseous oregano and thyme thymol essential oils against *Listeria monocytogenes* on surfaces of a laboratory medium and radish sprouts. *Food Microbiol.* 86. doi:10.1016/j.fm.2019.103357.
- Choi, J., Reipa, V., Hitchins, V. M., Goering, P. L., and Malinauskas, R. A. (2011). Physicochemical Characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 123:1, 133–143. doi:10.1093/toxsci/kfr149.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). *M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Available online at: <https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M07-A10.unlocked.pdf> [Accessed December, 2019].
- Coccimiglio, J., Alipour, M., Jiang, Z., Gottardo, C., and Suntres, Z. (2016). Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi:10.1155/2016/1404505.
- Codjoe, F. S., and Donkor, E. S. (2018). Carbapenem Resistance: A Review. *Med. Sci.* 6:1. doi:10.3390/medsci6010001.
- Colomb-Cotinat, M., Lacoste, J., Brun-Buisson, C., Jarlier, V., Coignard, B., and Vaux, S. (2016). Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 5:56. doi:10.1186/s13756-016-0154-z.

- da Silva, P. B., Machado, R. T. A., Pironi, A. M., Alves, R. C., de Araújo, P. R., Dragalzew, A. C., et al. (2018). Recent Advances in the Use of Metallic Nanoparticles with Antitumoral Action - Review. *Curr. Med. Chem.* 26:12, 2108–2146. doi:10.2174/0929867325666180214102918.
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., and Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7:1831, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2016.01831.
- Dalir, S. J. B., Djahaniani, H., Nabati, F., and Hekmati, M. (2020). Characterization and the evaluation of antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized from *Carya illinoensis* leaf extract. *Heliyon* 6. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03624.
- de Campos, A. C. L. P., Puño-Sarmiento, J. J., Madeiros, L. P., Gazal, L. E. S., Maluta, R. P., Navarro, A., et al. (2018). Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.* 15:2. doi: 10.1089/fpd.2017.2345.
- De Souza. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro:Sociedade Brasileira de Microscopia (2007).357p.
- Dehkordi, N. H., Tajik, H., Moradi, M., Kousheh, S. A., and Molaei, R. (2019). Antibacterial Interactions of Colloid Nanosilver with Eugenol and Food Ingredients. *J. of Food Prot.* 82:10, 1783–1792. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-174.
- Delgado-Gardea, M. C. E., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Serna, F. J. Z., Vega, G. E., Nevárez-Moorillón, G. V., et al. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park , Mexico. *Int. J. Environmental Res. Public Heal.* 13: 597, 1–15. doi:10.3390/ijerph13060597.
- Despax, B., Saulou, C., Raynaud, P., Datas, L., Mercier-Bonin, M. (2011). Transmission electron microscopy for elucidating the impact of silver-based treatments (ionic silver versus nanosilver-containing coating) on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nanotechnology*. 22:17. doi:10.1088/0957-4484/22/17/175101.
- Dhawde, R., Macaden, R., Saranath, D., Nilgiriwala, K., Ghadge, A., and Birdi, T. (2018). Antibiotic Resistance Characterization of Environmental *E. coli* Isolated from River, Pune District, India. *Int. J. Environmental Res. Public Heal.* 15:6, 1–15. doi:10.3390/ijerph15061247.
- Dhillon, R. H. P., and Clark, J. (2012). ESBLs : A Clear and Present Danger? *Crit. Care Res. Pract.* 2012. doi:10.1155/2012/625170.
- Doi, Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram- negative Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis. Suppl.* 69, 565–575. doi:10.1093/cid/ciz830.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., and Nakazato, G. (2016a). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12:3, 789–799. doi:10.1016/j.nano.2015.11.016.
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., Souza, G. I. H., and Esposito, E. (2005). Mechanistic

- aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology*. 3:8. doi:10.1186/1477-3155-3-8.
- Durán, N., Nakazato, G., and Seabra, A. B. (2016b). Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 6555–6570. doi:10.1007/s00253-016-7657-7.
- Eades, C., Hughes, S., Heard, K., and Moore, L. S. (2017). Antimicrobial therapies for Gram-positive infections. *Clin. Pharm.* 9:9. doi:10.1211/CP.2017.20203363.
- Ebani, V. V., Bertelloni, F., Najar, B., Nardoni, S., Pistelli, L., and Mancianti, F. (2020). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* Strains Isolated from Canine Dermatitis. *Microorganisms* 8:252, 1–16. doi:10.3390/microorganisms8020252.
- Ebrahiminezhad, A., Raei, M. J., Manafi, Z., Jahromi, A. S., and Ghasemi, Y. (2016). Ancient and Novel Forms of Silver in Medicine and Biomedicine. *J. Adv. Med. Sci. Appl. Technol.* 2:1, 122–128. doi: 10.18869/nrip.jamsat.2.1.122.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52:4, 662–668. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3.
- Figueiredo, E. P., Ribeiro, J. M., Nishio, E. K., Scandorieiro, S., Costa, A. F., Cardoso, V. F., et al. (2019). New Approach For Simvastatin As An Antibacterial : Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. of Nanomedicine*, 14, 7975–7985. doi:10.2147/IJN.S211756.
- Fischbach, M. A. (2011). Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:5, 519–523. doi:10.1016/j.mib.2011.08.003.
- Flores-López, L. Z., Espinoza-Gómez, H., and Somanathan, R. (2019). Silver nanoparticles : Electron transfer , reactive oxygen species , oxidative stress , beneficial and toxicological effects . Mini review. *J. Appl. Toxicol.* 39, 16–26. doi:10.1002/jat.3654.
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* . Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* 41:3, 430–449. doi:10.1093/femsre/fux007.
- Gao, T., Zhou, H., Zhou, W., Hu, L., Chen, J., and Shi, Z. (2016). The Fungicidal Activity of Thymol against *Fusarium graminearum* via Inducing Lipid Peroxidation and Disrupting Ergosterol Biosynthesis. *Molecules*, 21:770, 1–13. doi:10.3390/molecules21060770.
- Gavahian, M., Chu, Y., Lorenzo, J. M., Khaneghah, A. M., and Barba, F. J. (2018). Essential oils as natural preservatives for bakery products: Understanding the mechanisms of action, recent findings, and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60:2, 310–321. doi:10.1080/10408398.2018.1525601.
- Ghosh, I. N., Patil, S. D., Sharma, T. K., Srivastava, S. K., Pathania, R., and Navani, N. K. (2013). Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *Int. J. Nanomedicine* 8:1, 4721–4731. doi:10.2147/IJN.S49649.

- Graves, J. L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S. H., et al. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* 6:42, 1–13. doi:10.3389/fgene.2015.00042.
- Guimarães, A.C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Cesar, M., Guimar, C., Endringer, D. C., et al. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* 24, 1–12. doi: :10.3390/molecules24132471.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Picos-Salas, M. A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M. S., Vazquez-Olivo, G., and Heredia, J. B. (2017). Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* 7:2, 1–23. doi:10.3390/plants7010002.
- Hac-Szymanczuk, E., Cegiełka, A., Karkos, M., Gniewosz, M., and Piwowarek, K. (2019). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low- pressure mechanically separated meat ( BAADER meat ) from chickens. *Food Sci Biotechnol*, 28:2, 449–457. doi:10.1007/s10068-018-0491-1.
- Hanan, N. A., Chiu, H. I., Ramachandran, M. R., Tung, W. H., Zain, N. N. M., Yahaya, N. et al. (2018). Cytotoxicity of Plant-Mediated Synthesis of Metallic Nanoparticles: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 19:6. doi:10.3390/ijms19061725.
- Hara, K. Y. “Permeable Cell Assay : A Method for High-Throughput Measurement of Cellular ATP Synthetic Activity,” in *Reverse Chemical Genetics, Methods in Molecular Biology*, Hisashi Koga (2009). p.251–258. doi:10.1007/978-1-60761-232-2.
- Hartmann, M., Berditsch, M., Hawecker, J., Ardakani, M. F., Gerthsen, D., and Ulrich, A. S. (2010). Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:8, 3132–3142. doi:10.1128/AAC.00124-10.
- Hemram, K. C., Kumar, R., Kandha, L., Parhi, P. K., Kundu, C. N., and Bindhani, B. K. (2018). Therapeutic prospective of plant-induced silver nanoparticles: application as antimicrobial and anticancer agent. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 46:S3, S38–S51. doi:10.1080/21691401.2018.1489262.
- Huq, A. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and Their Antimicrobial Mechanisms Investigation against Drug Resistant Human Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 21:4. doi: 10.3390/ijms21041510.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L.(2012). Essential oils in food preservation: mode of action , synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3:12, 1–24. doi:10.3389/fmicb.2012.00012.
- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga, V. F., Pinto, A. C., and Nakamura, C. V. (2012). Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *J. Med. Chem.* 55:7, 2994–3001. doi:10.1021/jm201451h.
- Jacobs, D. M., Safir, M. C., Huang, D., Minhaj, F., Parker, A., and Rao, G. G. (2017). Triple combination antibiotic therapy for Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16:76, 1–12. doi:10.1186/s12941-

017-0249-2.

- Jain, J., Arora, S., Rajwade, J. M., Omay, P., Khandelwal, S., and Paknikar, K. M. (2009). Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol. Pharm.* 6:5, 1388–1401. doi:10.1021/mp900056g.
- Kachur, K., and Suntres, Z. (2019). The antibacterial properties of phenolic isomers , Carvacrol and thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* doi:10.1080/10408398.2019.1675585.
- Karam, L., Roustom, R., Abiad, M. G., El-Obeid, T., and Savvaidis, I. N. (2019). Combined effects of thymol, Carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 291, 42–47. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.008.
- Kedziora, A., Speruda, M., Krzyzewska, E., Rybka, J., Łukowiak, A., and Bugla-Płuskonska, G. (2018). Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanofoms as Antibacterial. Agents. *Int. J. Mol. Sci. Rev.* 19:2. doi:10.3390/ijms19020444.
- Khan, I., Bahuguna, A., Kumar, P., and Bajpai, V. K., and Kang, S. C. (2017). Antimicrobial Potential of Carvacrol against Uropathogenic *Escherichia coli* via Membrane Disruption , Depolarization, and Reactive Oxygen Species Generation. *Frontiers in Microbiology*, 8:2421, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2017.02421.
- Khan, M., Khan, S. T., Khan, M., Mousa, A. A., and Mahmood, A., and Alkhatlan, A. Z. (2019). Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L . and their effects on microbicidal activities. *AMB Express* 9:176. doi:10.1186/s13568-019-0893-3.
- Kim, S. H., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choi, S. J., and Lee, D. S. (2011). Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39:1, 77–85.
- Kobayashi, R. K. T., Nishio, E. K. ; Scandorieiro, S., Saikawa, G. I. A., da Rocha, S. P. D., and Nakazato, G. “Metallic nanoparticles as a potential antimicrobial for catheters and prostheses,” in *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier (2019).p.153–196.
- Koga, V. L., Rodrigues, G. R., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., Brito, B. et al. (2015). Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Paraná , Brazil . *Foodborne Pathog. Dis.* 12:6, 479–485. doi:10.1089/fpd.2014.1888.
- Kora, A. J., and Rastogi, L. (2013). Enhancement of Antibacterial Activity of Capped Silver Nanoparticles in Combination with Antibiotics, on Model Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Bioinorg. Chem. Appl.* doi: 10.1155/2013/871097.
- Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., and Detsi, A. (2017). Encapsulation of Oregano ( *Origanum onites* L .) Essential Oil in  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. *Bioengineering*, 4:3, 1–15. doi:10.3390/bioengineering4030074.
- Kozics, K., Bucková, M., Puškárová, A., Kalászová, V., Cabicarová, T., and Domenico, P. (2019). The Effect of Ten Essential Oils on Several Cutaneous Drug-Resistant Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. *Molecules* 24:24.

doi: 10.3390/molecules24244570.

- Laothaweerungsawat, N., Sirithunyalug, J., and Chaiyana, W. (2020). Chemical Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from Tropical and Mediterranean Region. *Molecules* 25:5, 1101. doi: 10.3390/molecules25051101.
- Lemire, J. a, Harrison, J. J., and Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–84. doi:10.1038/nrmicro3028.
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., and Brown, G. E. J. (2012). Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ. Science & Technology* 46, 6900–6914. doi:10.1021/es2037405.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., and Heredia, J. B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 22:6, 289. doi:10.3390/molecules22060989.
- Li, H., Yang, T., Li, F., Yao, Y., and Sun, Z. (2014). Antibacterial activity and mechanism of action of *Monarda punctata* essential oil and its main components against common bacterial pathogens in respiratory tract. *Int J Clin Exp Pathol* 7(11),7389-7398.
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., and Chen, Y. B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1115–1122. doi:10.1007/s00253-009-2159-5.
- Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Cheng, Z., et al. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine* 14, 1469–1487. doi: 10.2147/IJN.S191340.
- Lima, A. K. O., Vasconcelos, A. A., Sousa Júnior, J. J. V, Escher, S. K. S., Nakazato, G., and Taube Júnior, P. S. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Amazon Fruits. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* 15:3, 179–188.
- Lima, R., Seabra, A. B., and Durán, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32, 867–879. doi:10.1002/jat.2780.
- Llor, C., and Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther. Adv. Drug Saf. Rev.* 5:6, 229–241. doi:10.1177/2042098614554919.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., et al. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* 5:4, 916–924. doi:10.1021/pr0504079.
- Longhi, C., Santos, J. P., Morey, A. T., Marcato, P. D., Durán, N., Pinge-Filho, P., et al. (2016). Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Medical Mycology* 54:4, 428–432. doi:10.1093/mmy/myv036.
- Losasso, C., Belluco, S., Cibin, V., Zavagnin, P., Micetic, I., Gallochio, F., et al. (2014).

- Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front. Microbiol.* 5:227, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00227.
- Machado, L. F., Sanfelice, R. A., Bosqui, L. R., Assolini, J. P., Scandorieiro, S., Navarro, I. T., et al. (2019). Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. *Exp. Parasitol.* 211. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107853.
- Magi, G., Marini, E., and Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.* 6:165. doi:10.3389/fmicb.2015.00165.
- Mancini, E., Camele, I., Elshafie, H. S., Martino, L., Pellegrino, C., Grulova, D., et al. (2014). Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from Different Areas in the Southern Apennines (Italy). *Chem. Biodivers.* 11:4, 639–651. doi: 10.1002/cbdv.201300326.
- Marcato, P. D., Nakazato, G., Brocchi, M., Melo, P. S., Huber, S. C., Ferreira, I. R., et al. (2012). Biogenic silver nanoparticles: Antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics. *J. Nano Res.* 20, 69–76. doi:10.4028/www.scientific.net/JNanoR.20.69.
- Marcato, P. D., Parizotto, N. V., Martinez, D. S. T., Paula, A. J., Ferreira, I. R., Melo, P. S., et al. (2013). New hybrid material based on layered double hydroxides and biogenic silver nanoparticles: Antimicrobial activity and cytotoxic effect. *J. Braz. Chem. Soc.* 24:2, 266–272. doi:10.5935/0103-5053.20130034.
- Meeran, M. F. N., Javed, H., Tae, H. A., Azimullah, S., and Ojha, S. K. (2017). Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front. Pharmacol.* 8:380, 1–34. doi:10.3389/fphar.2017.00380.
- Meroni, G., Filipe, J. F. S., and Martino, P. A. (2020). *In Vitro* Antibacterial Activity of Biological-Derived Silver Nanoparticles: Preliminary Data. *Vet. Sci.* 7:1, 1–12. doi:10.3390/vetsci7010012.
- Mir, M., Permana, A. D., Ahmed, N., Khan, G. M., Rehman, A., and Donnelly, R. F. (2019). Enhancement in Site-Specific Delivery of Carvacrol for Potential Treatment of Infected Wounds Using Infection Responsive Nanoparticles Loaded into Dissolving Microneedles: A Proof of Concept Study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 147, 57–68. doi:10.1016/j.ejpb.2019.12.008.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., and Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* 10:539. doi:10.3389/fmicb.2019.00539.
- Muller, M. (2018). Bacterial Silver Resistance Gained by Cooperative Interspecies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62:8. doi: 10.1128/AAC.00672-18.
- Munita, J. M., Bayer, A. S., and Arias, C. A. (2015). Evolving Resistance Among Gram-positive Pathogens. *Suppl. Artic.* 61:2, 48–57. doi:10.1093/cid/civ523.
- Muras, V., Toulouse, C., Fritz, G., and Steuber, J. “Respiratory Membrane Protein Complexes

- Convert Chemical Energy,” in *Bacterial Cell Walls and Membranes*. Kuhn A. (2019).p.301–335. doi:10.1007/978-3-030-18768-2\_10.
- Nakazato, G., Kobayashi, R. K., Seabra, A. B., and Duran, N. “Use of nanoparticles as a potential antimicrobial for food packaging,” in *Food Preservation* (2017). 413–447.doi: 10.1016/B978-0-12-804303-5.00012-2.
- Nakazato, G., Lonni, A. A. S. G., Panagio, L. A., de Camargo, L. C., Gonçalves, M. C., Reis, G. F., et al. (2020). “Applications of Nanometals in Cutaneous Infections,” in *Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections*. Springer International Publishing (2020).p.71–92.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, F., and De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 6:12, 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents – M26-A*. Available online at: [https://clsi.org/media/1462/m26a\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf) [Accessed Dezember, 2019].
- Ninganagouda, S., Rathod, V., Singh, D., Hiremath, J., Singh, A. K., Mathew, J., et al. (2014). Growth Kinetics and Mechanistic Action of Reactive Oxygen Species Released by Silver Nanoparticles from *Aspergillus niger* on *Escherichia coli*. *Biomed Res. Int.* 2014:2.doi: 10.1155/2014/753419.
- Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., Shinwari, Z. K. (2019). Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 24, 929–941.doi:10.1007/s00775-019-01717-7.
- Nordmann, P., and Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 69:7, 521–528. doi:10.1093/cid/ciz824.
- Nowack, B., Krug, H. F., and Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environ. Sci. Technol.* 45:17, 1177–1183. doi:10.1021/es2017895.
- Nowotarska, S. W., Nowotarski, K., Grant, I. R., Elliott, C. T., Friedman, M., and Situ, C. (2017). Mechanisms of Antimicrobial Action of Cinnamon and Oregano Oils, Cinnamaldehyde, Carvacrol, 2,5-Dihydroxybenzaldehyde, and 2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). *Foods* 6:9, 1–16. doi:10.3390/foods6090072.
- O’Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally:final report and recommendations. Available online at: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf) [Accessed December, 2019].
- Otaguiri, E., Morguette, A., Biasi-Garbin, R., Morey, A., Lancheros, C., Kian, D., et al. (2016). Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18:2, 177–190. doi:10.2174/1389201017666161213151919.
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., et al. (2017).

- Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* 65:71. doi:10.1038/s41565-017-0013-y.
- Partridge, S. R.; Kwong, S. M.; Firth, N.; Jensenc, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews.*
- Patel, G., and Bonomo, R. A. (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front. Microbiol.* 4:48, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2013.00048.
- Pei, R., Zhou, F., Ji, B., and Xu, J. (2009). Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method. *J. Food Sci.* 74:7, M379–M383. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x.
- Peters, L., Olson, L., Khun, D. T. K., Linnros, S., Le, N. K., Hanberger, H., et al. (2019). Multiple antibiotic resistance as a risk factor for mortality and prolonged hospital stay : A cohort study among neonatal intensive care patients with hospital-acquired infections caused by Gram-negative bacteria in Vietnam. *PLoS One*, 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0215666.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, K., and Mathe, E. (2017). An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur. J. Med. Chem.* 143,922–935. doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.095.
- Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., et al. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int. J. Nanomedicine* 13, 3311–3327. doi: 10.2147/IJN.S165125.
- Quinteros, M. A., Cano, Viviana, C.A, Onnainty, R., Verónica, M., Theumer, M. G., Granero, G. E., et al. (2018). Biosynthesized silver nanoparticles: decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 104, 87-93. doi:10.1016/j.biocel.2018.09.006.
- Quiroga, P. R., Asensio, M., and Nepote, V. (2014). Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol , thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *J Sci FoodAgric.* doi:10.1002/jsfa.6744.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., and Rao, R. (2010). Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:12, 5062–5069. doi:10.1128/AAC.01050-10.
- Rattanachaikunsopon, P., and Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *J. Biosci. Bioeng.* 110:5, 614–619. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.06.010.
- Raveau, R., Fontaine, J., and Sahraoui, L.-H. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods* 9:3, 365. doi:10.3390/foods9030365.
- Raymond, B. (2019). Five rules for resistance management in the antibiotic apocalypse , a road map for integrated microbial management. *Evolutionary Applications* 12, 1079–1091. doi:10.1111/eva.12808.

- Rivas, L., McDonnell, M. J., Burgess, C. M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S., et al. (2010). Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 70–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.029.
- Rodríguez, F., Salinas, C., Fernández, S., Haim, S., Mollerach, M., Castro, H., et al. (2020). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones from Paraguayan children. *J. Infect. Dev. Ctries.* 14, 290–297. doi:10.3855/jidc.12108.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., et al. (2015). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56: 10. doi:10.1080/10408398.2013.800832.
- Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carrone, A., Vitali, M. E., et al. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Curr. Med. Chem.* 17, 3289–3295. doi:10.2174/092986710792231996.
- Ruppé, É., Woerther, P. L., and Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann. Intensive Care* 5:21. doi:10.1186/s13613-015-0061-0.
- Sakkas, H., and Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27:3, 429–438. doi:10.4014/jmb.1608.08024
- Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., et al. (2020). Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* 10:2, 292. doi: 10.3390/nano10020292.
- Santajit, S., and Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria in ESKAPE pathogens. *BioMed Res. Int.* doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219.
- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A., and Wang, M.-H. (2020). Biocompatible fungal chitosan encapsulated phyto-genic silver nanoparticles enhanced antidiabetic, antioxidant and antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* ;153, 63–71. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.291.
- Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A. C., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G., et al. (2016). Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.00760.
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Contreras, M. del M., et al. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phyther. Res.* 32:9, 1675–1687. doi:10.1002/ptr.6103.
- Shen, Q., Zhou, W., Li, H., Hu, L., and Mo, H. (2016). ROS Involves the Fungicidal Actions of Thymol against Spores of *Aspergillus flavus* via the Induction of Nitric Oxide. *PLoS One*, 11:5. doi:10.1371/journal.pone.0155647.
- Shi, T., Sun, X., and He, Q.-Y. (2016). Cytotoxicity of silver nanoparticles against bacteria and tumor cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* 19:6, 525–536. doi:10.2174/1389203718666161108092149.

- Sigler, K., Stadler, N., and Brozmanová, J., Stadler, N., Höfer, M. (1999). Oxidative stress in microorganisms-I Microbial vs. Higher Cells - Damage and Defenses in Relation to Cell Aging and Death. *Folia Microbiol.* · 44:6, 587–624. doi:10.1007/BF02825650.
- Sim, J. X. F., Khazandi, M., Chan, W. Y., and Trott, D. J., Deo, P. (2019). Antimicrobial activity of thyme oil , oregano oil , thymol and Carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Vet Dermatol*, 30:6. doi:10.1111/vde.12794.
- Sim, W., Barnard, R. T., Blaskovich, M. A. T., and Ziora, Z. M. (2018). Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade. *Antibiotics* 7:4, 93. doi:10.3390/antibiotics7040093.
- Simbine, E. O., Rodrigues, C., Lapa-guimarães, J., Kamimura, E. S., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F. (2019). Application of silver nanoparticles in food packages: a review. *Food Sci. Technol.* 39:4, 793–802. doi: 10.1590/fst.36318.
- Singh, P., Singh, H., Kim, Y. J., Mathiyalagan, R., Wang, C., and Yang, D. C. (2016). Extracellular Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their Biological Applications. *Enzyme Microb. Technol.* 86,75–83doi:10.1016/j.enzmictec.2016.02.005.
- Souza, E. L., Oliveira, C. E. V, Stamford, T. L. M., Conceição, M. L., and Gomes Neto, N. J. (2013). Influence of Carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 29–35. doi:10.1590/S1517-83822013005000001.
- Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., et al. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Arch. Biol. Sci.* 65, 639–644. doi:10.2298/ABS1302639S.
- Suzuki, É. Y., Soldati, P. P., Chaves, M. das G. A. M., and Nádia, R. (2015). Essential Oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: An Alternative Against Microorganisms Responsible for Bad Perspiration Odor. *J. Young Pharm.* 7, 12–20. doi:10.5530/jyp.2015.1.4.
- Suzuki, S., Horinouchi, T., and Furusawa, C. (2017). Acceleration and suppression of resistance development by antibiotic combinations. *BMC Genomics* 18:328, 1–10. doi:10.1186/s12864-017-3718-2.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., and Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action : An Updated Review. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2016. doi:10.1155/2016/3012462.
- Tahmasebi, P., Meysam, S., Froushani, A., and Ahangaran, N. A. (2019). Thymol has beneficial effects on the experimental model of ulcerative colitis. *Avicenna J. Phytomedicine* 9, 538–550. doi:10.22038/AJP.2019.13383.
- Thombre, R. S., Shinde, V., Thaiparambil, E., Zende, S., and Mehta, S. (2016). Antimicrobial Activity and Mechanism of Inhibition of Silver Nanoparticles against Extreme Halophilic Archaea. *Front. Microbiol.* 7, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2016.01424.
- Traub, W. H., and Kleber, I. (1975). In Vitro Additive Effect of Polymixin B and Rifampin against *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:6, 874–876.

- Tsikakos, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* 524, 13–30. doi:10.1016/j.ab.2016.10.021.
- Türkez, H., and Aydın, E. (2013). Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of Carvacrol in human blood cells. *Toxicol. Ind. Health.* 32:4. doi:10.1177/0748233713506771.
- Turlej, A., Hryniewicz, W., and Empel, J. (2011). Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec ) Classification and Typing Methods: an Overview. *Polish J. Microbiol.* 60:2, 95–103.
- Tyers, M., and Wright, G. D. (2019). Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 141–155. doi:10.1038/s41579-018-0141-x.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., and Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568. doi:10.1128/AEM.68.4.1561.
- Urzedo, A. L., Gonçalves, M. C., Nascimento, M. H., Lombello, C. B., Nakazato, G., and Seabra, A. B. (2020). Cytotoxicity and antibacterial activity of alginate hydrogel containing nitric oxide donor and silver nanoparticles for topical applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6: 4, 2117–2134 doi:10.1021/acsbmaterials.9b01685.
- Vasilchenko, A. S., and Rogozhin, E. A. (2019). Sub-Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides. *Front. Microbiol.* 10, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2019.01160.
- Vazquez-Muñoz ID, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, . G. J., Soria-Castro, E., Juárez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A. L., et al. (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One*, 14:11, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0224904.
- Viens, A. M. (2015). Is Antimicrobial Resistance a Slowly Emerging Disaster? *Public Health Ethics* 8, 255–265. doi:10.1093/phe/phv015.
- Vivas, M. C., Caicedo, L. D., and Castillo, J. E. (2019). Occurrence of  $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacterial Isolates in Water Sources in Cali City, Colombia. *Int. J. Microbiol.* 2019. doi: 10.1155/2019/1375060.
- Wijesundara, N. M., and Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microb. Pathog.* 117:118–127 doi:10.1016/j.micpath.2018.02.026.
- Woolley, J. F., Stanicka, J., and Cotter, T. G. (2013). Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 38:11, 556–65. doi: 10.1016/j.tibs.2013.08.009.
- World Health Organization, WHO (2020). Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> [Accessed January, 2020].

- Xiao, S., Cui, P., Shi, W., and Zhang, Y. (2020). Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement. Med. Ther.*, 20:99.doi: 10.1186/s12906-020-02898-4.
- Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H. L., Colvin, V. L., and Alvarez, P. J. J. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Lett.* 12:8, 4271–4275. doi:dx.doi.org/10.1021/nl301934w.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B., Pei, R., and Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of Carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 174–179. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x.
- Yadav, M. K., Park, S. W., Chae, S. W., Song, J. J., and Kim, H. C. (2013). Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Microbiol.* 121, 1198–1206. doi:10.1111/apm.12067.
- Yan, X., He, B., Liu, L., Qu, G., Shi, J., Hu, L., et al. (2018). Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach. *Metallomics* 10, 557–564. doi:10.1039/C7MT00328E.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., and Lim, S. H. E. (2014). Essential Oils , A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol. J.* 8, 6–14.doi:10.2174/1874285801408010006. eCollection 20.
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B. P., Au, M., Wiesner, M., et al. (2011). More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ. Sci. Technol.* 45:6, 2360–2367.doi: 10.1021/es103995x.
- Yuan, W., Seng, Z. J., Kohli, G. S., Yang, L., and Yuk, H.-G. (2018). Stress Resistance Development and Genome-Wide Transcriptional Response of *Escherichia coli* O157:H7 Adapted to Sublethal Thymol, Carvacrol, and trans-Cinnamaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–14.doi: 10.1128/AEM.01616-18.
- Zhanel, G. G., Hoban, D. J., and Harding, Godfrey, K. M. (1992). Subinhibitory antimicrobial concentrations: A review of in vitro and in vivo data. *Can J Infect Dis.* 3:4, 193–201.doi: 10.1155/1992/793607.

## 7 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 8 Authors Contributions

SS, conception and drafting of the study, design and planning of experiments, carrying out experiments, data acquisition, analysis and interpretation, writing of this article.

BC, carrying out MIC and time-kill assays, their data acquisition, analysis and interpretation, critical review of the article.

EK, design and planning of stress oxidative, ATP and transmission electron microscopy assays.

LA, assistance and guidance in bioAgNP biosynthesis, mainly with fungal growth conditions.

AG, assistance and guidance in electron microscopy assays.

ND, conception of bioAgNP biosynthesis methodology, nanoparticles characterization.

GN, assistance and guidance in bioAgNP biosynthesis, data analysis and interpretation, critical review of the article.

RK, conception and advisor of this study, encouragement to SS to investigate the mechanism of action of antimicrobials, data analysis and interpretation, critical review of the article, final approval of the version to be published.

## **9 Acknowledgments**

This study was supported by Postgraduate Program in Microbiology of *Universidade Estadual de Londrina* and in part by the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (313305/2019-6) and (315435/2018-6). Sara Scandorieiro was funded by a PhD scholarship from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) – Finance Code 001. This study was carried out with equipments from several laboratories. The authors thank Laboratory of Electron Microscopy and Microanalysis, Laboratory of Animal Ecophysiology, Laboratory of Molecular Pathology, Laboratory of Applied Immunology, Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, Laboratory of Microbial Ecology (*Universidade Estadual de Londrina*), Laboratory of Natural Sciences and Health (*Instituto Federal do Paraná*, Londrina), and Laboratory of Transmission Electron Microscopy (*Universidade Estadual de Maringá*).

## TABLES

Table 1 – Antimicrobial susceptibility of clinical isolates.

Enterobacteriaceae	AMP	AMC	CFZ	FEP	CFO	CAZ	CAZ CLA	ATM	ETP	GEN	STR	TET	CIP	NOR	NAL	CLO	FO	NIT
<i>E. coli</i> KPC 126 <sup>(a)</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>K. pneumoniae</i> KPC 5795 <sup>(b)</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R
<i>P. aeruginosa</i>	CAZ	CAZ CLA	FEP	ATM	IPM	PB	GEN	CIP	NOR									
3400 <sup>(c)</sup>	S	S	R	R	R	S	R	R	R									
<i>A. baumannii</i>	AMS	CAZ	CAZ CLA	FEP	CTX CLA	IPM	GEN	TET	CIP									
CR 01 <sup>(d)</sup>	R	R	S	R	R	R	S	R	R									

AMC, Amoxicillin-clavulanate; AMP, Ampicillin; AMS, Ampicillin-sulbactam; ATM, Aztreonam; CAZ CLA, Ceftazidime-clavulanate; CAZ, Ceftazidime; CFO, Cefoxitin; CFZ, Cefazolin; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Chloramphenicol; CTX CLA, Cefotaxime-clavulanate; ETP, Ertapenem; FEP, Cefepime; FO, Fosfomicin; GEN, Gentamicin; IPM, Imipenem; NAL, Nalidixic acid; NIT, Nitrofurantoin; NOR, Norfloxacin; PB, Polymyxin B; STR, Streptomycin; TET, Tetracycline.

KPC, *K. pneumoniae* Carbapenemase; CR, Carbapenem-resistant.

126, 5795, 3400, and 01 are strain numbers from Laboratory of Basic and Applied Bacteriology - Universidade Estadual de Londrina.

R, Resistant; S, Susceptible.

<sup>(a)</sup> isolate from urinary tract infection; <sup>(b)</sup> isolate from surgical wound swab; <sup>(c)</sup> isolate from tracheal secretion; <sup>(d)</sup> isolate from inguinal-rectal swab.

**Table 2 – Mean of minimal inhibitory and bactericidal concentrations of oregano derived antimicrobials and silver-based compounds individually.**

Bacterial strains	OEO (mg/mL)		CAR (mg/mL)		Thy (mg/mL)		bioAgNP (µM)		AgNO <sub>3</sub> (µM)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.3	0.3	0.31	0.31	0.25	0.25	92.5	92.5	250	250
<i>E. coli</i> KPC 126	0.59	0.59	0.61	0.61	0.5	0.5	92.5	92.5	125	250
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.15	0.3	0.15	0.31	0.25	0.25	185	185	125	125
<i>K. pneumoniae</i> KPC 5795	0.59	0.59	0.61	0.61	0.5	0.5	185	185	125	125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.59	0.59	0.61	0.61	0.5	0.5	46.25	92.5	125	125
<i>P. aeruginosa</i> CR 3400	1.19	1.19	0.61	0.61	0.5	0.5	46.25	92.5	31.25	62.5
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0.59	0.59	0.31	0.31	0.5	0.5	46.25	92.5	31.25	62.5
<i>A. baumannii</i> CR 01	1.19	1.19	0.61	1.22	0.25	0.5	46.25	92.5	62.5	62.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.38	2.38	1.22	1.22	0.5	1	92.5	92.5	125	125
MRSA N315	1.19	1.19	0.61	1.22	1	1	92.5	185	62.5	125

MIC, Minimal inhibitory concentration; MBC, Minimal bactericidal concentration.

OEO, Oregano essential oil; CAR, Carvacrol; Thy, Thymol; bioAgNP, Biogenically synthesized silver nanoparticles.

ATCC, American Type Culture Collection; KPC, *K. pneumoniae* carbapenemase; CR, Carbapenem-resistant.

MRSA, Methicillin resistant *S. aureus*.

126, 5795, 3400, and 01 are strains numbers from Laboratory of Basic and Applied Bacteriology-Universidade Estadual de Londrina.

**Table 3 – Combinatory effect of oregano essential oil (OEO) plus biological silver nanoparticles (bioAgNP) and both minimal inhibitory concentrations in combination and individually.**

Bacterial strain	OEO (mg/mL)		bioAgNP ( $\mu$ M)		FICI	Interaction
	MIC individually	MIC combination	MIC individually	MIC Combination		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.3	0.15	92.5	23.12	0.75	ADDITIVE
<i>E. coli</i> KPC 126	0.59	0.07	92.5	46.25	0.62	ADDITIVE
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.15	0.04	185	92.5	0.75 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.15	0.07	185	46.25	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>K. pneumoniae</i> KPC 5795	0.59	0.15	185	92.5	0.75 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.59	0.3	185	46.25	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.59	0.59	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>P. aeruginosa</i> CR 3400	1.19	1.19	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0.59	0.59	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>A. baumannii</i> CR 01	1.19	1.19	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.38	0.3	92.5	46.25	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	2.38	1.19	92.5	23.13	0.75 <sup>(b)</sup>	
MRSA N315	1.19	1.19	92.5	92.5	2	INDIFFERENT
<b>MIC reductions on average (%)</b>		84.94 <sup>(a)</sup> *		64.29 *		
		57.04 *		71.43 <sup>(b)</sup> *		

<sup>(a)</sup> FICI for maximum reduction of OEO MIC; <sup>(b)</sup> FICI for maximum reduction of bioAgNP MIC; MIC, Minimal inhibitory concentration. \* It indicates that combination reduced significantly MIC value of compounds compared with individual treatments.

FICI, Fractional inhibitory concentration index.

FIC index was interpreted as follows:  $\leq 0.5$  (synergy);  $> 0.5$  to  $\leq 1$  (addition);  $> 1$  to  $\leq 2$  (indifference);  $> 2$  (antagonism).

ATCC, American Type Culture Collection; KPC, *K. pneumoniae* carbapenemase; CR, Carbapenem-resistant; MRSA, Methicillin resistant *S. aureus*.

126, 5795, 3400, and 01 are strains numbers from Laboratory of Basic and Applied Bacteriology-Universidade Estadual de Londrina.

**Table 4 – Combinatory effect of carvacrol (CAR) plus biological silver nanoparticles (bioAgNP) and both minimal inhibitory concentrations in combination and individually.**

Bacterial strain	CAR (mg/mL)		bioAgNP (µM)		FICI	Interaction
	MIC Individually	MIC combination	MIC individually	MIC Combination		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.31	0.15	92.5	23.12	0.75	ADDITIVE
<i>E. coli</i> KPC 126	0.61	0.08	92.5	46.25	0.62	ADDITIVE
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.15	0.08	185	92.5	0.75	ADDITIVE
<i>K. pneumoniae</i> KPC 5795	0.61	0.31	185	46.25	0.75	ADDITIVE
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.61	0.61	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>P. aeruginosa</i> CR 3400	0.61	0.61	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0.31	0.31	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>A. baumannii</i> CR 01	0.61	0.31	46.25	5.78	0.62	ADDITIVE
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.22	0.15	92.5	46.25	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	1.22	0.61	92.5	11.56	0.62 <sup>(b)</sup>	
MRSA N315	0.61	0.61	92.5	92.5	2	INDIFFERENT
<b>MIC reductions on average</b>	72.17 <sup>(a)</sup> *		62.51 *			
<b>(%)</b>	57.68 *		67.51 <sup>(b)</sup> *			

<sup>(a)</sup> FICI for maximum reduction of CAR MIC; <sup>(b)</sup> FICI for maximum reduction of bioAgNP MIC; MIC, Minimal inhibitory concentration. \* It indicates that combination reduced significantly MIC value of compounds compared with individual treatments.

FICI, Fractional inhibitory concentration index.

FIC index was interpreted as follows:  $\leq 0.5$  (synergy);  $> 0.5$  to  $\leq 1$  (addition);  $> 1$  to  $\leq 2$  (indifference);  $> 2$  (antagonism).

ATCC, American Type Culture Collection; KPC, *K. pneumoniae* carbapenemase; CR, Carbapenem-resistant; MRSA, Methicillin resistant *S. aureus*.

126, 5795, 3400, and 01 are strains numbers from Laboratory of Basic and Applied Bacteriology-Universidade Estadual de Londrina.

**Table 5 – Combinatory effect of thymol (Thy) plus biological silver nanoparticles (bioAgNP) and both minimal inhibitory concentrations in combination and individually.**

Bacterial strain	Thy (mg/mL)		bioAgNP (µM)		FICI	Interaction
	MIC individually	MIC combination	MIC individually	MIC combination		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.25	0.06	92.5	46.25	0.75 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.25	0.12	92.5	11.56	0.62 <sup>(b)</sup>	
<i>E. coli</i> KPC 126	0.5	0.12	92.5	46.25	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.5	0.25	92.5	11.56	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.25	0.03	185	92.5	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.25	0.12	185	46.25	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>K. pneumoniae</i> KPC 5795	0.5	0.25	185	23.12	0.62	ADDITIVE
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.5	0.25	46.25	5.78	0.62	ADDITIVE
<i>P. aeruginosa</i> CR 3400	0.5	0.25	46.25	23.12	1	ADDITIVE
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0.5	0.25	46.25	5.78	0.62	ADDITIVE
<i>A. baumannii</i> CR 01	0.25	0.25	46.25	46.25	2	INDIFFERENT
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5	0.06	92.5	46.25	0.62	ADDITIVE
MRSA N315	1	0.5	92.5	23.12	0.75	ADDITIVE
<b>MIC reductions on average</b>	60.67 <sup>(a)</sup> *		64.48 *			
<b>(%)</b>	54.44 *		77.64 <sup>(b)</sup> *			

<sup>(a)</sup> FICI for maximum reduction of Thy MIC; <sup>(b)</sup> FICI for maximum reduction of bioAgNP MIC; MIC, Minimal inhibitory concentration. \* It indicates that combination reduced significantly MIC value of compounds compared with individual treatments.

FICI, Fractional inhibitory concentration index.

FIC index was interpreted as follows:  $\leq 0.5$  (synergy);  $> 0.5$  to  $\leq 1$  (addition);  $> 1$  to  $\leq 2$  (indifference);  $> 2$  (antagonism).

ATCC, American Type Culture Collection; KPC, *K. pneumoniae* carbapenemase; CR, Carbapenem-resistant; MRSA, Methicillin resistant *S. aureus*.

126, 5795, 3400, and 01 are strains numbers from Laboratory of Basic and Applied Bacteriology-Universidade Estadual de Londrina.

**Table 6 – Combinatory effect of carvacrol (CAR) plus thymol (Thy) and both minimal inhibitory concentrations in combination and individually.**

Bacterial strain	CAR (mg/mL)		Thy (µM)		FICI	Interaction
	Individually	MIC combination	Individually	MIC combination		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.31	0.08	0.25	0.12	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.31	0.15	0.25	0.03	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>E. coli</i> KPC 126	0.61	0.08	0.5	0.25	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.61	0.31	0.5	0.12	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.15	0.02	0.25	0.12	0.62	ADDITIVE
<i>K. pneumoniae</i> KPC 5795	0.61	0.31	0.5	0.06	0.62	ADDITIVE
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.61	0.08	0.5	0.25	0.62	ADDITIVE
<i>P. aeruginosa</i> CR 3400	0.61	0.61	0.5	0.5	2	INDIFFERENT
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0.31	0.04	0.5	0.25	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.31	0.15	0.5	0.12	0.75 <sup>(b)</sup>	
<i>A. baumannii</i> CR 01	0.61	0.31	0.25	0.03	0.62	ADDITIVE
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.22	0.15	0.5	0.25	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	1.22	0.61	0.5	0.06	0.62 <sup>(b)</sup>	
	1.22	0.31	0.5	0.12	0.5	
MRSA N315	0.61	0.08	1	0.12	0.62 <sup>(a)</sup>	ADDITIVE
	0.61	0.31	1	0.25	0.75 <sup>(b)</sup>	
<b>MIC reductions on average (%)</b>	78.18 <sup>(a)</sup> *		56.94 *			
	57.58 *		74.75 <sup>(b)</sup> *			

<sup>(a)</sup> FICI for maximum reduction of CAR MIC; <sup>(b)</sup> FICI for maximum reduction of Thy MIC; MIC, Minimal inhibitory concentration; FICI for synergism does not indicate maximum reduction of MIC for neither of compounds; FICI, Fractional inhibitory concentration index. \* It indicates that combination reduced significantly MIC value of compounds compared with individual treatments.

FIC index was interpreted as follows:  $\leq 0.5$  (synergy);  $> 0.5$  to  $\leq 1$  (addition);  $> 1$  to  $\leq 2$  (indifference);  $> 2$  (antagonism).

ATCC, American Type Culture Collection; KPC, *K. pneumoniae* carbapenemase; CR, Carbapenem-resistant; MRSA, Methicillin resistant *S. aureus*.

**Table 7 – Hemolytic activity of different concentrations of oregano derived antimicrobials and bioAgNP in combination.**

Combinations	Tested concentrations		Hemolysis (%)
	OEO (mg/mL)	bioAgNP ( $\mu$ M)	
<b>OEO + bioAgNP</b>	1.19	92.50	12.55 $\pm$ 03.19 <sup>NC</sup>
	0.59	46.25	11.36 $\pm$ 04.19 <sup>NC</sup>
	0.30	23.13	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
	0.15	11.56	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
<b>CAR + bioAgNP</b>	0.61	46.25	23.41 $\pm$ 02.66 <sup>NC</sup>
	0.31	23.13	05.07 $\pm$ 02.33 <sup>NC</sup>
	0.15	11.56	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
	0.08	5.78	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
<b>Thy + bioAgNP</b>	0.5	92.50	39.91 $\pm$ 04.57 <sup>NC</sup>
	0.25	46.25	16.54 $\pm$ 04.98 <sup>NC</sup>
	0.12	23.13	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
	0.06	11.56	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
<b>CAR + Thy</b>	0.61	0.25	31.16 $\pm$ 6.22 <sup>NC</sup>
	0.31	0.12	10.98 $\pm$ 0.50 <sup>NC</sup>
	0.15	0.06	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>
	0.08	0.03	00.00 $\pm$ 00.00 <sup>NC</sup>

*OEO, Oregano essential oil; CAR, Carvacrol; Thy, Thymol; bioAgNP, Biogenically synthesized silver nanoparticle. NC, non-cytotoxic;  $\pm$ , standard deviation.*

## FIGURES CAPTIONS

**Figure 1. Characterization of bioAgNP with regard to their plasmonic band and morphology.** (A) UV-Vis spectra of bioAgNP and fungal-free solution (negative control) shows that plasmon resonance of silver nanoparticles is centered at 420 nm. (B) SEM micrograph of bioAgNP shows spherical nanoparticles.

**Figure 2. Time-kill curves of Gram-negative and Gram-positive strains exposed to oregano derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination.** Bacteria at  $5 \times 10^5$  CFU/mL were exposed to five different treatments; OEO, CAR, Thy, bioAgNP alone at MBC, and combination containing Thy plus bioAgNP at additive MIC. Control indicates bacterial growth with no antimicrobial. (A) *E. coli* ATCC 25922 exposed to OEO at 0.3 mg/mL, CAR at 0.3 mg/mL, Thy at 0.25 mg/mL, bioAgNP at 92.5  $\mu$ M, and two combinations of Thy plus bioAgNP; one (a) at 0.12 mg/mL and 46.25  $\mu$ M, respectively, the other one (b) at 0.06 mg/mL and 46.25  $\mu$ M, respectively. (B) KPC-producing *K. pneumoniae* exposed to OEO at 0.59 mg/mL, CAR at 0.61 mg/mL, Thy at 0.5 mg/mL, bioAgNP at 185  $\mu$ M, and combination of Thy plus bioAgNP at 0.25 mg/mL and 92.5  $\mu$ M, respectively. (C) Carbapenem-resistant *A. baumannii* exposed to OEO at 1.19 mg/mL, CAR at 1.22 mg/mL, Thy at 0.25 mg/mL, and bioAgNP at 92.5  $\mu$ M. (D) MRSA N315 exposed to OEO at 1.19 mg/mL, CAR at 1.22 mg/mL, Thy at 1 mg/mL, and bioAgNP at 185  $\mu$ M. Values of log<sub>10</sub> CFU/mL are the mean  $\pm$  standard deviation.

**Figure 3. Measurement of oxidative stress in *E. coli* ATCC 25922 exposed to antimicrobials (oregano derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination) by quantification of intracellular ROS generation and lipid peroxidation levels.** Bacteria at  $10^9$  CFU/mL were exposed to five treatments at subinhibitory concentrations; OEO alone (0.15 mg/mL), CAR alone (0.15 mg/mL), Thy alone (0.12 mg/mL), bioAgNP alone (92.5  $\mu$ M), and Thy plus bioAgNP (0.03 mg/mL + 46.25  $\mu$ M, respectively). Controls indicate bacterial ROS and MDA generation by cells with no antimicrobial. (A) ROS production levels expressed as relative light units (RLU). ROS was measured every 15 min during 2 h of treatment. Values of RLU are the mean  $\pm$  standard deviation. (B) Lipid peroxidation levels measured by malondialdehyde (MDA) production after 1, 2 and 3 h of treatment. Values of MDA (nmol/well) are the mean  $\pm$  standard deviation. a-d Indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in ROS and MDA production among treatments and control at the same time; different letters indicate difference, and same letters indicate absence of difference.

**Figure 4. Extracellular ATP concentrations of *E. coli* ATCC 25922 exposed to oregano derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination.** Bacteria at  $10^9$  CFU/mL were exposed for 45 min to five different treatments at subinhibitory concentrations; OEO alone (0.15 mg/mL), CAR alone (0.15 mg/mL), Thy alone (0.12 mg/mL), bioAgNP alone (92.5  $\mu$ M), and Thy plus bioAgNP (0.03 mg/mL + 46.25  $\mu$ M, respectively). Control indicates ATP concentration of bacterial cells with no antimicrobial. ATP levels were measured at four-time point of treatment. (A) 0h-time point. (B) After 15 min of treatment. (C) After 30 min of treatment. (D) After 45 min of treatment. Values of ATP (nM) are the mean  $\pm$  standard deviation. a-b Indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in extracellular ATP amount among treatments and control at same time; different letters indicate difference, and same letters indicate absence of difference.

**Figure 5. Extracellular protein, DNA and RNA concentrations of *E. coli* ATCC 25922 exposed to oregano derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination.** Bacteria at  $10^9$  CFU/mL were exposed for 60 min to five different treatments at subinhibitory

concentrations; OEO alone (0.15 mg/mL), CAR alone (0.15 mg/mL), Thy alone (0.12 mg/mL), bioAgNP alone (92.5  $\mu$ M), and Thy plus bioAgNP (0.03 mg/mL + 46.25  $\mu$ M, respectively). Control indicates extracellular biomolecule concentration of bacterial cells with no antimicrobial. Amounts of biomolecules were measured after 30 min and 1 h of treatment. **(A)** Extracellular total proteins (mg/mL). **(B)** Extracellular single-stranded DNA (ssDNA; ng/ $\mu$ L). **(C)** Extracellular double-stranded DNA (dsDNA; ng/ $\mu$ L). **(D)** Extracellular RNA (ng/ $\mu$ L). a-d Indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in concentration of extracellular protein, DNA and RNA among treatments and control at same time; different letters indicate difference, and same letters indicate absence of difference.

**Figure 6. Scanning electron micrographs of antibacterial effect of oregano derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination against *E. coli* ATCC 25922.** Bacteria at  $10^9$  CFU/mL were exposed for 30 min to five different treatments at subinhibitory concentrations. **(A)** Untreated control. **(B)** OEO-treated cells (0.15 mg/mL). **(C)** CAR-treated cells (0.15 mg/mL). **(D)** Thy-treated cells (0.12 mg/mL). **(E)** BioAgNP-treated cells (92.5  $\mu$ M). **(F)** Bacterial cells treated with combination of Thy plus bioAgNP at 0.03 mg/mL and 46.25  $\mu$ M, respectively. Micrographs **(A-F)** show cell density, size and shape of *E. coli*, and morphological changes on cell surface (15,000 x). Inset images show in detail the morphological alterations of treated cells and typical cell of untreated control (30,000 x). **Arrows:** morphological changes (surface protrusions) and cellular debris. **Arrowheads:** size-changed cells.

**Figure 7. Transmission electron micrographs of antibacterial effect of bioAgNP individually and in combination against *E. coli* ATCC 25922.** Bacteria at  $10^9$  CFU/mL were exposed for 1 h to bioAgNP at subinhibitory concentration (92.5  $\mu$ M). **(A)** Untreated control showing no changes in cell morphology and regular electron density. **(B)** BioAgNP-treated cell with morphological changes. **(C and D)** BioAgNP-cells with disruption of external ultrastructures and reduced electron density. **Arrow:** damaged cellular wall and cytoplasmic membrane. **Arrowheads:** leakage of cytoplasmic contents.

**Figure 8. Hemolytic activity of different concentrations of oregano derived antimicrobials and silver-based compounds.** Human erythrocytes were exposed to six different treatments individually. **(A)** OEO ranging from 0.07 to 9.5 mg/mL. **(B)** CAR ranging from 0.08 to 9.76 mg/mL. **(C)** Thy ranging from 0.01 to 1 mg/mL. **(D)** BioAgNP ranging from 5.78 to 740  $\mu$ M. **(E)** AgNO<sub>3</sub> ranging from 15.62 to 2000  $\mu$ M. **(F)** *F. oxysporum*-free solution (ranging from 0.15 to 20%, v/v) used in bioAgNP synthesis. Maximum tested concentrations of fungal-free solution and bioAgNP have equivalent volumes. Values of hemolysis percentage are the mean  $\pm$  standard deviation.

Figure 1

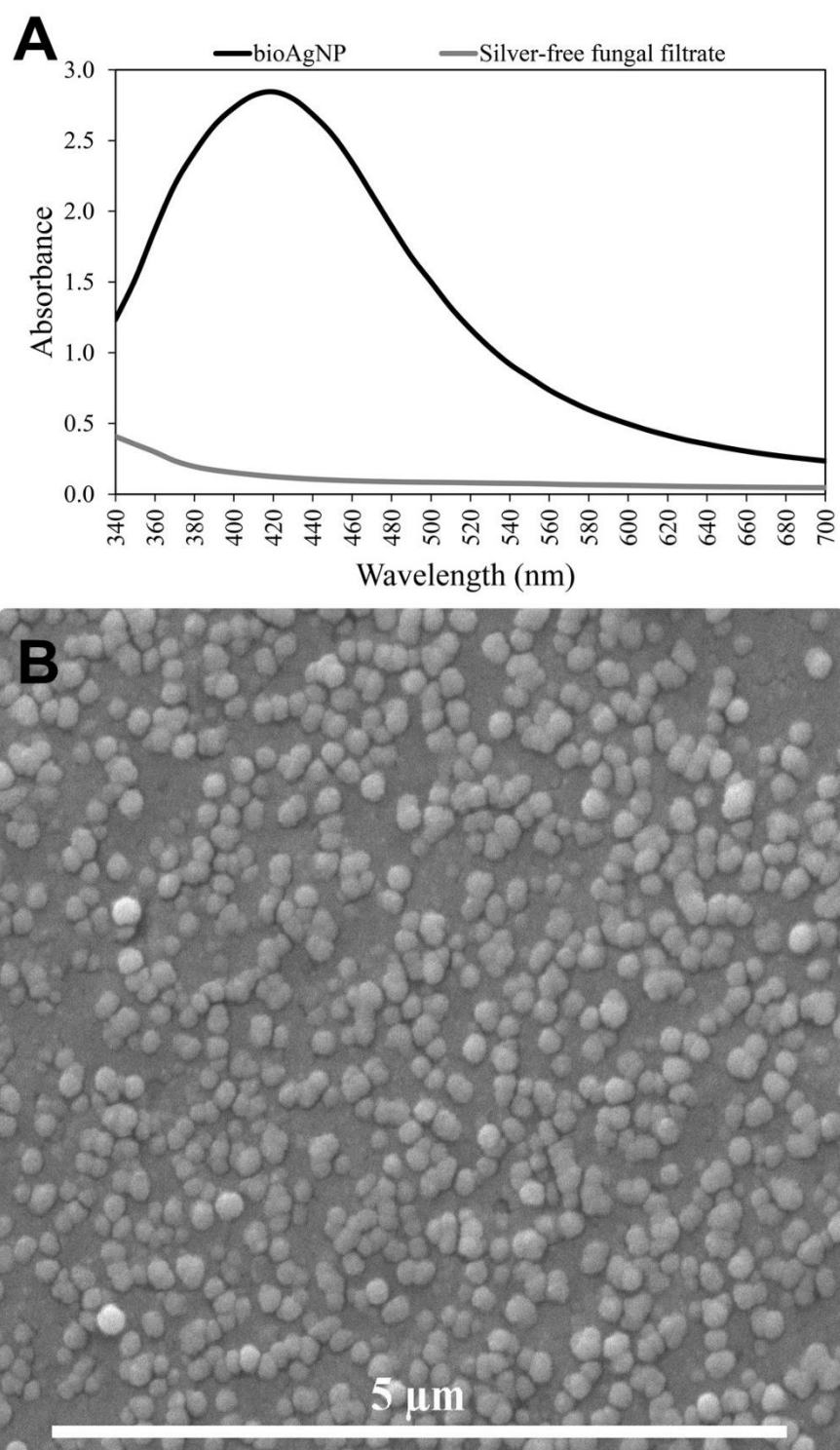


Figure 2

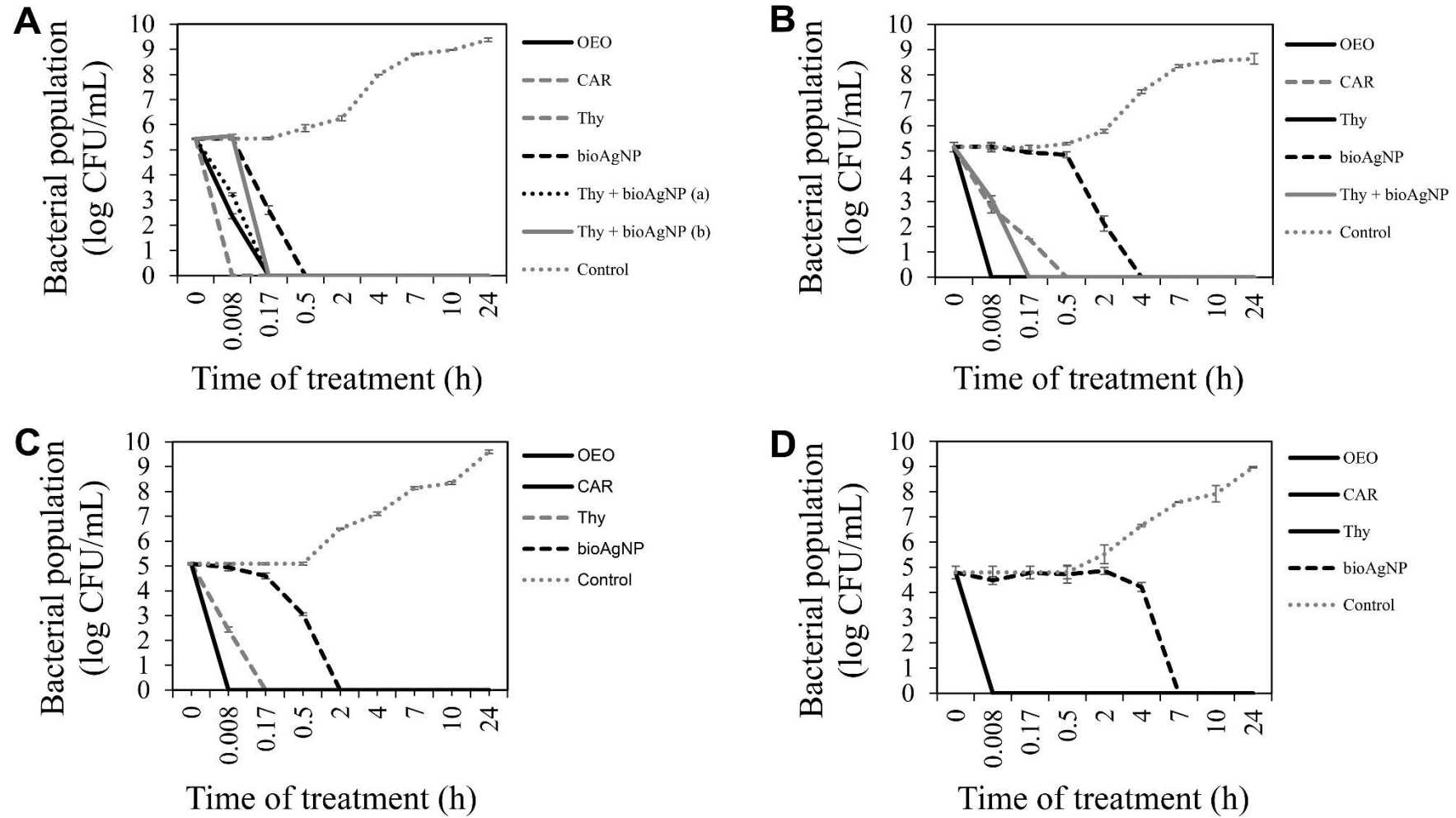


Figure 3

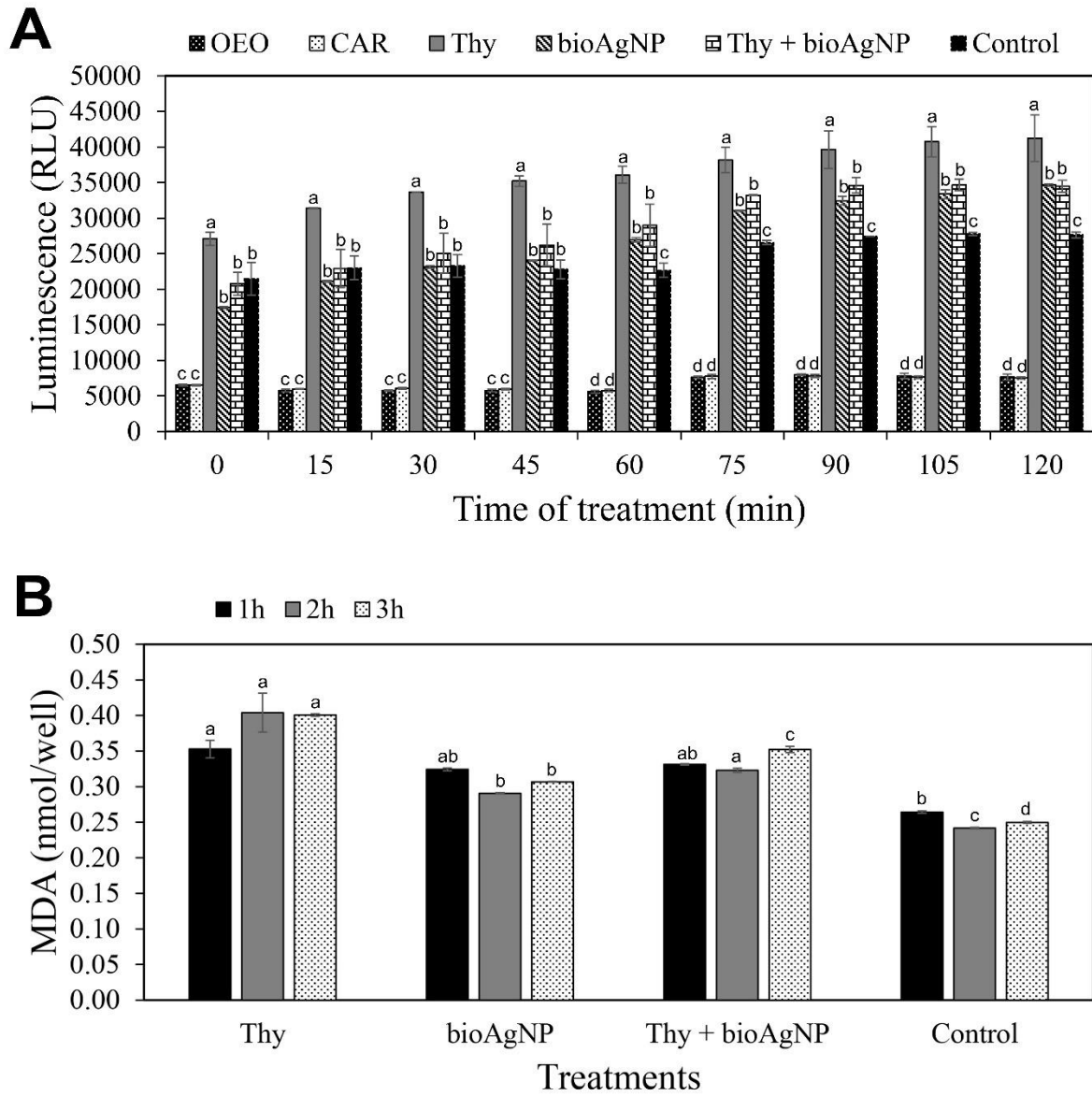


Figure 4

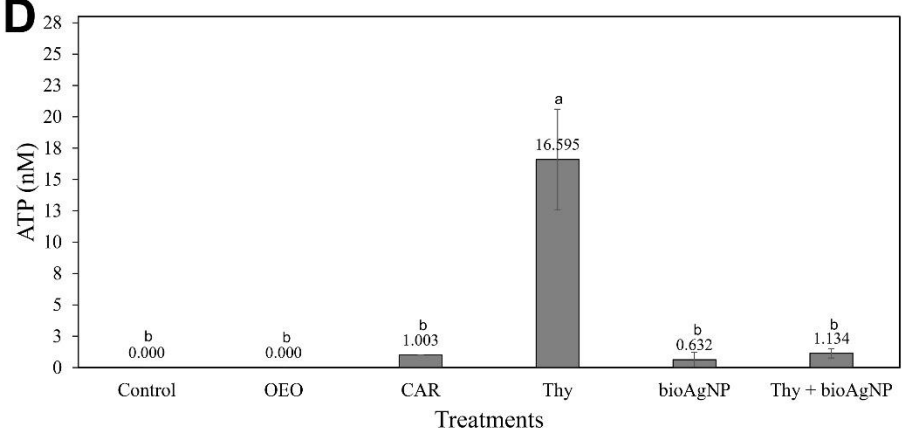
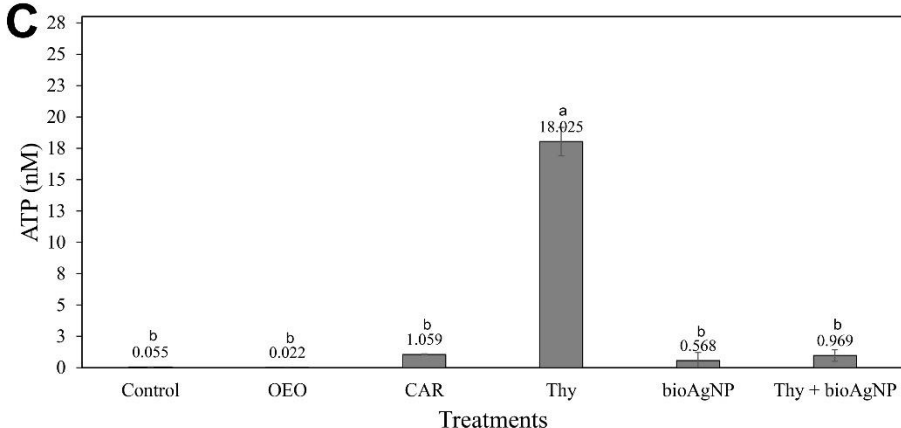
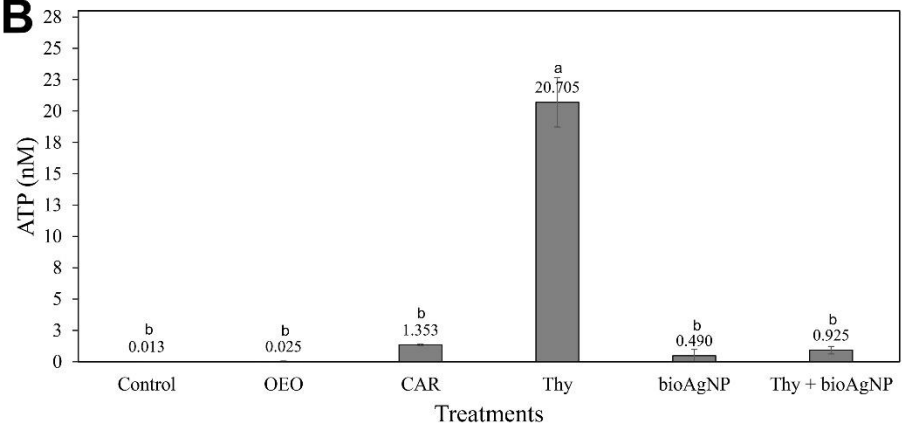
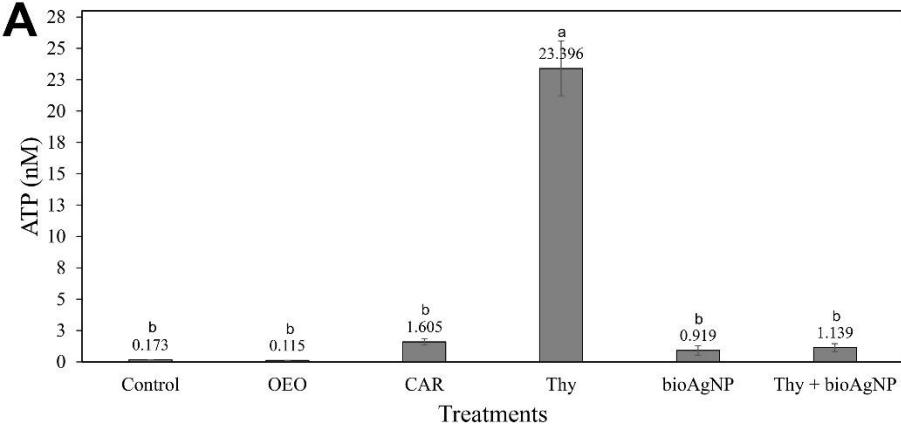


Figure 5

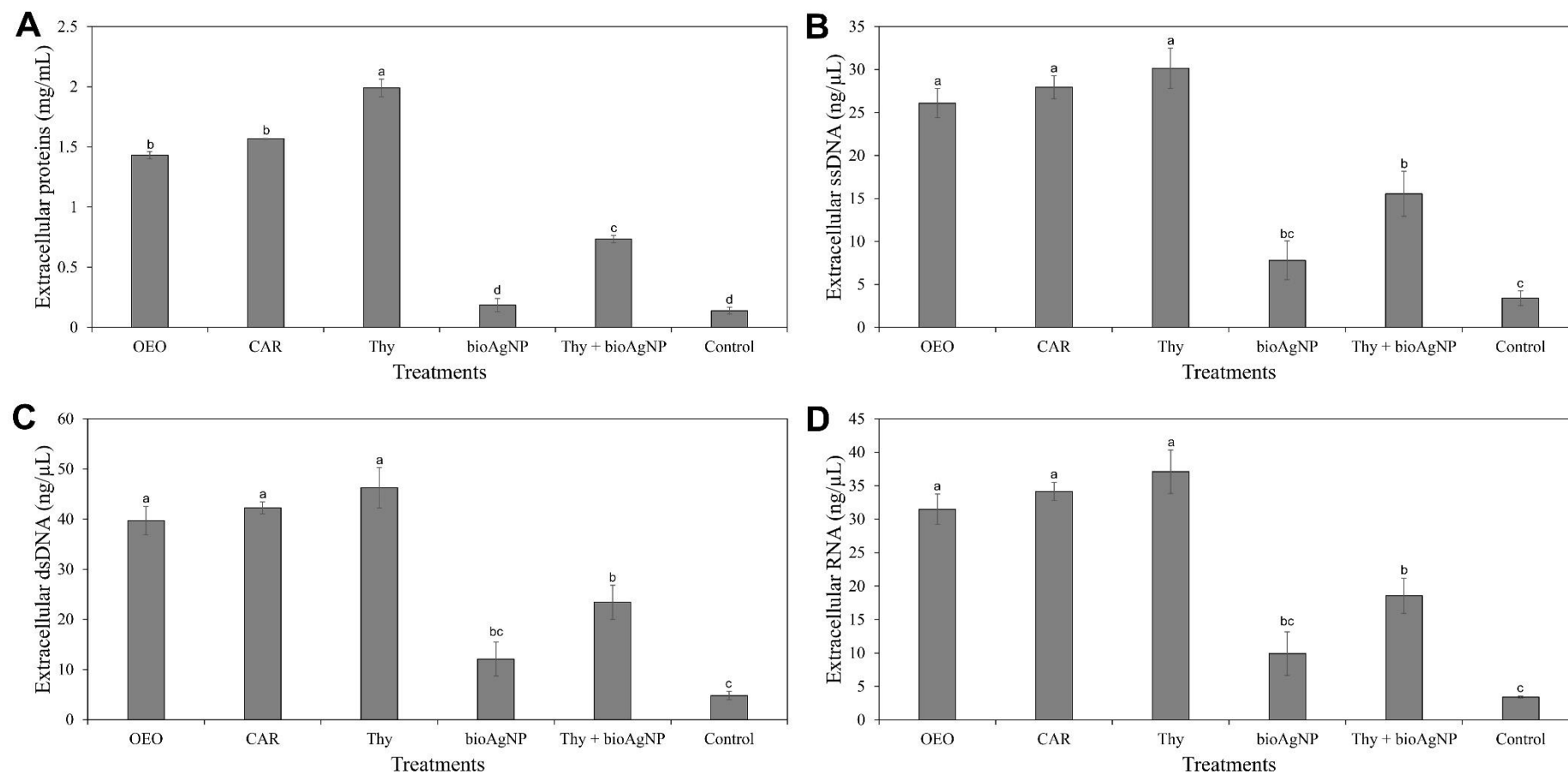


Figure 6

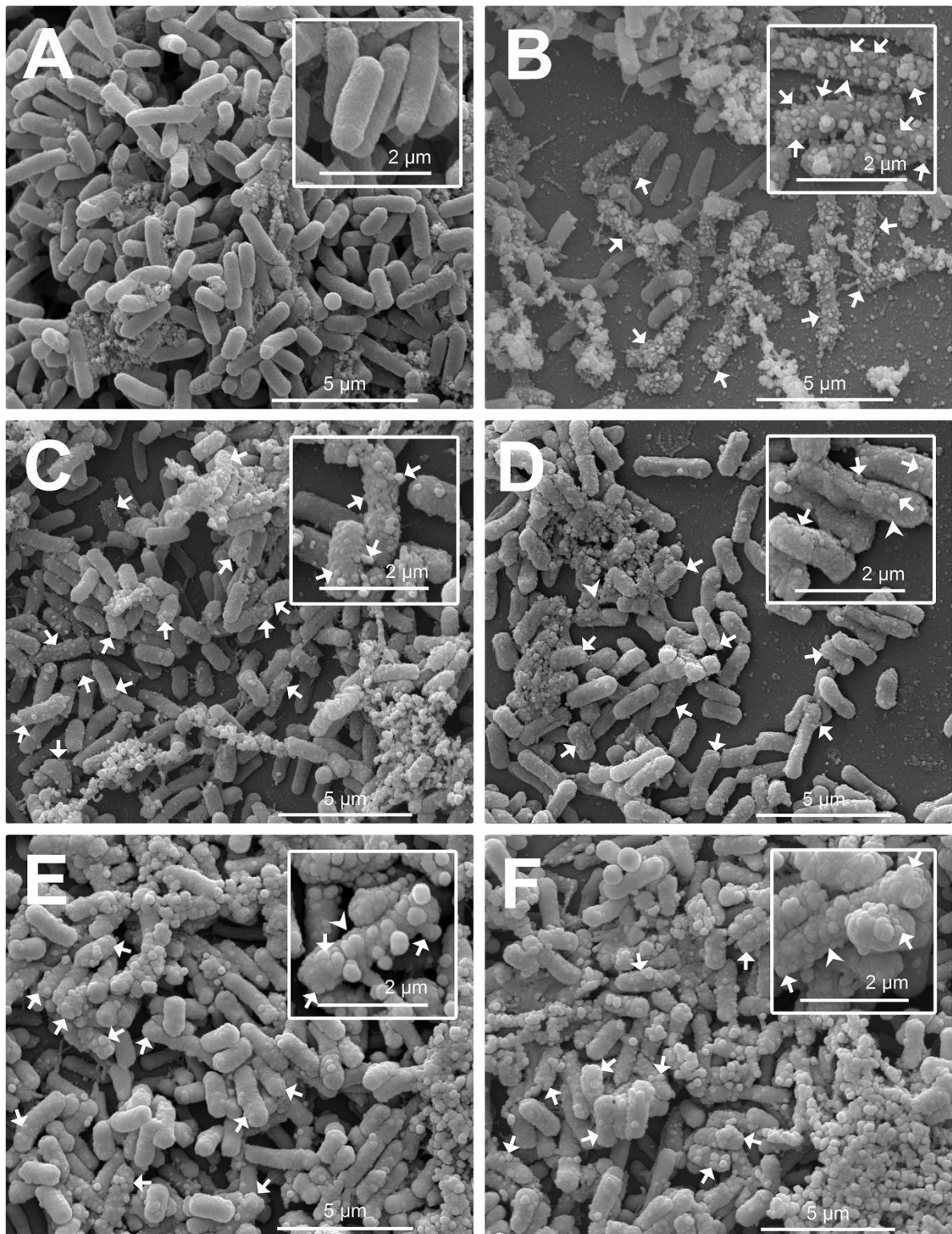


Figure 7

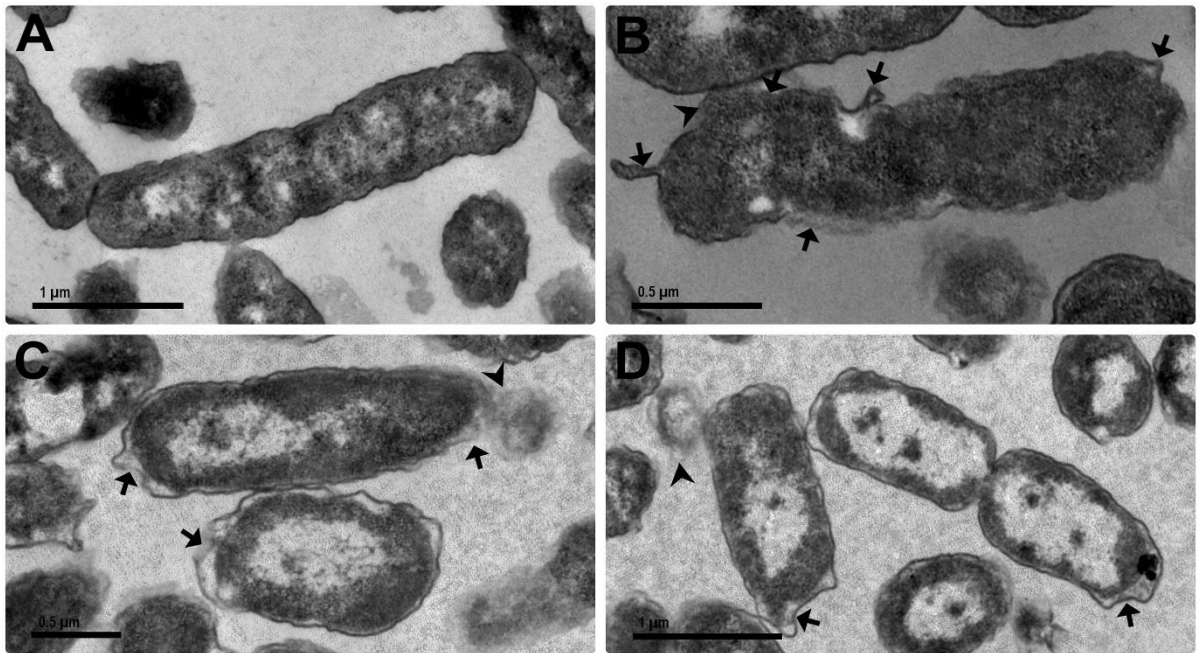
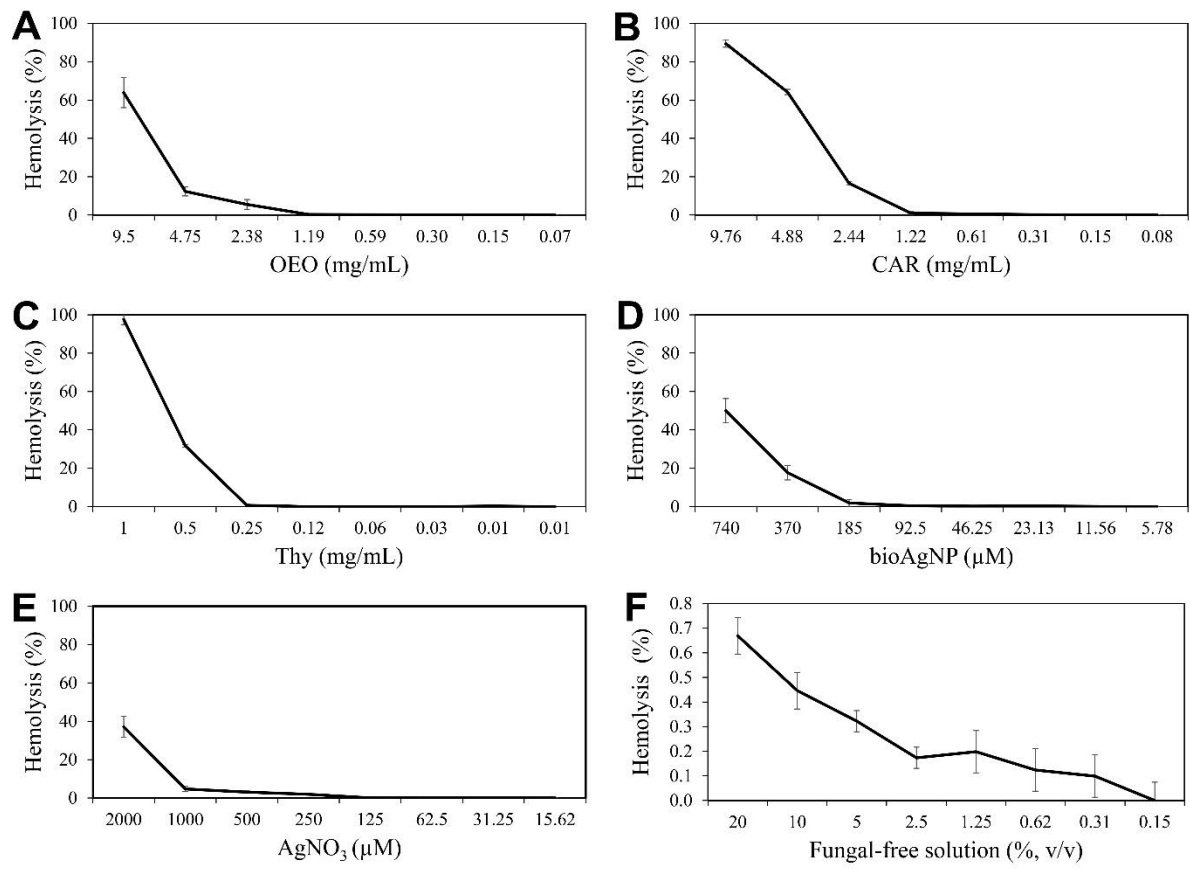


Figure 8



## 5.2 ARTIGO 2

## ARTIGO 2

**Antibiofilm effect of combinations composed of oregano derivatives and biogenic silver nanoparticles against Enteroaggregative *Escherichia coli* and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae***

**Sara Scandorieiro<sup>1</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

**\*Autor correspondente:** Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 Km 380, s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil. (kobayashirkt@uel.br)

## Abstract

Bacterial biofilms are serious problem in food industry and human health settings, since they resist to most of current antimicrobials, which justifies the urgent need of new medicines. This manuscript reports, for the first time, the antibiofilm effect of two-natural compounds combinations, *Origanum vulgare* derivatives and biogenic silver nanoparticles (bioAgNP) synthesized with *Fusarium oxysporum*, against Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. Four combinations were tested: oregano essential oil (OEO) plus bioAgNP, carvacrol (CAR) plus bioAgNP, thymol (Thy) plus bioAgNP, and CAR plus Thy. OEO, CAR, Thy, and bioAgNP alone prevented biofilm formation of both bacterial strains, by reducing biofilm biomass and its metabolic activity. Antibacterials alone also eliminated preformed biofilm by both bacteria. Antibacterial individually reduced violacein production by *Chromobacterium violaceum*, indicating that disruption of quorum sensing may be one of their antibiofilm mechanisms. Sessile minimal inhibitory concentration (SMIC) ranges were 0.3-0.59 mg/mL (OEO), 0.31-0.61 mg/mL (CAR), 0.25-0.5 mg/mL (Thy), and 5.78-185  $\mu$ M (bioAgNP). The four tested combinations prevented biofilm formation by interfering both in planktonic cells growth and also in specific pathways of sessile cells, since they inhibited biofilm formation at concentration bellow SMIC. Combinations showed higher antibiofilm effect than antimicrobials individually, since combined compounds exhibited lower SMIC or caused greater reduction in total biomass and metabolic activity of bacterial biofilms. We highlight the great antibiofilm activity of CAR plus bioAgNP and Thy plus bioAgNP, since both combinations prevented biofilm formation of both strains and extensively inhibited growth of their preformed biofilm in polystyrene and glass surface. Scanning electron microscopy showed that both combinations disrupted the three-dimensional structure of EAEC biofilm and drastically reduce its biomass density. Strong organoleptic characteristics of oregano and easy development of resistance to silver can limit their use. However, bioAgNP combined with oregano-derivatives may previne emergence of resistance, besides also reduce compounds SMIC and consequently decrease oregano taste and smell. These results suggest that these combinations may be an alternative against bacterial biofilm with few or no treatment options.

**Keywords:** oregano oil, carvacrol, thymol, *Fusarium oxysporum*, crystal violet, MTT, scanning electron microscopy, *Chromobacterium violaceum*

## 1 Introduction

Biofilm-associated pathogenic bacteria are serious problem in food and livestock industry, human health, and even in agriculture by causing persistent plant infections (Flemming et al., 2016). Biofilm formation on food and its packaging cause food spoilage, equipment impairment and foodborne diseases (Grigore-Gurgu et al., 2016; Galié et al., 2018; WHO, 2020a). Such microorganism lifestyle also has large negative impacts on veterinary field, causing huge economic losses, since biofilm-forming bacteria are responsible for diseases in poultry and ruminants; besides making pets sick (Abdullahi et al., 2016). Food containing harmful bacteria can cause more than 200 diseases, making 1 in 10 people sick worldwide and causing 420,000 deaths each year. Foodborne diseases affect mainly infants, young children, elderly and people with immune system disorders; in addition, it has negative consequences for socioeconomic development, by overloading health systems, damaging national economy, tourism and trade (WHO, 2020a). Bacterial biofilms are responsible by several chronic infections in tissues and also medical device-associated infections, contributing to about 80% of microbial infections in humans (Gupta et al., 2016a; Jamal et al., 2018; Vestby et al., 2020). It causes huge negative impact in human health, causing infections in sinuses and middle ear, dental plaque, periodontitis, endocarditis, osteomyelitis, wound infections, and infections related to devices as pacemakers, several types of catheters, joint prostheses, or implants (heart valves, dentures, contact lenses) (Gupta et al., 2016a; Jamal et al., 2018; Mirzaei et al., 2020).

The greatest challenge posed by biofilm is its ability to resist most of the current antimicrobials. Such drugs have difficulty reaching the biofilm cells because its diffusion is limited by biofilm structure, exopolysaccharide matrix is physical barrier which difficult antimicrobial penetration in the deep biofilm layers; besides that, drug molecules also may interact with matrix components, resulting in slow penetration rate and consequently microbial resistance profile (Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016a; Singh et al., 2017; Oliveira et al., 2020). Biofilm has heterogeneous nature, with metabolic diversity that may influences antimicrobial activity. There is nutrient and oxygen gradient in biofilm environment, which results in active cells in superficial biofilm layers and anaerobic less active cells in bottom (Gupta et al., 2016b; Singh et al., 2017; Kapoor et al., 2018). Many antibiotics only affects bacteria during their active metabolic stage (betalactamics, aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol, lincomycin, clindamycin, macrolides, quinolones, rifampin, among others), presenting effect on synthetic processes of proteins, cell wall, and nucleic acid (Gupta et al., 2016b; Kapoor et al., 2018). Efflux pumps are important for biofilm formation, since the secretion of EPS and quorum sensing molecules is extremely need in this microbial lifestyle, but these systems also can extrude harmful molecules as antibiotics from within cell and collaborate for the resistance profile of biofilms (Singh et al., 2017; Alav et al., 2018).

Besides biofilm intrinsic resistance, other mechanisms of resistance (antibiotic target modification, drug inactivating enzyme, efflux pumps, alteration of porin expression, and others) allow pathogenic bacteria to be tolerant to all classes of conventional available antimicrobial (Singh et al., 2017; Oliveira et al., 2020). The high cellular density and cell proximity in biofilms increase chances of genetic exchanges, including between different species, making biofilms antibiotic resistance reservoirs (Balcázar et al., 2015; Oliveira et al., 2020). Currently 700,000 people die each year due to multidrug resistant infections. If no action is taken, it is estimated that this mortality rate will increase alarmingly by 2050, causing 1 death every three seconds and 10 million deaths a year (O'Neill, 2016). Center for Disease Control (CDC, 2020) and World Health Organization (WHO, 2020b) have highlighted the urgent need for research and development of alternative antimicrobials with potential to combat resistant

bacteria and also prevent emergence of resistance.

Among the sources of alternative antimicrobials, essential oils and their components stand out. Studies have shown the antibiofilm activity of oregano essential oil (OEO) and its main bioactive agents, carvacrol (CAR) and thymol (Thy), to combat Gram-positive and Gram-negative pathogens, including multidrug-resistant strains (Nostro et al., 2007, 2009; Amaral et al., 2015; García-Heredia et al., 2016; Oh et al., 2017; Raei et al., 2017; Tapia-Rodriguez et al., 2017; Yuan and Yuk, 2019; Kerekes et al., 2019; Hassan et al., 2020; Reichling, 2020), showing potential to be applied as antibiotics in food industry, in cosmetic products, and clinical and hospital sectors (Alvarez et al., 2014; Suzuki et al., 2015; Gavahian et al., 2018; Karam et al., 2019; Mir et al., 2020; Tahmasebi et al., 2019; Arafa et al., 2020; Laothaweerungsawat et al., 2020a). Substances from plant origin have successfully been used in traditional medicine since ancient times as tea or herbal infusions for example (Nazzaro et al., 2020). Essential oils are considered as GRAS (Generally Recognized as Safe) by Food and Drug Administration (FDA, 2019), since many of them are used for food flavourings and preservation due their antioxidant and antimicrobial actions; currently around 300 essential oils are available in market (Nazzaro et al., 2020). Since essential oils are natural products, which are safe at small dosages and under specific recommendations, already incorporated in several products for human consumption (Naeem, 2018), the study and application of oregano essential oil as an antibiofilm is quite viable.

Ancient civilizations such as Persians, Phoenicians, Greeks, Romans, and Egyptians have made use of silver antimicrobial properties to preserve food, water, treat eye infections and wounds (Alexander, 2009; Lemire et al., 2013). Nanotechnology has allowed to revive the use this metal as antimicrobial, since silver nanoparticle (AgNP) have been used for over 100 years (Nowack et al., 2011) and are currently incorporated into various products and processes of our routine (such as formulation of surface cleaners, textiles, toys, water disinfection processes, inks, food packages, wound dressing, several materials for cutaneous infections, coating for bone implants, catheters) (Calderón-Jiménez et al., 2017; Nakazato et al., 2017, 2020; Kobayashi et al., 2019; Simbine et al., 2019). The antibiofilm activity of AgNP have been showed by several studies (Diggikar et al., 2013; Ansari et al., 2014; Chhibber et al., 2017; Shafreen et al., 2017; Singh et al., 2018; Meza-Villezcás et al., 2019; Siddique et al., 2020), since silver high oxidation-reduction potential and the large surface area of its nanoparticle form provide them broad antimicrobial properties (Nowack et al., 2011; Ebrahiminezhad et al., 2016).

Despite their excellent antimicrobial activity, oregano-derived compounds and bioAgNP have characteristics that limit their use. OEO, CAR, and Thy are terpenoids with strong taste and smell (Alvarez et al., 2014; Kotronia et al., 2017; Yuan and Yuk, 2019), and resistance to ionic silver and bioAgNP is already reported (Losasso et al., 2014; Graves et al., 2015; Panáček et al., 2018; Muller, 2018); so strategies are required to minimize these limitations and expand the use of such compounds. Combination of antimicrobials is strategy already practiced in clinical settings to prevent emergence of resistant strains, and it also may reduce unwanted characteristics of compounds (odor, taste, toxicity, or costs) since lower dosages of each antimicrobial are required in combinations (Fischbach, 2011; Ahmed et al., 2014; Bollenbach, 2015; Suzuki et al., 2017; Raymond, 2019; Tyers and Wright, 2019).

Our research group has shown that combinations containing OEO, CAR, Thy, and biogenic AgNP, extracellularly produced with *F. oxysporum* (bioAgNP), exhibit fast activity at low concentrations against planktonic cells of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including multidrug-resistant strains such as carbapenem-resistant Gram-negative bacilli

(*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Scandorieiro et al., 2016; Scandorieiro et al., 2020). Most of the researches seeking for new antimicrobials have been focus on planktonic cells, which is not the only lifestyle of microorganism causing infections (Mikkelsen et al., 2007; Rabin et al., 2015; Oliveira et al., 2020). This manuscript reports, for the first time, the antibiofilm potential of four combinations composed of terpenoids derived from oregano (OEO, CAR, and Thy) and bioAgNP synthesized with *F. oxysporum*. The bioAgNP evaluated in this study were produced by green nanotechnology by eco-friendly and low-cost method (Durán et al., 2005; Lima et al., 2012; Marcato et al., 2012; Lima et al., 2019). This research shows that OEO, CAR, Thy, and bioAgNP, in combination, prevent biofilm formation and eradicate preformed biofilm by Enteroaggregative *E. coli* (EAEC 042) and carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. Both strains were chosen because they are great bacterial models for biofilm formation; EAEC 042 was used as strong biofilm former (positive control) and KPC-producing *K. pneumoniae* as clinical isolate which is multidrug-resistant and also strong biofilm former.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Bacterial Strains

Four bacterial strains were used in this study. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and *E. coli* HB101 were used as standard strains for biofilm formation and negative control, respectively. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP 52) from urinary tract infection was used as clinical isolate; it shows strong biofilm formation *in vitro* and presents multidrug-resistant profile according disk diffusion assay. KPC-KP 52 shows resistance to at least 15 antimicrobials (ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cefazolin, cefepime, cefoxitin, ceftazidime, ceftazidime-clavulanate, aztreonam, ertapenem, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, nalidixic acid, chloramphenicol, and nitrofurantoin). *Chromobacterium violaceum* CCT 3468 was used as model for *quorum sensing* inhibition assay. All bacterial samples were stored in Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia) broth containing 25% (v/v) glycerol (Merck) at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

KPC-strain was provided by Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira (*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil). *C. violaceum* was provided by Dr. Marcelo Brocchi (*Universidade Estadual de Campinas*, Campinas, São Paulo, Brazil).

### 2.2 Antibacterial Agents

#### 2.2.1 Oregano-derived compounds

OEO (batch 227) was obtained from Ferquima Industry and Commerce of Essential Oil (São Paulo, Brazil). It was extracted by steam distillation and its main components (72% carvacrol, 2% thymol, 4.5% gamma-terpinene, 4% para-cymene, and 4% linalool) were described in technical report provided by company. Carvacrol-W224502 (CAR) and thymol-T0501 (Thy) were purchased from Sigma-Aldrich; their densities are 0.95 g/mL and 0.976 g/mL, respectively. Individual stock solutions of OEO, CAR and Thy were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). DMSO maximum concentration in assays was 5% (v/v).

### 2.2.2 Biogenically synthesized silver nanoparticles (bioAgNP)

The bioAgNP synthesis was performed according to previously established method (Durán et al., 2005; Caballero et al., 2006), which has been patented (Patent, 2006, PI0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). The biosynthesis methodology involved *F. oxysporum* (strain 551 provided by ESALQ-USP Genetic and Molecular Biology Laboratory – Piracicaba, São Paulo, Brazil). Fungus was grown, at 28°C for 7 days, in medium composed of 0.5% (w/v) yeast extract (Becton, Dickinson and Company), 2% (w/v) agar malt extract (Acumedia), and distilled water. *F. oxysporum* biomass was added to distilled water at 0.1 g/mL and incubated at 28°C for 72h in agitation (150 rpm). Thereafter, aqueous solution components were separated from biomass by vacuum filtration (qualitative filter having average pore size from 4 to 12 µm, Unifil). AgNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) at 0.01 M was added to this solution, and it was kept at 28°C for 15 days in absence of light (static condition). The bioAgNP were obtained after reduction of silver nitrate by fungal-free solution components. Aliquots of system were removed for measuring absorption spectra to verify surface plasmon resonance peak of bioAgNP, using an ultraviolet-visible spectrophotometry (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). Washing of bioAgNP was carried out by three steps of centrifugation (27,000g, 4°C, 30 min) followed by incubation in ultrasonic bath (30 min). Ag quantification was performed by Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer EDX-7000. Nanoparticles diameter was determined by photon correlation spectroscopy using ZetaSizer NanoZS (Malvern), and zeta potential measurement was performed using the same instrument. Transmission electron microscopy (TEM, Zeiss EM900) was used for bioAgNP morphology analysis.

### 2.3 Antibiofilm assays using microtiter plates and chemical methods for biofilm quantification

Antibiofilm effect of oregano-derived compounds (OEO, CAR, ant Thy) and bioAgNP, individually and in combination, was evaluated at two stages of bacterial biofilm formation as follows: early stage (from 0 to 24 h of biofilm growth) and biofilm maturation phase (from 24 to 48 h). For assessing the inhibition of biofilm development, antimicrobials and bacteria were added concomitantly to microtiter plate; after 24 h-incubation for biofilm formation, crystal violet-staining and dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay were performed to measure total biofilm biomass and metabolic activity, respectively. For evaluating the effect of compounds against preformed biofilm, firstly non-treated bacteria were added to microtiter plate and incubated for 24 h to allow biofilm attachment and growth, then preformed biofilm was treated with antimicrobials and incubated for additional 24 h for biofilm development; after total 48 h-biofilm formation, MTT assay were performed to measure biofilm metabolic activity.

Four antimicrobials were tested individually (OEO, CAR, Thy, and bioAgNP), whose concentrations ranged as follows: (i) 0.07 – 9.5 mg/mL for OEO, (ii) 0.08 – 9.76 mg/mL for CAR, (iii) 0.01 – 2 mg/mL for Thy, and (iv) 0.09 – 740 µM for bioAgNP. Four double-antimicrobial combinations were tested (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy), whose final concentrations ranged as follows: (i) 0.02 – 0.3 mg/mL for OEO, (ii) 0.02 – 0.31 mg/mL for CAR, (iii) 0.008 – 0.25 mg/mL for Thy, and (iv) 0.18 – 46.25 µM for bioAgNP.

All microtiter plate dye-staining assays were performed for EAEC 042 and KPC-producing *K. pneumoniae*; both strains show strong biofilm formation and were used in antibiofilm tests, since they show OD<sub>570</sub>>0.2 in crystal violet assay. *E. coli* HB101 strain was used as negative control that do not produce biofilm, since it shows OD<sub>570</sub><0.1 (Wakimoto et

al., 2004). Experiments were carried out in quintuplicate on 3 different occasions. Details of methodologies were described below.

### 2.3.1 Microtiter Biofilm Inhibition Assay

Inhibition effect of antimicrobials (individually and in combination) against bacterial biofilm formation was assessed using crystal violet dye (*K. pneumoniae* KPC 5795; Cady et al., 2012) and MTT assays (Cady et al., 2012; Riss et al., 2016), according to previously described methods, with necessary modifications. Briefly, bacterial isolated colonies grown in nutrient-agar (HiMedia) medium were suspended in phosphate-buffered saline (0.1 M PBS, pH 7.2) to standardize the inoculum density for biofilm inhibition assay. This suspension was adjusted to achieve turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard which corresponds approximately to  $1.5 \times 10^8$  colony-forming units (CFU)/mL. Bacteria and antimicrobials were added concomitantly to wells of 96-well polystyrene microtiter plate; a volume of 0.02 mL of equivalent 0.5 McFarland suspension was added to 0.18 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich), supplemented with 0.45% glucose (Sigma-Aldrich), containing antimicrobials individually or in combination. The plate was incubated at 37°C for 24 h under static conditions to allow bacterial form biofilm. Two identical microtiter plates were prepared; one for crystal violet-staining procedure and the other for MTT assay.

After 24h-incubation, planktonic cells and DMEM were discarded, and adherent biomass was rinsed three times with PBS. Biomass was stained with 0.2% (w/v) crystal violet solution for five min; then three washing steps were carried out to remove unbound dye. Finally, after adding 0.2 mL of ethanol 95% (v/v) to each well containing the bound dye, the biofilm was quantified by microplate reader at 570 nm (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). For MTT assay, after 24h-incubation planktonic cells and DMEM were discarded, and adherent cells was rinsed three times with PBS. MTT solution (0.1 mL per well at 0.25 mg/mL) was added to each well, and microplate was incubated at 37°C for 2 h. Thereafter, 0.1 mL of solubilization solution was added to each well to dissolve formazan crystals. After 15 min homogenization, the plate was read at 570 nm, using the same microplate spectrophotometer described previously. Untreated bacteria, inoculated on DMEM alone and containing DMSO at 5% (v/v), were used as positive control (defined as 100% biomass or metabolic activity). DMEM alone was used as sterility control (defined as 0% biofilm). Sessile (biofilm) minimum inhibitory concentrations were determined at 95% or greater inhibition (SMIC<sub>>95</sub>) compared to antibacterial-free control wells. The percentage of biofilm inhibition for each antimicrobial treatment was calculated using the following equation:

$$\text{Biofilm inhibition (\%)} = 100 - \left[ \frac{(\text{OD}_{570} \text{ treatment} - \text{OD}_{570} \text{ sterility control}) \times 100}{\text{OD}_{570} \text{ positive control} - \text{OD}_{570} \text{ sterility control}} \right]$$

PBS 0.1 M (pH 7.2) was composed of 0.9% (w/v) NaCl, 0.2 M monobasic sodium phosphate (Chemco) and 0.2 M dibasic sodium phosphate (Nuclear). Solubilization solution was composed of 1% (v/v) triton X-100 in acidic isopropanol (1 N HCl at 0.36%, v/v).

### 2.3.2 Biofilm Eradication Assay

Effect of antimicrobials on preformed biofilm, in microtiter plates, was analysed by MTT assay according to Cady et al. (2012) and Riss et al. (2016), with necessary modifications. Briefly, bacterial inoculum was prepared as previously described for biofilm inhibition assay. Bacteria (0.02 mL of equivalent 0.5 McFarland suspension) and DMEM supplemented with 0.45% glucose (0.18 mL) were added to wells of 96-well polystyrene microtiter plate, followed

by incubation at 37°C for 24 h to allow cell attachment and biofilm growth. Thereafter, unattached cells and medium were removed, biofilm biomass was rinsed three times with PBS. Then 0.2 mL of DMEM alone (untreated control) or DMEM containing antimicrobials (individually and in combination) were added to preformed biofilm, followed by incubation at 37° for 24 h. Finally, planktonic cells and DMEM were aspirated off; the procedure to quantify metabolic activity of biofilm was performed as previously described. Untreated bacteria, inoculated on DMEM alone or containing DMSO at 5% (v/v), were used as positive control (defined as 100% biofilm metabolic activity). DMEM alone was used as sterility control (defined as 0% biofilm metabolic activity). The percentage of preformed biofilm inhibition was calculated using the equation above. SMIC<sub>≥95</sub> values were determined compared to antimicrobials-free control.

## 2.4 Quorum sensing inhibition test based on *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* CCT 3468 was used as model for *quorum sensing* inhibition assay, since violacein production involves *quorum sensing*. Before quantitative analysis of violacein production by treated and untreated bacteria, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of compounds (individually and in combination) and quantification of viable bacterial cells (untreated and treated with subinhibitory antibacterial concentrations) were performed as described below.

### 2.4.1 Determination of subinhibitory antibacterial concentrations

Before violacein inhibition assay, subinhibitory concentrations of each compound were determined against *C. violaceum* by broth microdilution method. Determination of MIC of each antimicrobial individually (OEO, CAR, Thy, and bioAgNP) was performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2015), with necessary modifications. For antimicrobial combination (Thy plus bioAgNP), MIC values were determined by double-antimicrobial gradient as described by Traub and Kleber (1975) with necessary modifications. Briefly, to standardize the inoculum density for susceptibility test, *C. violaceum* isolated colonies grown in Luria Bertani (LB, HiMedia) agar medium were suspended in PBS 0.1M (pH 7.2) to achieve turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard, as previously described for microtiter assays. The equivalent 0.5 McFarland suspension was diluted 1:100 in LB (HiMedia) broth to obtain concentration of approximately 10<sup>6</sup> CFU/mL. A volume of 0.05 mL of bacterial inoculum at 10<sup>6</sup> CFU/mL was added to 0.05 mL of LB containing antimicrobial individually or in combination. Lastly bacteria at 5 × 10<sup>5</sup> CFU/mL in LB containing antimicrobials were incubated at 28°C for 24h with shaking (130 rpm). MIC was defined as the lowest antimicrobial concentration that inhibited visible growth after 24h of treatment at 28°C. The assay was carried out in triplicate, at least in 3 different occasions.

For antimicrobials tested individually, concentrations ranged as follows: (i) 0.07 – 9.5 mg/mL for OEO, (ii) 0.08 – 9.76 mg/mL for CAR, (iii) 0.008 – 1 mg/mL for Thy, and (iv) 2.89 – 370 µM for bioAgNP. For combination assay, concentration ranges were 0.01 – 0.06 mg/mL for Thy and 2.89 – 11.56 mg/mL for bioAgNP. LB alone and LB containing each antimicrobial separately were tested as sterility controls. Untreated bacteria inoculated on LB broth alone and containing DMSO at 5% (v/v) were tested as growth control.

## 2.4.2 Violacein Inhibition Assay

### 2.4.2.1 Quantification of viable cells in *Chromobacterium violaceum*-treated samples

Before starting violacein inhibition assay, *C. violaceum* were grown in LB broth at 28°C for 72 h (130 rpm); every 24 h, the medium was renewed by transference of 0.1 mL of each previous culture into LB broth (quantity enough for 5 mL). For violacein inhibition assay, *C. violaceum* overnight culture was diluted 1:10 in LB broth; then six samples were prepared by adding 2.5 mL of diluted bacterial inoculum to 2.5 mL of LB alone (untreated control) or LB containing antimicrobial (subinhibitory concentrations) individually or in combination, whose concentrations were as follows: (i) OEO at 0.15 mg/mL, (ii) CAR at 0.15 mg/mL, (iii) Thy at 0.12 mg/mL, (iv) bioAgNP at 92.5 µM, and (v) combination with Thy at 0.03 mg/mL and bioAgNP at 2.89 µM. The untreated and treated bacterial samples were incubated at 28°C for 24 h (130 rpm). After 24h-treatment, each sample was evaluated with regard to number of *C. violaceum* viable cells according to NCCLS (1999); 10 µL from serial dilutions (in PBS 0.1M, pH 7.2) of treated and non-treated cultures were subcultured in LB agar for CFU/mL determination.

### 2.4.2.2 Quantitative analysis of violacein production

Firstly, the amount of violacein produced by each sample (treated and non-treated *C. violaceum*), previously described in section 2.4.2.1, was qualitatively analysed (turbidity and color of bacterial cultures were analysed by visual inspection). Thereafter, quantitative analysis of violacein production was performed according Blosser and Gray (2000). Briefly, bacterial cells of each sample were pelleted (5,500g, 10 min, 25°C) and resuspended with 200 µL 0.1 M PBS (pH 7.2). Bacterial cells were lysed by adding 200 µL of 10% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS), mixing for 10 s with vortex mixer, and incubating at room temperature for 5 min. For violacein extraction, 900 µL of water-saturated butanol (1:3) was added to cell lysate, followed by mixing for 5 s. The final solution was centrifuged (13,000g, 5 min). The upper n-butanol phase containing violacein was collected and transferred to a 96-wells plate. The absorbance of extracted violacein was measured at 595 nm in microplate reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). Untreated bacteria inoculated on LB broth alone or containing DMSO at 5% (v/v) were used as positive control (defined as 100% of violacein production). The percentage of violacein produced by treated cells was calculated using the equation below. The assay was carried out in triplicate, at least in three different occasions.

$$\text{Violacein production (\%)} = \left[ \frac{\text{OD}_{595} \text{ treatment} \times 100}{\text{OD}_{595} \text{ untreated control}} \right]$$

## 2.5 Scanning Electron Microscopy (SEM) Study of Antibiofilm Effect of Compounds

The effect of oregano-derived compounds (OEO, CAR, and Thy) and bioAgNP, individually and in combination, against preformed biofilm of EAEC 042 was analysed by SEM. Firstly, bacterial inoculum was prepared as described for microtiter biofilm inhibition assay. Bacteria (0.1 mL of equivalent 0.5 McFarland suspension) and DMEM supplemented with 0.45% glucose (0.9 mL) were added to wells (which contained uncoated glass slides at the bottom) of 24-well polystyrene microtiter plate, followed by incubation at 37°C for 24 h in agitation (120 rpm) to allow cell attachment and biofilm growth. Thereafter, unattached cells and medium were removed, biofilm biomass was rinsed three times with PBS 0.1M (pH 7.2). Then 0.2 mL of DMEM alone (untreated control) or DMEM containing antimicrobials

(individually and in combination) were added to preformed biofilm, followed by incubation at 37° for 24 h (120 rpm).

As biofilm was formed on a different surface (glass slides), the antibacterial concentrations were not chosen based on 96-well polystyrene microplate assay. Therefore, SMIC<sub>100</sub> of treatments was determined under specific conditions for SEM assay. Thus, eight treatments at  $0.5 \times$  SMIC<sub>100</sub> (sessile minimum inhibitory concentration which eliminated 100% or preformed biofilm) were evaluated by electron microscopy as follows: (1) OEO at 0.3 mg/mL; (2) CAR at 0.31 mg/mL, (3) Thy at 0.12 mg/mL, (4) bioAgNP at 46.25  $\mu$ M, (5) OEO (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M), (6) CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M), (7) Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M), and (8) CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL).

After 24h-treatment, planktonic cells and DMEM were aspirated off, adherent biomass was rinsed three times with PBS 0.1M (pH 7.2), and preparation of samples (treated and untreated bacteria) for SEM analyses was performed according (Erlandsen et al., 2004), with necessary modifications. Previously, four solutions for microbial glycocalyx fixation were tested (data not shown), and solution containing alcian blue as cationic dyes was chosen as the most suitable one for EAEC 042. Firstly, glass slides with adherent biomass (treated and untreated samples) were immersed for 20 h (at 4°C) in 1 mL of 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 2% (v/v) paraformaldehyde, and 0.15% (w/v) alcian blue. After primary fixation in aldehyde with alcian blue, the samples were washed (three washing steps of 10 min each) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), following post-fixation in OsO<sub>4</sub> 1% for 2 h at room temperature. All reagents for both chemical fixations were provided from Electron Microscopy Sciences. Post-fixed samples were then rinsed (three times of 10 min each) in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and dehydrated in an ethanol gradient (Sigma-Aldrich) (30, 50, 70, 90, and 100°GL), critical point-dried using CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under scanning electron microscope (FEI Quanta 200).

### **3 Results**

#### **3.1 BioAgNP Characterization**

Fungal-free solution without AgNO<sub>3</sub> was pale yellow. After adding silver salt, the solution color changed to brownish and its color intensity increased in the course of time while incubated at 28°C, suggesting bioAgNP formation. Nanoparticles band plasmonic also indicated that bioAgNP were synthesized; the UV-visible absorbance spectra are shown in Figure 1A. BioAgNP exhibited surface plasmon resonance peak centered at 410 nm, while pale yellow fungal-free solution (negative control) showed no absorption peak at this wavelength.

Photon correlation spectroscopy and scanning microscopy analysis confirmed nanoparticles formation. SEM micrograph of bioAgNP shows spherical shape of nanoparticles (Figures 1B). Average bioAgNP diameter and zeta potential were 84.10 nm and -15.9 mV, respectively. Nanoparticles size and zeta potential distributions are shown in supplementary material (Supplementary Figures 1 and 2). Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer analysis confirmed the presence of Ag in nanoparticle samples.

#### **3.2 Biofilm inhibition assay in microtiter plates (compounds individually)**

All oregano-derived compounds (OEO, CAR, and Thy) and bioAgNP individually

significantly inhibited biofilm formation of both bacterial strains (EAEC 042 and KPC-producing *K. pneumoniae*) compared to untreated bacterial controls. As shown in Table 1, no biofilm metabolic activity ( $p < 0.05$ ) and at least 90% ( $p < 0.05$ ) of reduction in total biofilm biomass were detected after 24h-treatments with the following ranges: 0.3-9.5 mg/mL (OEO), 0.31-9.76 mg/mL (CAR), 0.25-2 mg/mL (Thy), and 5.78-11.56  $\mu\text{M}$  (bioAgNP) for EAEC 042; 0.59-9.5 mg/mL (OEO), 0.31-9.76 mg/mL (CAR), 0.25-2 mg/mL (Thy), and 11.56-46.25  $\mu\text{M}$  (bioAgNP) for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*.

According Table 3, the mean  $\text{SMIC}_{\geq 95}$  of each antimicrobial for EAEC/KPC-producing *K. pneumoniae* (respectively), during biofilm formation, were 0.30/0.59 mg/mL (OEO), 0.31/0.31 mg/mL (CAR), 0.25/0.25 mg/mL (Thy), and 5.78 /11.56  $\mu\text{M}$  (bioAgNP).  $\text{SMIC}_{\geq 95}$  was determined with MTT method. All antibacterials individually prevented biofilm formation by both strains, since  $\text{SMIC}_{\geq 95}$  values also inhibited planktonic cells growth. At subinhibitory concentrations for planktonic cells, Thy did not inhibit EAEC biofilm formation (Figure 2A), and bioAgNP did not inhibit KPC-producing *K. pneumoniae* biofilm formation (Figure 2C), since both antimicrobials did not cause reduction in biomass and metabolic activity of biofilms compared do untreated control ( $p > 0.05$ ). Subinhibitory concentrations (for planktonic cells) of OEO, CAR and bioAgNP inhibited EAEC 042 biofilm formation, reducing significantly ( $p < 0.05$ ) biofilm total biomass by 39.68%, 59.76%, and 65.92% respectively compared to untreated control; MTT assay showed that bioAgNP caused significant reduction in metabolic activity by 27.05% ( $p < 0.05$ ), while OEO and CAR non-significantly reduced ( $p > 0.05$ ) EAEC biofilm viability by 2.95% (OEO) and 2.04% (CAR) (Figure 2A). OEO, CAR and Thy, at subinhibitory concentrations (for planktonic cells), inhibited KPC-producing *K. pneumoniae* biofilm formation, reducing significantly ( $p < 0.05$ ) biofilm total biomass by 53.85%, 23.20%, and 19.96% respectively, compared to untreated control; MTT assay showed that OEO, CAR, and Thy significantly ( $p < 0.05$ ) reduced biofilm metabolic activity by 42.28%, 24.10%, and 6.28% respectively (Figure 2C).

### 3.3 Biofilm eradication assay in microtiter plates (compounds individually)

OEO, CAR, Thy, and bioAgNP alone significantly ( $p < 0.05$ ) decreased metabolic activity of preformed biofilm (24h) of EAEC 042 and KPC-producing *K. pneumoniae*, compared do untreated control. Figure 3A shows the effect of each antibacterial individually (at  $\text{SMIC}_{\geq 95}$ ) on metabolic activity of preformed biofilms of EAEC and carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. As shown in Table 2, antibacterials reduced at least 95% of EAEC preformed biofilm at concentrations ranging as follows: 0.59-9.5 mg/mL (OEO), 0.61-9.76 mg/mL (CAR), 0.5-2 mg/mL (Thy), and 185-740  $\mu\text{M}$  (bioAgNP). For KPC-producing *K. pneumoniae* biofilm, at least 95% of reduction in viability of sessile cells was detected at concentrations ranging as follows: 0.59-9.5 mg/mL (OEO), 0.31-9.76 mg/mL (CAR), 0.25-2 mg/mL (Thy), and 46.25-740  $\mu\text{M}$  (bioAgNP) (Table 2). The mean  $\text{SMIC}_{\geq 95}$  values for EAEC/KPC-producing *K. pneumoniae* (respectively) were 0.59/0.59 mg/mL (OEO), 0.61/0.31 mg/mL (CAR), 0.5/0.25 mg/mL (Thy), and 185/46.25  $\mu\text{M}$  (bioAgNP) (Table 3).

### 3.4 Combinatory effect of oregano derivatives and bioAgNP compared to both antimicrobials individually against bacterial biofilms growth in microtiters plates, which were evaluated under inhibition condition

All four double-antimicrobial combinations inhibited significantly ( $p < 0.05$ ) biofilm formation of EAEC 042 and carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. For EAEC, OEO, CAR or Thy combined with bioAgNP, and combination composed of CAR and Thy, all antimicrobials at subinhibitory concentrations for planktonic cells, significantly ( $p < 0.05$ ) reduced biofilm

biomass production and its metabolic activity (Figure 2B). For KPC-producing *K. pneumoniae*, all four combinations at subinhibitory concentrations for planktonic cells, significantly ( $p < 0.05$ ) reduced biofilm total biomass, and three combinations, except Thy plus bioAgNP, decreased ( $p < 0.05$ ) biofilm metabolic activity (Figure 2D).

In biofilm inhibition assay, all four combinations showed improved antibiofilm activity against EAEC and KPC-*K. pneumoniae* compared to antimicrobials individually, by reducing  $SMIC_{\geq 95}$  of each compound in combination (Table 3) or even by reducing biomass production and viability of biofilm by greater intensity in cases that combinations did not decrease  $SMIC_{\geq 95}$  (Tables 4). Table 4 presents the combinatory effect of antimicrobials on biofilm formation of both bacterial strains compared to individual treatment, showing the biofilm biomass and metabolic activity reduction.

Compared to individual treatments, combination composed of OEO plus bioAgNP reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial against biofilm formation of KPC-producing strain; the concentration reductions were 50% for OEO and 50% for bioAgNP (Table 3). Although OEO plus bioAgNP did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of compounds against EAEC biofilm formation (Table 1), this combination still showed higher effect ( $p < 0.05$ ) than individual treatments (Table 4), since OEO (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (1.44  $\mu$ M) reduced total biomass by 88.19% and metabolic activity by 69.59%; both antibacterials alone at same concentrations reduced biomass by 39.68% (OEO) and 65.92% (bioAgNP), and metabolic activity by 2.95% (OEO) and 27.05% (bioAgNP).

Combination composed of CAR and bioAgNP reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial, compared to individual treatments against biofilm formation of KPC-producing strain; the concentration reductions were 50% for CAR and bioAgNP (Table 3). CAR plus bioAgNP did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of compounds against EAEC biofilm formation (Table 3); however, this combination still showed improved effect ( $p < 0.05$ ) compared to individual treatments (Table 4), CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (1.44  $\mu$ M) reduced total biomass by 83.85% and metabolic activity by 63.88%; both antibacterials alone at same concentrations reduced biomass by 59.75% (CAR) and 65.92% (bioAgNP), and metabolic activity by 2.95% (CAR) and 27.05% (bioAgNP).

For EAEC biofilm formation, bioAgNP at 2.89  $\mu$ M (which represents  $0.5 \times SMIC_{\geq 95}$  individually) has not been tested in combination with OEO or CAR, since this concentration alone already has great antibiofilm effect, reducing biomass production by 98.31% ( $p < 0.05$ ) and viability by 90.72% ( $p < 0.05$ ). For combination assay, to allow comparison between combined and individual treatments, only concentrations that alone did not have or had little antibiofilm effect were chosen.

Combination composed of Thy and bioAgNP reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial, compared to individual treatments, against EAEC and KPC-producing strain biofilm formation.  $SMIC_{\geq 95}$  reductions were 50% (Thy) and 75% (bioAgNP) for EAEC 042; 50% (Thy) and 75% (bioAgNP) for KPC-producing *K. pneumoniae* (Table 3).

For EAEC biofilm formation, combination containing CAR and Thy reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial by 50%, compared to individual treatments (Table 3). Although, CAR plus Thy did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  against KPC-producing *K. pneumoniae* at biofilm formation stage (Table 3), this combination still showed higher effect ( $p < 0.05$ ) than individual treatments (Table 4), since CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.12 mg/mL) caused reduction by 33.94% in biofilm biomass and 33.92% in its metabolic

activity; while antibacterials alone at same concentrations reduced biomass by 23.20% (CAR) and 19.96% (Thy), and viability by 24.10% (CAR) and 6.28% (Thy).

### 3.5 Combinatory effect of oregano derivatives and bioAgNP compared to both antimicrobials individually against bacterial preformed biofilm in microtiter plates

All four double-antimicrobial combinations inhibited significantly ( $p < 0.05$ ) growth of preformed biofilm EAEC 042 and carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Figure 3B). All four combinations showed improved activity against preformed biofilm compared to antimicrobials individually, by reducing  $SMIC_{\geq 95}$  of each compound in combination (Table 3) or by reducing biomass production and viability of biofilm by greater intensity in cases that  $SMIC_{\geq 95}$  of combination was not found (Tables 5).

Compared to individual treatments, combination composed of OEO and bioAgNP reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial against preformed biofilm of EAEC 042; the concentration reductions were 50% for OEO and 75% for bioAgNP (Table 3). Although OEO plus bioAgNP did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of compounds against preformed biofilm of KPC-producing *K. pneumoniae* (Table 3), this combination still showed higher effect ( $p < 0.05$ ) than individual treatments (Table 5), since OEO (0.3 mg/mL) plus bioAgNP (11.56  $\mu$ M) reduced metabolic activity by 80.52%, and both antibacterials alone at same concentrations reduced it by 38.90% (OEO) and 55.24% (bioAgNP).

Combination composed of CAR and bioAgNP reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial, compared do individual treatments, against preformed biofilm of EAEC, the concentration reductions were 50% for CAR and 75% for bioAgNP (Table 3). CAR plus bioAgNP did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of compounds against preformed biofilm of KPC-producing *K. pneumoniae* (Table 3); however, this combination still showed improved effect ( $p < 0.05$ ) compared to individual treatments (Table 5), since CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (11.56  $\mu$ M) reduced metabolic activity by 65.88%; both antibacterials alone at same concentrations reduced it by 32.78% (CAR) and 55.24% (bioAgNP).

Combination composed of Thy and bioAgNP reduced significantly ( $p < 0.05$ )  $SMIC_{\geq 95}$  of each antimicrobial, compared do individual treatments, against EAEC biofilm (evaluated at preformed biofilm stage);  $SMIC_{\geq 95}$  reductions were 75% (Thy) and 87.5% (bioAgNP) (Table 3). Thy plus bioAgNP did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of compounds against preformed biofilm of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Table 3); however, this combination still showed improved effect ( $p < 0.05$ ) compared to individual treatments (Table 5), since individual antimicrobials at  $0.25 \times SMIC_{\geq 95}$  (Thy at 0.06 mg/mL and bioAgNP at 11.56  $\mu$ M) caused 14.88% (Thy) and 55.25% (bioAgNP) reduction in metabolic activity and combination (with same concentrations) decreased viability by 62.46%.

For preformed biofilm of EAEC, bioAgNP at 46.25  $\mu$ M (which represent  $0.25 \times SMIC_{\geq 95}$  individually) have been tested in combination, although this concentration alone reduced biofilm viability by 70.02%. BioAgNP individually at 23.12  $\mu$ M (which represent  $0.125 \times SMIC_{\geq 95}$  individually) reduced biofilm metabolic activity by 27.88%, but in combination with 0.15 mg/mL OEO or 0.12 mg/mL Thy (at concentrations below  $SMIC_{\geq 95}$ ) significantly ( $p < 0.05$ ) improved antibiofilm effect, reducing metabolic activity by 40.77% and 98.19% respectively (individually OEO and Thy reduced viability by 5.58% and 0.79% respectively). BioAgNP (23.12  $\mu$ M) plus CAR (0.12 mg/mL) did not show improved antibiofilm effect compared to antimicrobials individually, since combination reduced viability by 26.40% (almost same reduction caused by bioAgNP alone) (Table 5). For preformed biofilm of KPC-producing *K.*

*pneumoniae*, bioAgNP at 23.12  $\mu\text{M}$  (which represents  $0.5 \times \text{SMIC}_{\geq 95}$  individually) has not been tested in combination with OEO or CAR, since this concentration alone already has great antibiofilm effect, reducing biofilm viability by 81.90% ( $p < 0.05\%$ )

Although, CAR plus Thy did not reduce  $\text{SMIC}_{\geq 95}$  of compounds against preformed biofilm of EAEC and KPC-producing *K. pneumoniae* (Table 3), this combination still showed higher effect than individual treatments, since antimicrobials individually at  $0.5 \times \text{SMIC}_{\geq 95}$  or lower concentrations caused less reduction ( $p < 0.05$ ) in metabolic activity than combination containing same concentrations (Table 5). For EAEC preformed biofilm, CAR (0.31 mg/mL) and Thy (0.25 mg/mL) reduced metabolic activity by 93.07%, while antibacterials alone caused reduction of 11.77% (CAR) and 12.62% (Thy). For preformed biofilm of KPC-producing *K. pneumoniae*, CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL) decrease biofilm metabolic activity by 73.76%, while individual compounds at same concentrations reduced viability by 32.78% (CAR) and 14.88% (Thy). For preformed biofilm of KPC-producing *K. pneumoniae*, Thy at 0.12 mg/mL (which represent  $0.5 \times \text{SMIC}_{\geq 95}$  individually) have not been tested in combination, since this concentration alone already has great antibiofilm effect, reducing biofilm viability by 79.86% (Thy).

### 3.6 Effect of Compounds on Preformed Biofilm (Scanning Electron Microscopy Study)

Figures 4, 5, and 6 show the effect of antibacterials individually (OEO, CAR, Thy, and bioAgNP) and in combination (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy) on preformed biofilm of EAEC 042 in glass surface.

Figure 4A-I shows biofilm amount on glass surface, since all images were taken at magnification  $1,600 \times$  and allow surface-wide analysis. Untreated sample (Figure 4A) shows slightly high-density biofilm, with great number of cells, bacterial aggregation, formation of microcolonies, and architecture at initial stage of organization. Figure 4A represents healthy biofilm at early stage of maturation, since it does not have high biomass density and its three-dimensional architecture is still under development (Figure 4A). Thy-treated (Figure 4D), bioAgNP-treated (Figure 4E), CAR plus bioAgNP-treated (Figure 4G), and Thy plus bioAgNP-treated (Figure 4H) samples show damaged biofilm, with less dense biomass, no early architecture organization, extensively decrease in cell density, and smaller and scattered sparsely cellular aggregates, compared to untreated control. OEO-treated sample (Figure 4B) and OEO plus bioAgNP-treated sample (Figure 4F) show less dense biofilm, with slightly less cellular density and bacterial aggregation compared to untreated sample. CAR-treated sample (Figure 4C) and CAR plus Thy-treated sample (Figure 4I) show biofilm with high cellular density similar to untreated control.

Figure 5A-I shows exopolysaccharide matrix and intercellular networks, since images were taken at magnification  $10,000 \times$  and allow analysis in detail of biofilm architecture. Untreated sample (Figure 5A) shows organized three-dimensional architecture in development, in which extracellular fibril is distributed in an orderly manner, presenting intercellular networks that is typical of healthy biofilm. All antimicrobials affected the development of biofilm architecture, which seems unstructured, resulting in less dense matrix, and loss of cell connections, compared to untreated control. Such damages are more intense in Thy-treated (Figure 5D), bioAgNP-treated (Figure 5E), CAR plus bioAgNP-treated (Figure 5G), and Thy plus bioAgNP (Figure 5H) samples. OEO-treated (Figure 5B), CAR-treated (Figure 5C), and CAR plus Thy (Figure 5I) show more cellular density compared to control and other treatments, however intercellular networks are extremely poor.

Figure 6A-I consists of images at high magnification (20,000 ×) that show details of morphological changes and deformations in EAEC 042 treated-cells, and no alterations in untreated cells. Untreated sample (Figure 6A) shows EAEC cells with intact surface, typical size and rod-shape. OEO-treated (Figure 6B) and Thy-treated (Figure 6D) samples show cells with morphological alterations, such as sinking of bacterial cell wall and irregular wrinkled surface. BioAgNP-treated biofilm (Figure 6E) shows cells with reduced size compared to untreated control, and deformed cells with irregular wrinkled surface. OEO plus bioAgNP sample (Figure 6F) shows altered cells with irregular wrinkled surface. CAR plus bioAgNP (Figure 6G) and Thy plus bioAgNP (Figure 6H) samples show cells with reduced size and irregular wrinkled surface, compared to untreated control. CAR-treated sample (Figure 6C) and CAR plus Thy sample (Figure 6I) show cellular population without remarkable morphological alterations.

### 3.7 Scanning Electron Microscopy Study of 24h-Biofilms of EAEC and KPC strains

Figure 8 consists of scanning electron micrographs (1,000 ×) of EAEC 042 and KPC-producing *K. pneumoniae* biofilms grown for 24h in glass slides. EAEC (Figure 8A) exhibits biofilm in an immature phase, but more developed than *K. pneumoniae* (Figure 8B). After 24 h of growth, *E. coli* biofilm already shows initial development of three-dimensional architecture, with cellular aggregates and remarkable amount of EPS. With the same growth time, *K. pneumoniae* shows non-aggregated cells and extremely minimal amount of EPS, still without three-dimensional structure characteristic of biofilm.

### 3.8 Effect of Compounds on Violacein Production

The mean MIC values of antibacterials against *C. violaceum* are as follows: 0.15 mg/mL for OEO, 0.08 mg/mL for CAR, 0.12 mg/mL for Thy, and 23.13 μM for bioAgNP. Since MIC values were determined with initial bacterial inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU/mL, and violacein assay was performed with initial bacterial inoculum of approximately  $5 \times 10^7$  CFU/mL, the subinhibitory concentrations of treatments used in violacein assay were as follows: OEO at 0.07 mg/mL, CAR at 0.04 mg/mL, Thy at 0.06 mg/mL, bioAgNP at 23.13 μM, and combination of Thy (0.008 mg/mL) plus bioAgNP (2.89 μM).

The chosen subinhibitory concentrations of oregano-derivatives antibacterials and bioAgNP, individually and in combination, reduced violacein production (Figures 7) and did not inhibit *C. violaceum* growth (Table 6). Table 6 shows that all treated- *C. violaceum* samples and untreated sample are similar with regard to number of viable cells (approximately  $10^9$  CFU/mL). Figure 7A qualitatively shows that OEO, CAR, Thy, bioAgNP, and Thy plus bioAgNP have inhibitory effects on violacein production in *C. violaceum*, since all treated-bacterial cultures visually lack violet pigment or present dramatically reduced violet colour compared to untreated control. Figure 7B quantitatively shows the significant ( $p < 0.05$ ) inhibitory effect of antimicrobials on violacein production, which reduced by 92.80% (OEO), by 93.64% (CAR), 92.10% (Thy), 80.85% (bioAgNP), and 95.41% (Thy plus bioAgNP), compared to non-treated *C. violaceum* violacein production.

## 4 Discussion

This study shows the antibiofilm effect of oregano-derived compounds and bioAgNP (biologically synthesized using *F. oxysporum* components) against Enterobacteriaceae, such as EAEC 042 and carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains. We report the action of those compounds against bacterial biofilm at two stages of formation, early stage (from 0 to 24h of

biofilm growth) and biofilm maturation phase (from 24h to 48 h). Biofilms are heterogeneous in their structure, organization and metabolic characteristics, their life cycle complexity must be considered for evaluating results of antibiofilm assays, since antimicrobials can exhibit effect against biofilm at different stages (Azeredo et al., 2017; Haney et al., 2018; Ren et al., 2018). In this study, three methodologies were used (crystal violet staining, MTT assay, and SEM) for accessing biofilm total biomass, its viability and structure respectively; in addition, an initial study about *anti-quorum* sensing effect of compounds was carried out using *C. violaceum*. The present data highlight the importance of using combined methodologies to access antibiofilm activity of compounds; each method has its advantages and limitations and evaluates specific aspect of biofilm, and in combination they allow more reliable conclusions (Hannig et al., 2010; Haney et al., 2018). Violet crystal technique was crucial in our analysis of biofilm at early stage of formation, since MTT assay alone would not show the efficiency of some antimicrobials to prevent biofilm formation. As shown in figure 2, some treatments prevent biofilm formation (as they reduce total biomass production measured by violet crystal), but possibly cause stress in bacterial population because MTT test shows treated sample with high metabolic activity similar to non-treated control. However, MTT assay was essential for our preformed biofilm study, as this technique was more sensitive than violet crystal to show antimicrobial activity against biofilm in an advanced stage of development. The violet crystal test was not feasible for detecting preformed biofilm biomass, but the microscopic technique allowed this analysis to be successful. This research also showed the effect of compounds on growth of biofilm in polystyrene microtiter plate and glass slide. Different surfaces and environment influence biofilm growth and also may impact biofilm susceptibility to antibiotics (Garrett et al., 2008; Ren et al., 2018; Williams et al., 2019).

OEO, CAR, Thy, and bioAgNP individually inhibited EAEC 042 biofilm formation, reducing its viability by 100% and biomass production at least by 90%; SMIC<sub>100</sub> values are shown in table 1. All compounds alone at SMIC<sub>100</sub> also inhibited planktonic cells growth; only OEO, CAR, and bioAgNP (at subinhibitory concentrations for planktonic cells) inhibited EAEC biofilm formation (Figure 2A), and it suggests that the three compounds show effect on biofilm formation by interfering both in planktonic cells growth and also in specific pathways of sessile cells. While Thy-antibiofilm activity may relies on action against planktonic cells, since it did not cause reduction in biofilm biomass and viability at concentration bellow SMIC<sub>100</sub>. Planktonic cells and biofilm life styles of single species are expressing different genes, and consequently accomplishing different activities (Mikkelsen et al., 2007; Wood, 2009). Biofilm inhibition at subinhibitory concentrations (for planktonic cells) might be due to inhibitory effect on expression of genes related to motility and biofilm formation, or effect on specific biofilm structures and metabolic paths (De La Fuente-Núñez et al., 2012; Saleem et al., 2017; Singh et al., 2018). In agreement with our data, other studies also reported that OEO and CAR (Lee et al., 2008; García-Heredia et al., 2016; Oh et al., 2017; Reichling, 2020) and bioAgNP (Ansari et al., 2014; Sharma et al., 2016; Singh et al., 2018) prevent *E. coli* biofilm formation.

For KPC-producing *K. pneumoniae*, all four tested antibacterials individually prevented biofilm formation, reducing metabolic activity of sessile cells by 100% and decreasing total biofilm biomass at least by 90% (SMIC<sub>100</sub> values evaluated under inhibition condition are shown in Tables 1 and 3). All compounds at SMIC<sub>100</sub> also inhibited planktonic cells growth; at subinhibitory concentrations for planktonic cells, only OEO, CAR, and Thy inhibited biofilm formation of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Figure 2C). It suggests that oregano compounds show effect on biofilm formation by interfering both in planktonic cells growth and also in specific pathways of biofilm lifestyle, since they reduced total biofilm biomass and its metabolic activity compared to untreated bacterium. While bioAgNP-antibiofilm activity may

relies on action against planktonic cells, since these nanoparticles did not cause reduction in biofilm biomass and its viability at concentration below  $SMIC_{100}$ . Some researchers also showed that OEO, CAR, and Thy inhibited *K. pneumoniae* biofilm formation (Raei et al., 2017; Hassan et al., 2020) in agreement with our data.

In this study, EAEC 042 was more sensitive to bioAgNP than KPC-producing *K. pneumoniae*, since these metal nanoparticles prevented biofilm formation at 2.89  $\mu\text{M}$  (0.3  $\mu\text{g/mL}$ ) for *E. coli* and 11.56  $\mu\text{M}$  (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for *K. pneumoniae*. Literature data shows that bioAgNP prevent biofilm formation by several bacterial species, including *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, with wide range of  $SMIC$  (Diggikar et al., 2013; Shafreen et al., 2017; Singh et al., 2018; Ansari et al., 2014). Unlike our data, some studies show that bioAgNP, even at subinhibitory concentrations, inhibited biofilm formation by *K. pneumoniae* (Ansari et al., 2014; Chhibber et al., 2017; Siddique et al., 2020). Thus, comparison of results is difficult, since effective concentration of bioAgNP vary in each study because of nanoparticles diversity in terms of size, morphology, composition, stabilizing agents, and surface charge; furthermore, the use of different techniques for nanoparticles characterization and microbiological analysis may influence conclusion regard the antimicrobial activity (Durán et al., 2016b, 2016a; Nisar et al., 2019; Sánchez-López et al., 2020). To reduce factors that limit comparison of results between different studies, we highlight the importance of standardization of bioAgNP characterization and their microbiological assays, specifically with regard to antibiofilm assays (Durán et al., 2016b; Azeredo et al., 2017). Moreover, different bacterial strains used in several studies may have structural and metabolic differences that make them more or less sensitive to such compounds (Sheikh et al., 2001; Wood, 2009; García-Heredia et al., 2016; Singh et al., 2019)

All tested antibacterials (at  $SMIC_{100}$  or higher concentrations) inhibited biofilm formation by EAEC and carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. However, at concentrations lower than  $SMIC_{100}$ , Thy only inhibited KPC-biofilm formation and bioAgNP only prevented EAEC biofilm formation; OEO and CAR prevented biofilm formation by both species. Furthermore, OEO and CAR seem to act by different ways against EAEC and *K. pneumoniae*. For KPC-producing *K. pneumoniae*, the two oregano-compounds reduced both biofilm biomass and viability. In case of EAEC, both OEO and CAR reduced total biomass, but it seems they caused bacterial stress response, since treated-biofilm showed high metabolic activity similar to non-treated control (Figure 2A). It is known that during acid stress, *E. coli* upregulate some components of electron transport chain, including NADH dehydrogenase II, succinate dehydrogenase, and NADH dehydrogenase I; under normal growth such enzymes are involved in generating proton motive force by redox reactions with exportation of protons from the cells (Kanjee and Houry, 2013). Mechanism of biofilm formation varies between *E. coli* and *K. pneumoniae* (Sheikh et al., 2001; Wood, 2009; Singh et al., 2019), these differences may contribute to both bacteria respond differently to different treatments. *K. pneumoniae* initial colonization is more passive process compared to *E. coli*; probably it happens due of lacking of motility in *K. pneumoniae* which cells are less metabolically active at stages of attaching to surfaces and become progressively active in mature biofilm (Jones and Bradshaw, 1996). Such metabolic differences at initial stages of biofilm formation may explain why OEO or CAR-treatments increased EAEC cells viability and decreased it in KPC-producing *K. pneumoniae*. García-Heredia et al. (2016) reported that OEO and CAR inhibited biofilm formation by EAEC 042, but both compounds did not prevent EAEC O104:H4 biofilm formation. It indicates that EAEC strains show difference in their genomic regulation, suggesting that responses to oregano-derivatives are not only compound-dependent, but may also depend on strain to strain variations, in agreement with our results.

The present results suggest that OEO, CAR, Thy, and bioAgNP may show specific inhibiting effects on different bacterial species. Several mechanisms may drive their antibiofilm properties, such as reducing fimbriae production, decreasing swarming motility, reducing flagellar biosynthesis, *quorum-sensing* interruption, inhibition of efflux pumps, and others (Lee et al., 2008; Alvarez et al., 2014; Baugh et al., 2014; Burt et al., 2014; Ali et al., 2017; Tapia-Rodriguez et al., 2017; Roy et al., 2018; Yuan and Yuk, 2019; Nazzaro et al., 2020). This study showed that all oregano-compounds and bioAgNP reduced violacein production by *C. violaceum*, suggesting that disruption of quorum sensing is one of ways by which they prevent biofilm formation in agreement with literature (Alvarez et al., 2014; Baugh et al., 2014; Burt et al., 2014; Ali et al., 2017; Tapia-Rodriguez et al., 2017; Roy et al., 2018; Yuan and Yuk, 2019; Nazzaro et al., 2020), since the production of purple pigment violacein is directly linked to *quorum sensing* (Nazzaro et al., 2020). However, the antibiofilm mechanisms of these compounds much be investigated in details to evaluate how such compounds modulate the expression of genes that are involved in biofilm formation for example.

Mature biofilms can protect bacteria living inside against several adverse environmental influences and conditions. Antibiotics or disinfectants frequently fail to remove biofilms from biological or non-biological surfaces, which can represent a source for recurrent infections (Reichling, 2020). Biofilm bacteria often tolerate antibiotics at concentrations 10–10,000-fold greater than planktonic cells (Johnjulio et al., 2012; Nazzaro et al., 2020). For eradicating successfully mature biofilms, it is necessary that antimicrobials penetrate into the aqueous channels of biofilms (Reichling, 2020); OEO and their main components (CAR and Thy), despite being lipophilic volatile substances, eliminated at least 95% of preformed biofilm (24 h) by EAEC and KPC-producing *K. pneumoniae* in microtiter plate (Figure 3A). Preformed biofilms and planktonic cells (or biofilm under formation condition) of both bacterial strains showed similar susceptibility to oregano-derived compounds; for EAEC, SMIC<sub>≥95</sub> values were 2-fold greater against preestablished biofilm than planktonic cells; for carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, SMIC<sub>≥95</sub> values were the same for pre-established biofilm and its planktonic cells. In agreement with present data, Reichling (2020) and Yadav et al. (2015) highlight that several essential oils and individual oil compounds show similar MIC values for planktonic cells and its biofilm.

The bioAgNP also eliminated at least 95% of preformed biofilm by both tested strains. However, preformed biofilms were less susceptible to bioAgNP than their planktonic cells or biofilm at early stage of development (SMIC<sub>≥95</sub> values are shown in Table 3), in agreement with other studies which suggested that biofilm greater resistance might be partially attributed to nanoparticle aggregation and retarded silver ion and particle diffusion (Choi, 2009; Radzig et al., 2013; Pompilio et al., 2018; Guo et al., 2019). For EAEC 042, bioAgNP SMIC<sub>≥95</sub> was 32-fold higher against preformed biofilm than planktonic cells or biofilm under formation condition. For carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, bioAgNP SMIC<sub>≥95</sub> was 4-fold greater against pre-established biofilm than planktonic cells or biofilm under formation condition.

This present study also showed that preformed biofilm (24h) of *E. coli* is more tolerant to bioAgNP than *K. pneumoniae* preestablished biofilm, since bioAgNP SMIC<sub>≥95</sub> is higher for EAEC (Table 3). SEM micrographs of untreated biofilms (24h) of EAEC and *K. pneumoniae* (Figure 8) showed that *K. pneumoniae* presented more youthful biofilm, with lower cell density, little secreted EPS and less cell aggregation compared to EAEC. Glycocalyx and the EPS matrix of biofilms act as bidding sites and limit antimicrobial diffusion through the matrix, reducing drug access to sessile cells (Ikuma et al., 2015; Flemming et al., 2016). In addition, bioAgNP treatment may decrease EPS production in *K. pneumoniae* (Siddique et al., 2020), contributing to the greater sensitivity of this strain to bioAgNP.

OEO, CAR, and Thy at low concentrations have potential to prevent biofilm formation and eliminate preformed biofilm, which is in agreement with other studies with small differences (Amaral et al., 2015; Yadav et al., 2015; Walsh et al., 2019; Reichling, 2020). Unlike our data, some studies reported that planktonic bacterial cells are more sensitive to OEO, CAR, and Thy than their biofilms (Nostro et al., 2007; Walsh et al., 2019; Reichling, 2020); some researchers have found that Thy inhibited biofilm formation by *E. coli* (Lee et al., 2008; Oh et al., 2017; Kerekes et al., 2019). Result variances among different studies may occur because oregano compounds derive from plants and undergo variations in their chemical composition, which dependent on climatic and geographical factors, and also extraction methods (Leyva-López et al., 2017; Gavahian et al., 2018; Nazzaro et al., 2020).

However, oregano terpenoids and silver nanometal exhibit features that may limit their applications as antimicrobials (Alvarez et al., 2014; Kotronia et al., 2017; Yuan and Yuk, 2019). OEO, CAR and Thy present high volatility and strong organoleptic features (Alvarez et al., 2014; Kotronia et al., 2017), and bacteria easily develop resistance to AgNP (Losasso et al., 2014; Graves et al., 2015; Panáček et al., 2018; Muller, 2018). Thus, in order to solve these problems and expand the possibilities for these compounds' applications, our research group proposes the association between oregano-derivatives and bioAgNP. Combinatory antimicrobial therapy is potent strategy to control antimicrobial resistance, to extend antimicrobial agents life, and also to reduce unwanted characteristics of compounds such as organoleptic features, toxicity, or costs (Yap et al., 2014; Suzuki et al., 2017; Raymond, 2019; Tyers and Wright, 2019).

Other studies have shown that bioAgNP present antimicrobial synergistic or additive effect when combined with different compounds, including essential oils or their main constituents (Cardozo et al., 2013; Kora and Rastogi, 2013; Biasi-garbin et al., 2015; Otaguiri et al., 2016; Scandorieiro et al., 2016; Longhi et al., 2016; Andrade et al., 2017; Bankier et al., 2019; Vazquez-MuñozID et al., 2019; Bocate et al., 2019; Dehkordi et al., 2019; Figueiredo et al., 2019; Meroni et al., 2020). Oregano-derived compounds also show antimicrobial synergistic or additive effect when in combinations (Hamoud et al., 2014; Langeveld et al., 2014; Yap et al., 2014; Magi et al., 2015; Cho et al., 2020; Xiao et al., 2020). In previous study, our research group reported the synergistic and additive antibacterial interaction of oregano-derivatives and bioAgNP (produced with *F. oxysporum*) against planktonic cells, including multidrug-resistant strains (Scandorieiro et al., 2016, 2020). This study shows, by the first time, the effect of four double-compound combinations, composed of oregano-terpenoids and bioAgNP, against bacteria living in biofilms.

All four combinations (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, Thy plus bioAgNP, and CAR plus Thy) inhibited the growth of biofilm at early stage (from 0 to 24h of biofilm growth) and at maturation phase (from 24h to 48 h) by EAEC and carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, in agreement with literature data which show antimicrobial potential of oregano-derived terpenoids and bioAgNP, both individually combined with conventional antimicrobials or natural compounds, to combat microbial biofilm (Pérez-Conesa et al., 2006; Longhi et al., 2016; Otaguiri et al., 2016; Nazzaro et al., 2020). In this present study, none of four combinations showed antagonistic interaction with regard to antibiofilm activity, since they were more efficient than antimicrobials individually by reducing  $SMIC_{\geq 95}$  of each compound (Table 3) or decreasing by greater intensity the biofilm biomass production and its viability in cases that  $SMIC_{\geq 95}$  reduction did not happen (Tables 4 and 5).

For EAEC 042, the combination containing Thy plus bioAgNP reduced  $SMIC_{\geq 95}$  to prevent biofilm formation and also to eradicate at least 95% of its preformed biofilm. Two

combinations (OEO plus bioAgNP and CAR plus bioAgNP) reduced  $SMIC_{\geq 95}$  to eradicate at least 95% of EAEC preformed biofilm; although both combinations did not reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of compounds against EAEC biofilm formation, combined compound still showed higher effect than isolated antimicrobials to prevent biofilm formation, since they caused significantly greater reduction in biofilm biomass and metabolic activity compared to antibacterials alone at same concentrations. CAR plus Thy reduced  $SMIC_{\geq 95}$  to prevent *E. coli* biofilm formation; both compounds in combination also showed improved effect against preformed biofilm, compared to antibacterials alone, by reducing its viability in greater intensity. For KPC-producing *K. pneumoniae*, three combinations (OEO plus bioAgNP, CAR plus bioAgNP, and Thy plus bioAgNP) reduced  $SMIC_{\geq 95}$  to prevent biofilm formation; these compounds in combinations also showed higher effect to inhibit preformed biofilm growth, causing greater reduction in sessile cells viability than compounds alone. Despite association containing CAR and Thy did not cause reduction in  $SMIC_{\geq 95}$  to prevent or eradicate *K. pneumoniae* preformed biofilm, both compounds in combination presented higher effect than CAR and Thy alone, causing greater reduction in biofilm biomass production and its viability. In general,  $SMIC_{\geq 95}$  values reduce up to 50% for OEO, 50% for CAR, from 50 to 75% for Thy, and 50-87.5% for bioAgNP, in agreement with previous study in which MIC reduction of both OEO and bioAgNP ranged by 50-87.5% against planktonic bacterial cells (Scandorieiro et al., 2016). Other studies also reported that CAR and Thy combined with other compounds, such as eugenol or conventional antibacterial (ex. ciprofloxacin), present synergistic effect to prevent and eradicate bacterial biofilms, including resistant strains (Yadav et al., 2015; Mohamed et al., 2018

Otaguiri et al. (2016) showed that same bioAgNP (produced extracellularly with *F. oxysporum*) in combination with copaiba essential oil present synergistic effect against *Streptococcus agalactiae* biofilm formation, reducing SMIC values of both compounds at least by 75%. These bioAgNP also showed antibiofilm effect when combined to conventional antimicrobial, Longhi et al. (2016) reported that its combination with fluconazole caused a significant decrease in viability of both initial and mature biofilm of *Candida albicans*. Biogenic nanoparticles are eco-friendly and less toxic than chemically synthesized nanoparticles because chemical reagents are not used as reducing or stabilizing agents (Lima et al., 2012); furthermore, *F. oxysporum*-bioAgNP are stable for several months due to protein capping, which occurs in the biogenic process, as seen by electron microscopy (Marcato et al., 2012).

All combinations prevent biofilm formation by both EAEC and KPC-producing *K. pneumoniae* at subinhibitory concentrations for planktonic cells (Figures 2B and 2D), suggesting that such treatments have effect on specific pathways of biofilm lifestyle, since they reduced total biofilm biomass and its metabolic activity compared to untreated bacterium. As mentioned before, Thy and bioAgNP alone do not inhibit EAEC (Figure 2A) and *K. pneumoniae* (Figure 2C) biofilm formation respectively, but the two compounds in association showed improved antibiofilm activity, since they prevent biofilm formation by both bacteria (without inhibiting growth of planktonic cells) (Figures 2B and 2D). As seen in Table 4, in case of EAEC, CAR plus Thy prevents biofilm formation by 61% (biomass reduction), while antimicrobials alone at same concentrations only reduce biomass production by 14.21% (bioAgNP) or even do not prevent biofilm (Thy). In case of *K. pneumoniae*, CAR plus bioAgNP prevents biofilm by 59.19%, while antimicrobials alone do not reduce biomass production (bioAgNP) or cause reduction of 15.34% (CAR). At subinhibitory concentrations, for both strains, Thy plus bioAgNP showed similar rate inhibition to one of the compounds alone (Table 4), but as seen in Table 3, this combination reduce the concentration of both compounds that are need to eliminate at least 95% of biofilm formation; same situation happens with regard to OEO plus bioAgNP against *K. pneumoniae* biofilm formation.

SEM assay showed that compounds individually (Figures 4B-E, 5B-E and 6B-E), mainly Thy and bioAgNP, act against preformed EAEC biofilm on glass slides, by affecting biofilm structure which presented reduced total biomass (extensively decreased cell density, less dense matrix and less intercellular networks, with smaller and more scattered cellular aggregates) and its cells surface exhibited alterations. Both Thy and bioAgNP-treated-biofilms presented cells with irregular wrinkled surface; Thy also caused sinking of bacterial cell and bioAgNP-treated cells also showed smaller size than typical *E. coli*. Although crystal violet assay showed that OEO and CAR (both alone at SMIC) have eradicated EAEC biofilm (data not show), SEM analysis showed that both compounds at  $0.5 \times$  SMIC affected EAEC biofilm to a lesser extent compared to other individual treatments. OEO-treated sample presented slightly reduced biomass density and bacterial aggregation, whose cells exhibited sunken and irregular wrinkled surface. CAR-treated sample showed biofilm with extremely poor intercellular networks, high cellular density, and cells without remarkable morphological alterations. Kerekes et al. (2019) reported that Thy exhibited the best effect against *E. coli* biofilm among several essential oils, resulting in biofilm with anamorph structure, sparse micro-colonies and individual cells (no aggregates), in agreement with our data. Guo et al. (2019) reported the action of nanosilver against *P. aeruginosa* biofilm, which exhibited cellular density reduction, distinct EPS-matrix formation surrounding bacterial cells with disruption of cellular membrane.

Scanning microscopy test showed that two combinations (CAR plus bioAgNP and Thy plus bioAgNP) stand out by inhibiting preformed EAEC biofilm growth on glass slides (Figures 4F-I, 5 F-I and 6 F-I). CAR plus bioAgNP and Thy plus bioAgNP samples present damaged biofilm, with less dense biomass, matrix architecture with disrupted organization, huge decrease in cell density, smaller cellular aggregates which shows loss of cell connections, and morphological cells alterations such as reduced size and irregular wrinkled surface compared to untreated control. OEO plus bioAgNP-treated sample shows less dense biofilm, with slightly less cellular density, less cells connections and bacterial aggregation, and altered cells with irregular wrinkled surface. CAR plus Thy-treated sample shows biofilm with high cellular density, without remarkable morphological alterations, but this treatment reduced intercellular networks. The cellular morphological alterations observed by us, such as irregular wrinkled surface and sinking of cellular surface, suggest that oregano derivatives and bioAgNP also affect sessile cells by disrupting cytoplasmic membrane and cell wall, resulting in leakage of cellular cytoplasmic material in agreement with previous studies that involve planktonic cells (Li et al., 2010; Marslin et al., 2015; Scandorieiro et al., 2016; García-Salinas et al., 2018; Figueiredo et al., 2019).

In conclusion, all four combinations improved the antibiofilm effect of isolated antimicrobials; they prevented biofilm formation and inhibit growth of preformed biofilm of both EAEC 042 e KPC-producing *K. pneumoniae* strains. We highlight the great antibiofilm effect of two combinations, CAR plus bioAgNP and Thy plus bioAgNP, which inhibited growth of biofilm on both polystyrene and glass surfaces, by reducing its biomass density and metabolic activity, disrupting its three-dimensional structure and altering its cell morphology. Despite Thy plus bioAgNP (at subinhibitory concentrations for planktonic cells) do not extensively reduce biofilm formation, it is the most efficient combination to reduce  $SMIC_{\geq 95}$  of antimicrobials; even in case which SMIC was not reduced (*K. pneumoniae* preformed biofilm), Thy plus bioAgNP showed higher effect compared to antibacterials individually. As shown in Figure 7, Thy and bioAgNP has potential to be applied as *quorum sensing* inhibitor for controlling bacterial infections, since this combination affected violacein production by *C. violaceum*.

Next, more detailed examination of antibiofilm activity must be performed, to provide

information of combinations with regard to mechanism of action (at molecular level) and their functionalities *in vivo* and in non-laboratory situations. However, terpenoids derived from oregano, mainly CAR and Thy, associated with bioAgNP (synthesized with *F. oxysporum*) successfully combat biofilm-associated bacteria and may overcome existing antibiotic resistance, then they have potential to be applied in several sector of industry, clinical and hospital settings, such as formulation of surface cleaners, food packaging, cosmetic products, wound care supplies, for treating infection in burns, among others.

## 5 Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found in page 300 (*Anexo D*).

## 6 References

- Abdullahi, U. F., Igwenagu, E., Mu'azu, A., Aliyu, S., and Umar, M. I. (2016). Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Vet. World.* 9:1, 12–18. doi:10.14202/vetworld.2016.12-18.
- Ahmed, A., Azim, A., Gurjar, M., and Baronia, A. K. (2014). Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients. *Indian J. Crit. CARE Med.* 18:5, 310–314. doi:10.4103/0972-5229.132495.
- Alav, I., Sutton, J. M., and Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.*,73:8, 1–18. doi:10.1093/jac/dky042.
- Alexander, J. W. (2009). History of the medical use of silver. *Surg. Infect.* 10:3, 289–292. doi:10.1089/sur.2008.9941.
- Ali, S. G., Ansari, M. A., Sajid Jamal, Q. M., Khan, H. M., Jalal, M., Ahmad, H., et al. (2017). Antiquorum sensing activity of silver nanoparticles in *P. aeruginosa*: an in silico study. *Silico Pharmacol.* 5:1, 1–7. doi:10.1007/s40203-017-0031-3.
- Alvarez, M. V, Ortega-Ramirez, L. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., Bernal-Mercado, A. T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G., et al. (2014). Oregano essential oil-pectin edible films as anti- quorum sensing and food antimicrobial agents. *Front. Med.* 5, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2014.00699.
- Amaral, V. C. S., Santos, P. R., da Silva, A. F., dos Santos, A. R., Machinski, M., and Mikcha, J. M. G. (2015). Effect of Carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. biofilms on polypropylene. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 2639–2643. doi:10.1111/ijfs.12934.
- Andrade, P. F., Nakazato, G., and Durán, N. (2017). Additive interaction of carbon dots extracted from soluble coffee and biogenic silver nanoparticles against bacteria Additive interaction of carbon dots extracted from soluble coffee and biogenic silver nanoparticles against bacteria. *J. Phys. Conf. Ser.* 1–8. doi:10.1088/1742-6596/838/1/012028
- Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., and Pal, R. (2014). Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm of extended spectrum  $\beta$ -lactamase isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Nanosci.* 4, 859–868. doi:10.1007/s13204-013-0266-1.
- Arafa, W. M., Abolhadid, S. M., Moawad, A., Abdelaty, A. S., Moawad, U. K., Shokier, K. A.

- M., et al. (2020). Thymol efficacy against coccidiosis in pigeon (*Columba livia domestica*). *Prev. Vet. Med.* 176. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.104914.
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Costa, A. R., Desvaux, M., et al. (2017). Critical Reviews in Microbiology Critical review on biofilm methods. 313–351doi:10.1080/1040841X.2016.1208146.
- Balcázar, J. L., Subirats, J., and Borrego, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.01216.
- Bankier, C., Matharu, R. K., Cheong, Y. K., Ren, G. G., Cl, E., and Ciric, L. (2019). Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Sci. Rep.* 9. 16074 , doi:10.1038/s41598-019-52473-2.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., Basílio Júnior, I. D., et al. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT - Food Sci. Technol.* 42:6, 1139–1143. doi:10.1016/j.lwt.2009.01.010.
- Baugh, S., Phillips, C. R., Ekanayaka, A. S., Piddock, L. J. V., and Webber, M. A. (2014). Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:3, 673–681. doi:10.1093/jac/dkt420.
- Biasi-Garbin, R. P., Otaguiri, E. S., Morey, A. T., Fernandes, M., Elisa, A., Morguette, B., et al. (2015). Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* Silver Nanoparticles. 2015: 861497. doi.org/10.1155/2015/861497.
- Blosser, R. S., and Gray, K. M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Methods.* 40:1, 47–55. doi:10.1016/S0167-7012(99)00136-0.
- Bocate, K. P., Reis, G. F., de Souza, P. C., Souza, D., Oliveira, A. G., Durán, N., et al. (2019). Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *Int. J. Food Microbiol.* 291, 79–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.012.
- Bollenbach, T. (2015). Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 27, 1–9. doi:10.1016/j.mib.2015.05.008.
- Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., Woertman, J., and Veldhuizen, E. J. A. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One.* 9, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0093414.
- Caballero, N. E. D., Alves, O. L., Esposito, E., and Souza, G. I. M., Gaspari, P. D. M. (2006). Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e no tratamento dos efluentes produzidos. Braz. Patent PI0605681-4A. Campinas : BR. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).
- Cady, N. C., McKean, K. A., Behnke, J., Kubec, R., Mosier, A. P., Kasper, S. H., et al. (2012). Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa*

- by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS One*. 7:6. doi:10.1371/journal.pone.0038492.
- Calderón-Jiménez, B., Johnson, M. E., Bustos, A. R. M., Murphy, K. E., Winchester, M. R., and Baudrit, J. R. V. (2017). Silver Nanoparticles : Technological Advances , Societal Impacts, and Metrological Challenges. *Front. Chem.* 5, 1–26. doi:10.3389/fchem.2017.00006.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira, W. D., et al. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12:12. doi:10.1186/1476-0711-12-12.
- CDC (2020). Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR) - About Antibiotic Resistance. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> [Accessed May, 2020].
- Chhibber, S., Gondil, V. S., Sharma, S., Kumar, M., Wangoo, N., and Sharma, R. K. (2017). A novel approach for combating *Klebsiella pneumoniae* biofilm using histidine functionalized silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* 8:1104, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.01104.
- Cho, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., and Ryu, J. (2020). Synergistic activities of gaseous oregano and thyme thymol essential oils against *Listeria monocytogenes* on surfaces of a laboratory medium and radish sprouts. *Food Microbiol.* 86: 103357. doi:10.1016/j.fm.2019.103357.
- Choi, J., Reipa, V., Hitchins, V. M., Goering, P. L., and Malinauskas, R. A. (2011). Physicochemical Characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 123:1, 133–143. doi:10.1093/toxsci/kfr149.
- Choi, O. (2009). Effect of silver nanoparticles on planktonic and biofilm cell growth. [dissertation/ PhD's thesis]. [Columbia-MO]: University of Missouri].
- CLSI (2015). M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. Available at: [https://clsi.org/media/1632/m07a10\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf) [Accessed , 2016].
- De La Fuente-Núñez, C., Korolik, V., Bains, M., Nguyen, U., Breidenstein, E. B. M., Horsman, S., et al. (2012). Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2696–2704. doi:10.1128/AAC.00064-12.
- Dehkordi, N. H., Tajik, H., Moradi, M., Kousheh, S. A., and Molaei, R. (2019). Antibacterial Interactions of Colloid Nanosilver with Eugenol and Food Ingredients. *J. of Food Prot.* 82:10, 1783–1792. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-17
- Diggikar, R. S., Patil, R. H., Kale, S. B., Thombre, D. K., Gade, W. N., Kulkarni, M. V., et al. (2013). Silver-decorated orthorhombic nanotubes of lithium vanadium oxide: An impeder of bacterial growth and biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:18, 8283–8290. doi:10.1007/s00253-013-5096-2.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., and Nakazato, G. (2016a). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity.

*Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12:3, 789–799.  
doi:10.1016/j.nano.2015.11.016.

- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., Souza, G. I. H., and Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology*. 3:8. doi:10.1186/1477-3155-3-8.
- Durán, N., Nakazato, G., and Seabra, A. B. (2016b). Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:15, 6555–6570. doi:10.1007/s00253-016-7657-7.
- Ebani, V. V., Bertelloni, F., Najar, B., Nardoni, S., Pistelli, L., and Mancianti, F. (2020). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* Strains Isolated from Canine Dermatitis. *Microorganisms*. 8:252, 1–16. doi:10.3390/microorganisms8020252
- Ebrahiminezhad, A., Raei, M. J., Manafi, Z., Jahromi, A. S., and Ghasemi, Y. (2016). Ancient and Novel Forms of Silver in Medicine and Biomedicine. *J. Adv. Med. Sci. Appl. Technol.* 2:1, 122–128. doi: 10.18869/NRIP.JAMSAT.2.1.122
- Erlandsen, S. L., Kristich, C. J., Dunny, G. M., and Wells, C. L. (2004). High-resolution visualization of the microbial glycocalyx with low-voltage scanning electron microscopy: Dependence on cationic dyes. *J. Histochem. Cytochem.* 52:11, 1427–1435. doi:10.1369/jhc.4A6428.2004.
- FDA (2019). Generally recognized as safe (GRAS). Available at: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras> [Accessed May, 2020].
- Figueiredo, E. P., Ribeiro, J. M., Nishio, E. K., Scandorieiro, S., Costa, A. F., Cardoso, V. F., et al. (2019). New Approach For Simvastatin As An Antibacterial: Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. of Nanomedicine*. 14, 7975–7985. doi: 10.2147/IJN.S211756. eCollection 2019.
- Fischbach, M. A. (2011). Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:5, 519–523. doi:10.1016/j.mib.2011.08.003.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14:9, 563–575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., and Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* 9, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2018.00898.
- García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., and Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiol.* 59, 124–132. doi:10.1016/j.fm.2016.06.001.
- García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G., and Irusta, S. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural

- origin present in essential oils. *Molecules*. 23:6, 1–18. doi:10.3390/molecules23061399.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., and Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* 18:9, 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- Gavahian, M., Chu, Y., Lorenzo, J. M., Mousavi, A., and Barba, F. J. (2018). Essential oils as natural preservatives for bakery products : Understanding the mechanisms of action, recent findings, and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 310–321. doi:10.1080/10408398.2018.1525601.
- Graves, J. L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S. H., et al. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* 5, 1–13. doi:10.3389/fgene.2015.00042.
- Grigore-Gurgu, L., Bucur, F. I., Borda, D., Alexa, E.-A., Neagu, C., and Nicolau, A. I. (2016). Biofilms Formed by Pathogens in Food and Food Processing Environments. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353.
- Guo, J., Qin, S., Wei, Y., Liu, S., Peng, H., Li, Q., et al. (2019). Silver nanoparticles exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture. *Cell Prolif.* 52, 1–8. doi:10.1111/cpr.12616.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. (2016a). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch. Microbiol.* 198:1, 1–15. doi:10.1007/s00203-015-1148-6.
- Gupta, S., Laskar, N., and Kadouri, D. E. (2016b). Evaluating the Effect of Oxygen Concentrations on Antibiotic Sensitivity, Growth, and Biofilm Formation of Human Pathogens. 9, 37–46. doi:10.4137/MBI.S40767.
- Hamoud, R., Zimmermann, S., Reichling, J., and Wink, M. (2014). Phytomedicine Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol , EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. *Eur. J. Integr. Med.* 21:4, 443–447. doi:10.1016/j.phymed.2013.10.016.
- Haney, E. F., Trimble, M. J., Cheng, J. T., Vallé, Q., and Hancock, R. E. W. (2018). Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules*. 8:2, 1–22. doi:10.3390/biom8020029.
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J. Med. Microbiol.* 59:1, 1–7. doi:10.1099/jmm.0.015420-0.
- Hassan, A., Agmed, A. H., and Mounam, M. (2020). The Effect of Oak, Cinnamon, Oregano and Thyme Extracts on Biofilm producing ESBL *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Pharma Sci.* 7:5, 1839–1847.
- Ikuma, K., Decho, A. W., and Lau, B. L. T. (2015). When nanoparticles meet biofilms - Interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Front. Microbiol.* 6, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2015.00591.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., et al. (2018). Bacterial

- biofilm and associated infections. *J. Chinese Med. Assoc.* 81:1, 7–11. doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- Johnjulio, W., Fuge, L. H., Kad, M., and Post, C. (2012). Introduction to biofilms in family medicine. *South. Med. J.* 105:1, 24–29. doi:10.1097/SMJ.0b013e31823c3ee4.
- Jones, K., and Bradshaw, S. B. (1996). Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: a comparison between. *Soc. Appl. Bacteriol.* 80:4, 458–464. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03243.x.
- Kanjee, U., and Houry, W. A. (2013). Mechanisms of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 65–81. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155708.
- Kapoor, G., Saigal, S., and Elongavan, A. (2018). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 33:3, 300–305. doi: 10.4103/joacp.JOACP\_349\_15
- Karam, L., Roustom, R., Abiad, M. G., El-Obeid, T., and Savvaidis, I. N. (2019). Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 291, 42–47. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.008.
- Kerekes, E. B., Vidács, A., Takó, M., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., Horváth, G., et al. (2019). Anti-biofilm effect of selected essential oils and main components on mono- and polymicrobial bacterial cultures. *Microorganisms* 7:9. doi:10.3390/microorganisms7090345.
- Kobayashi, R. K. T., Nishio, E. K.; Scandorieiro, S., Saikawa, G. I. A., da Rocha, S. P. D., and Nakazato, G. (2019). “Metallic nanoparticles as a potential antimicrobial for catheters and prostheses,” in *Materials for Biomedical Engineering*, 153–196.
- Kora, A. J., and Rastogi, L. (2013). Enhancement of Antibacterial Activity of Capped Silver Nanoparticles in Combination with Antibiotics, on Model Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013: 871097. doi: 10.1155/2013/871097.
- Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., and Detsi, A. (2017). Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. *Bioeng. Artic.* 4:74, 1–15. doi:10.3390/bioengineering4030074.
- Kozics, K., Bucková, M., Puškárová, A., Kalászová, V., Cabicarová, T., and Domenico, P. (2019). The Effect of Ten Essential Oils on Several Cutaneous Drug-Resistant Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. *Molecules.* 24: 4570, 1–15. doi:10.3390/molecules24244570.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. 40:1, 76–94. doi:10.3109/1040841X.2013.763219.
- Laothaweerungsawat, N., Neimkhum, W., Anuchapreeda, S., Sirithunyalug, J., and Chaiyana, W. (2020a). Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *Int. J. Pharm.* 579. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119052.
- Laothaweerungsawat, N., Sirithunyalug, J., and Chaiyana, W. (2020b). Chemical Compositions

- and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from Tropical and Mediterranean Region. *Molecules*. 25:5, 1–15. doi: 10.3390/molecules25051101.
- Lee, J.-H., Kim, Y.-G., and Lee, J. (2008). Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. 38:1, 42–49. doi:10.1111/ijlh.12426.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., and Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Publ. Gr.* 11, 371–384. doi:10.1038/nrmicro3028.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., and Heredia, J. B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 22: 989, 1–24. doi:10.3390/molecules22060989.
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., and Chen, Y. Ben (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1115–1122. doi:10.1007/s00253-009-2159-5.
- Lima, A. K. O., Vasconcelos, A. A., Sousa Júnior, J. J. V., Escher, S. K. S., Nakazato, G., and Taube Júnior, P. S. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Amazon Fruits. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* 15:3, 179–188.
- Lima, R. De, Seabra, B., and Durán, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. 32:11, 867–879. doi:10.1002/jat.2780.
- Longhi, C., Santos, J. P., Morey, A. T., Marcato, P. D., Durán, N., Pinge-Filho, P., et al. (2016). Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 54:4, 428–432. doi:10.1093/mmy/myv036.
- Losasso, C., Belluco, S., Cibin, V., Zavagnin, P., Micetic, I., Gallochio, F., et al. (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00227.
- Machado, L. F., Sanfelice, R. A., Bosqui, L. R., Assolini, J. P., Scandorieiro, S., Navarro, I. T., et al. (2019). Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. *Exp. Parasitol.* 211:107853. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107853.
- Magi, G., Marini, E., and Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.* 6, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2015.00165.
- Marcato, P. D., Nakazato, G., Brocchi, M., Melo, P. S., Huber, S. C., Ferreira, I. R., et al. (2012). Biogenic silver nanoparticles: Antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics. *J. Nano Res.* 20, 69–76. doi:10.4028/www.scientific.net/JNanoR.20.69.
- Marcato, P. D., Parizotto, N. V., Martinez, D. S. T., Paula, A. J., Ferreira, I. R., Melo, P. S., et al. (2013). New hybrid material based on layered double hydroxides and biogenic silver nanoparticles: Antimicrobial activity and cytotoxic effect. *J. Braz. Chem. Soc.* 24:2, 266–

272. doi:10.5935/0103-5053.20130034.

- Marslin, G., Selvakesavan, R. K., Franklin, G., Sarmiento, B., and Dias, A. C. P. (2015). Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. *Int. J. Nanomedicine*. 10, 5955–5963. doi:10.2147/IJN.S81271.
- Meroni, G., Filipe, J. F. S., and Martino, P. A. (2020). In Vitro Antibacterial Activity of Biological-Derived Silver Nanoparticles: Preliminary Data. *Vet. Sci.* 7:12, 1–12. doi:10.3390/vetsci7010012
- Meza-Villezcás, A., Gallego-Hernández, A. L., Yildiz, F. H., Jaime-Acuña, O. E., Raymond-Herrera, O., and Huerta-Saquero, A. (2019). Effect of antimicrobial nanocomposites on *Vibrio cholerae* lifestyles: Pellicle biofilm, planktonic and surface-attached biofilm. *PLoS One*. 14:6, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0217869.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K. S., and Welch, M. (2007). Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189:6, 2411–2416. doi:10.1128/JB.01687-06.
- Mir, M., Permana, A. D., Ahmed, N., Khan, G. M., Rehman, A., and Donnelly, R. F. (2020). Enhancement in Site-Specific Delivery of CARvacrol for Potential Treatment of Infected Wounds Using Infection Responsive Nanoparticles Loaded into Dissolving Microneedles: A Proof of Concept Study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 147, 57–68. doi:10.1016/j.ejpb.2019.12.008.
- Mirzaei, R., Mohammadzadeh, R., Alikhani, M. Y., Shokri Moghadam, M., Karampoor, S., Kazemi, S., et al. (2020). The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*. 72:7, 1271–1285. doi:10.1002/iub.2266.
- Mohamed, S. H., Mohamed, M. S. M., Khalil, M. S., Azmy, M., and Mabrouk, M. I. (2018). Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J. Appl. Microbiol.* 125:1, 84–95. doi:10.1111/jam.13755.
- Muller, M. (2018). Bacterial Silver Resistance Gained by Cooperative Interspecies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62:8. doi: 10.1128/AAC.00672-18.
- Naeem, A. (2018). Essential Oils: Brief Background and Uses. *Ann. Short Reports*. 1:2, 1006.
- Nakazato, G., Kobayashi, R. K., Seabra, A. B., and Durán, N. (2017). “Use of nanoparticles as a potential antimicrobial for food packaging,” in *Food Preservation*, 413–447.
- Nakazato, G., Lonni, A. A. S. G., Panagio, L. A., de Camargo, L. C., Gonçalves, M. C., REIS, G. F., et al. (2020). “Applications of Nanometals in Cutaneous Infections,” in *Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections*, 71–92.
- NCCLS (1999). Methods for Determinating Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved guideline. Available at: [https://clsi.org/media/1462/m26a\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf) [Accessed 2016].
- Nazzaro, F., Fratianni, F., D’Acierno, A., Coppola, R., Ayala-Zavala, F. J., Cruz, A. G., et al. (2020). *Essential Oils and Microbial Communication*.

doi:<http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

- Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., Khan, Z., and Ali, M. (2019). Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 24, 929–941. doi:10.1007/s00775-019-01717-7.
- Nostro, A., Marino, A., Blanco, A. R., Cellini, L., Di Giulio, M., Pizzimenti, F., et al. (2009). *In vitro* activity of carvacrol against Staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *J. Med. Microbiol.* 58:6, 791–797. doi:10.1099/jmm.0.009274-0.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., et al. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56:4, 519–523. doi:10.1099/jmm.0.46804-0.
- Nowack, B., Krug, H. F., and Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environ. Sci. Technol.* 45:4, 1177–1183. doi:10.1021/es2017895.
- O’Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Available at: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf) [Accessed 2016].
- Oh, S. Y., Yun, W., Lee, J. H., Lee, C. H., Kwak, W. K., and Cho, J. H. (2017). Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci. Technol.* 59:4, doi:10.1186/s40781-017-0127-7.
- Oliveira, D. M. P. De, Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., et al. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. 33:3, 1–49. doi:10.1128/CMR.00181-19.
- Otaguiri, E., Morguette, A., Biasi-Garbin, R., Morey, A., Lancheros, C., Kian, D., et al. (2016). Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18:2, 177–190. doi:10.2174/1389201017666161213151919.
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., et al. (2018). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* 13, 65–71 doi:10.1038/s41565-017-0013-y.
- Pérez-Conesa, D., McLandsborough, L., and Weiss, J. (2006). Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J. Food Prot.* 69:12, 2947–2954. doi:10.4315/0362-028X-69.12.2947.
- Pompilio, A., Geminiani, C., Bosco, D., Rana, R., Aceto, A., Bucciarelli, T., et al. (2018). Electrochemically synthesized silver nanoparticles are active against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* and other cystic fibrosis-associated bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 9:1349: 1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.01349.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.*

7:4, 493–512. doi:10.4155/fmc.15.6.

- Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A., and Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 102, 300–306. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.039.
- Raei, P., Poursak, T., Memar, M. Y., Alizadeh, N., Aghamali, M., Zeinalzadeh, E., et al. (2017). Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase-producing Gram negative bacilli. *Cell. Mol. Biol.* 63:5, 108–112. doi:10.14715/cmb/2017.63.5.20.
- Raymond, B. (2019). Five rules for resistance management in the antibiotic apocalypse, a road map for integrated microbial management. 1079–1091. doi:10.1111/eva.12808.
- Reichling, J. (2020). Anti-biofilm and Virulence Factor-Reducing Activities of Essential Oils and Oil Components as a Possible Option for Bacterial Infection Control. *Planta Med.* 86:8, 520–537 doi:10.1055/a-1147-4671.
- Ren, Y., Wang, C., Chen, Z., Allan, E., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (2018). Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: Substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiol. Rev.* 42:3, 259–272. doi:10.1093/femsre/fuy001.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., et al. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433> [Accessed 2016]
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., and Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9:1, 522–554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372.
- Saleem, S., Ahmed, B., Khan, M. S., Al-Shaeri, M., and Musarrat, J. (2017). Inhibition of growth and biofilm formation of clinical bacterial isolates by NiO nanoparticles synthesized from *Eucalyptus globulus* plants. *Microb. Pathog.* 111, 375–387. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.019.
- Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., et al. (2020). Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials*. 10:292, 1–39. doi: 10.3390/nano10020292.
- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A., and Wang, M.-H. (2020). Biocompatible fungal chitosan encapsulated phyto-genic silver nanoparticles enhanced antidiabetic, antioxidant and antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 153:63–71. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.291.
- Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A. C., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G., et al. (2016). Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.00760.
- Scandorieiro, S., Rodrigues, B. C. D., Nishio, E. K., Panagio, L. A., Oliveira, A. G., Durán, N.

- et al. (2020). Antibacterial combinations composed of oregano derivatives and biogenic silver nanoparticles: effect against multidrug-resistant strains and mechanism of action against *Escherichia coli*. Não publicado.
- Shafreen, R. B., Seema, S., Ahamed, A. P., Thajuddin, N., and Ali Alharbi, S. (2017). Inhibitory Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles from Extract of *Nitzschia palea* Against Curli-Mediated Biofilm of *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183:4, 1351–1361. doi:10.1007/s12010-017-2503-7.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., et al. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* 121:2, 309–319. doi:10.1111/jam.13078.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall’Agnol, M., Phillips, A. D., and Nataro, J. P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41:5, 983–997. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x.
- Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., et al. (2020). Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res. Int.* 2020: 6398165, 1–9. doi:10.1155/2020/6398165.
- Sim, J. X. F., Khazandi, M., Chan, W. Y., and Trott, D. J. (2019). Antimicrobial activity of thyme oil , oregano oil , thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Vet Dermatol.*10. doi:10.1111/vde.12794.
- Simbine, E. O., Rodrigues, C., Lapa-guimarães, J., Kamimura, E. S., Corassin, C. H., Augusto, C., et al. (2019). Application of silver nanoparticles in food packages : a review. *Food Sci. Technol.* 39:4, 793–802.
- Singh, A. K., Yadav, S., Chauhan, B. S., Nandy, N., Singh, R., Neogi, K., et al. (2019). Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00669.
- Singh, P., Pandit, S., Beshay, M., Mokkaapati, V. R. S. S., Garnaes, J., Olsson, M. E., et al. (2018). Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the *Rhodiola rosea* rhizome extracts. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46, S886–S899. doi:10.1080/21691401.2018.1518909.
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., and Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol. J.* 11:1, 53–62. doi:10.2174/1874285801711010053.
- Suzuki, É. Y., Soldati, P. P., Chaves, M. das G. A. M., and Nádia, R. (2015). Essential Oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: An Alternative Against Microorganisms Responsible for Bad Perspiration Odor. *J. Young Pharm.* 7:1, 12–20. doi:10.5530/jyp.2015.1.4.
- Suzuki, S., Horinouchi, T., and Furusawa, C. (2017). Acceleration and suppression of resistance development by antibiotic combinations. *BMC Genomics.*18:328, 1–10. doi:10.1186/s12864-017-3718-2.
- Tahmasebi, P., Meysam, S., Froushani, A., and Ahangaran, N. A. (2019). Thymol has beneficial

- effects on the experimental model of ulcerative colitis. *Avicenna J. Phytomedicine*. 9:6, 538–550. doi:10.22038/AJP.2019.13383.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., and Ayala-Zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential *quorum sensing* inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*. 75, 255–261. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.014.
- Traub, W. H., and Kleber, I. (1975). In Vitro Additive Effect of Polymixin B and Rifampin against *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:6, 874–876. doi:10.1128/aac.7.6.874.
- Tyers, M., and Wright, G. D. (2019). Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat. Rev. Microbiol.* 17:3, 141–155. doi:10.1038/s41579-018-0141-x.
- Urzedo, A. L., Gonçalves, M. C., Nascimento, M. H., Lombello, C. B., Nakazato, G., and Seabra, A. B. (2020). Cytotoxicity and antibacterial activity of alginate hydrogel containing nitric oxide donor and silver nanoparticles for topical applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6:4, 2117–2134. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01685.
- Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, G. J., Soria-Castro, E., Juárez-Moreno, K., Gallego-Hernandez, A. L., et al. (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One*, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0224904.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., and Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*. 9:2. doi:10.3390/antibiotics9020059.
- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J. P., Sarantuya, J. A. V, Iwashita, M., et al. (2004). Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:5, 687–690.
- Walsh, D. J., Livinghouse, T., Goeres, D. M., Mettler, M., and Stewart, P. S. (2019). Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Front. Chem.* 7:653, 1–13. doi:10.3389/fchem.2019.00653.
- WHO (2020a). Food safety. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> [Accessed May, 2020].
- WHO (2020b). Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. Available at: <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> [Accessed May, 2020].
- Wijesundara, N. M., and Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microb. Pathog.* 117:118–127. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.026.
- Williams, D. L., Smith, S. R., Peterson, B. R., Allyn, G., Cadenas, L., Epperson, R. T., et al. (2019). Growth substrate may influence biofilm susceptibility to antibiotics. *PLoS One*. 14:3, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0206774.

- Wood, T. K. (2009). Insights on *Escherichia coli* Biofilm Formation and Inhibition from Whole-Transcriptome Profiling. *Env. Microbiol.* 11:1, 1–15. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01768.x.
- Xiao, S., Cui, P., Shi, W., and Zhang, Y. (2020). Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement. Med. Ther.* 1–10. doi: <https://doi.org/10.1101/727883>.
- Yadav, M. K., Chae, S. W., Im, G. J., Chung, J. W., and Song, J. J. (2015). Eugenol: A phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PLoS One.* 10:3, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0119564.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., and Lim, S. H. E. (2014). Essential Oils , A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol. J.* 8, 6–14. doi: 10.2174/1874285801408010006.
- Yu, L., Shang, F., Chen, X., Ni, J., Yu, L., Zhang, M., et al. (2018). The anti-biofilm effect of silver nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis. *PeerJ* . doi:10.7717/peerj.5711.
- Yuan, W., and Yuk, H.-G. (2019). Effects of Sublethal Thymol, Carvacrol, and trans-Cinnamaldehyde Adaptation on Virulence Properties of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 1–11. doi: 10.1128/AEM.00271-19.

## 7 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 8 Authors Contributions

SS, conception and drafting of the study, design and planning of experiments, carrying out experiments, data acquisition, analysis and interpretation, writing of this article.

LA, assistance and guidance in BioAgNP biosynthesis, mainly with fungal growth conditions.

AG, assistance and guidance in electron microscopy assays.

ND, conception of bioAgNP biosynthesis methodology, nanoparticles characterization.

GN, assistance and guidance in bioAgNP biosynthesis, data analysis and interpretation, critical review of the article.

R, conception and advisor of this study, data analysis and interpretation, critical review of the article, final approval of the version to be published.

## 9 Acknowledgments

This study was supported by Postgraduate Program in Microbiology of *Universidade Estadual de Londrina*. Sara Scandorieiro was funded by a PhD scholarship from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES). The authors thank Laboratory of

Electron Microscopy and Microanalysis, Laboratory of Molecular Pathology, Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, Laboratory of Microbial Ecology (*Universidade Estadual de Londrina*), Laboratory of Transmission Electron Microscopy (*Universidade Estadual de Maringá*), and Laboratory of Natural Sciences and Health (*Instituto Federal do Paraná*, Londrina). We also thank Franciele Maira Moreira Batista Tomaz for providing the KPC-producing *K. pneumoniae* strain which was used in this study, and Thiago Fernandes for his help with preparing biofilm samples for microscopy.

## TABLES

**Table 1** – Effect of oregano-derivatives and bioAgNP individually on Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and *Klebsiella pneumoniae* (KPC) biofilms growth in microtiter plates, which were evaluated under inhibition condition.

EAEC		KPC		EAEC		KPC		EAEC		KPC		EAEC		KPC					
OEO mg/ml	CV	MTT	CV	MTT	CAR mg/ml	CV	MTT	CV	MTT	Thy mg/ml	CV	MTT	CV	MTT	bio AgNP $\mu$ M	CV	MTT	CV	MTT
9.5	-	-	-	-	9.76	-	-	-	-	2	-	-	-	-	46.25	NT	NT	-	-
4.75	-	-	-	-	4.88	-	-	-	-	1	-	-	-	-	23.13	NT	NT	-	-
2.38	-	-	-	-	2.44	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	11.56	-	-	-	-
1.19	-	-	-	-	1.22	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	5.78	-	-	+	+
0.59	-	-	-	-	0.61	-	-	-	-	0.12	+	+	+	+	2.89	+	+	+	+
0.30	-	-	+	+	0.31	-	-	-	-	0.06	+	+	+	+	1.45	+	+	+	+
0.15	+	+	+	+	0.15	+	+	+	+	0.03	+	+	+	+	0.72	+	+	+	+
0.07	+	+	+	+	0.08	+	+	+	+	0.01	+	+	+	+	0.36	+	+	+	+
															0.18	+	+	NT	NT
															0.09	+	+	NT	NT

MTT, dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide assay to detect biofilm metabolic activity. CV, crystal violet-staining performed to measure total biofilm biomass.

OEO, Oregano essential oil. CAR, Carvacrol. Thy, Thymol. bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles.

- Indicates “no biofilm metabolic activity ( $p < 0.05$ )” and “at least 90% ( $p < 0.05$ ) of reduction in total biofilm biomass” detected after 24h of treatments.

+ Indicates “active biofilm metabolic activity” and “biofilm biomass production”.

NT indicates “concentration not tested”.

**Table 2** – Effect of oregano-derivatives and bioAgNP individually on Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and *Klebsiella pneumoniae* (KPC) biofilms growth in microtiter plates, which were evaluated under eradication of preformed biofilm condition by MTT assay.

OEO mg/ml	MTT		CAR mg/ml	MTT		Thy mg/ml	MTT		bio AgNP $\mu$ M	MTT	
	EAEC	KPC		EAEC	KPC		EAEC	KPC		EAEC	KPC
<b>9.5</b>	-	-	<b>9.76</b>	-	-	<b>2</b>	-	-	<b>740</b>	-	-
<b>4.75</b>	-	-	<b>4.88</b>	-	-	<b>1</b>	-	-	<b>370</b>	-	-
<b>2.38</b>	-	-	<b>2.44</b>	-	-	<b>0.5</b>	-	-	<b>185</b>	-	-
<b>1.19</b>	-	-	<b>1.22</b>	-	-	<b>0.25</b>	+	-	<b>92.50</b>	+	-
<b>0.59</b>	-	-	<b>0.61</b>	-	-	<b>0.12</b>	+	+	<b>46.25</b>	+	-
<b>0.30</b>	+	+	<b>0.31</b>	+	-	<b>0.06</b>	+	+	<b>23.13</b>	+	+
<b>0.15</b>	+	+	<b>0.15</b>	+	+	<b>0.03</b>	+	+	<b>11.56</b>	+	+
<b>0.07</b>	+	+	<b>0.08</b>	+	+	<b>0.01</b>	+	+	<b>5.78</b>	+	+

MTT, dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide assay to detect biofilm metabolic activity.

OEO, Oregano essential oil. CAR, Carvacrol. Thy, Thymol. bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles.

- Indicates “at least 95% ( $p < 0.05$ ) of reduction in metabolic activity of bacterial preformed biofilm” after 24h of treatments.

+ Indicates “active biofilm metabolic activity”.

**Table 3** – Sessile minimal inhibitory concentration ( $SMIC_{\geq 95}$ )<sup>(a)</sup> of oregano derivatives and bioAgNP (alone and in combination) against Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and KPC-producing *Klebsiella pneumonia* (KPC), under early formation stage and preformed biofilm conditions.

Antibacterial	EAEC 042 biofilm		KPC biofilm	
	Formation	Preformed	Formation	Preformed
<b>OEO<sup>(1)</sup> + bioAgNP<sup>(2)</sup></b>				
OEO (alone)	0.3*	0.59*	0.59*	0.59*
OEO (combined)	- (b)	0.3 * (c)	0.3 (c)	- (b)
bioAgNP (alone)	5.78*	185*	11.56*	46.25*
bioAgNP (combined)	- (b)	46.25* (d)	5.78 (c)	- (b)
<b>CAR<sup>(1)</sup> + bioAgNP<sup>(2)</sup></b>				
CAR (alone)	0.31*	0.61*	0.31*	0.31*
CAR (combined)	- (b)	0.3* (c)	0.15* (c)	- (b)
bioAgNP (alone)	5.78*	185*	11.56*	46.25*
bioAgNP (combined)	- (b)	46.25* (d)	5.78 (c)	- (b)
<b>Thy<sup>(1)</sup> + bioAgNP<sup>(2)</sup></b>				
Thy (alone)	0.25*	0.5*	0.25*	0.25*
Thy (combined)	0.12* (c)	0.12* (d)	0.12* (c)	- (b)
bioAgNP (alone)	5.78*	185*	11.56*	46.25*
bioAgNP (combined)	1.44 * (d)	23.12* (e)	5.78* (d)	- (b)
<b>CAR<sup>(1)</sup> + Thy<sup>(2)</sup></b>				
CAR (alone)	0.31*	0.61*	0.3*	0.3*
CAR (combined)	0.15* (c)	- (b)	- (b)	- (b)
Thy (alone)	0.25*	0.5*	0.25*	0.25*
Thy (combined)	0.12* (c)	- (b)	- (b)	- (b)

OEO, *Oregano essential oil*; CAR, *carvacrol*; Thy, *Thymol*; bioAgNP, *Biogenic silver nanoparticles*.

<sup>(1)</sup> Concentration is in mg/mL. <sup>(2)</sup> Concentration is in  $\mu$ M. -,  $SMIC_{\geq 95}$  for combination was not found. However, only concentrations which were  $\leq SMIC_{\geq 95}$  individually were tested in combinations.

<sup>(a)</sup> SMIC which resulted at least in 95% of reduction in metabolic activity of sessile cells during biofilm formation (after 24 h) or from 24h-preformed biofilm), using MTT assay. For biofilm formation, all  $SMIC_{\geq 95}$  cause 100% of reduction in biofilm viability. <sup>(b)</sup> Although  $SMIC_{\geq 95}$  for combination was not found, individual antimicrobials at  $0.5 \times SMIC$  or below caused less reduction than combination containing same concentrations; showing that combination has higher effect than individual treatments. <sup>(c)</sup>  $SMIC_{\geq 95}$  reduction was 50%. <sup>(d)</sup>  $SMIC_{\geq 95}$  reduction was 75%. <sup>(e)</sup>  $SMIC_{\geq 95}$  reduction was 87.5%. \*Antimicrobial concentration significantly reduced biofilm metabolic activity.

**Table 4** – Combinatory effect of oregano derivatives and bioAgNP compared to both antimicrobials individually against Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) biofilms growth in microtiter plates, which were evaluated under inhibition condition.

Antimicrobials	EAEC biofilm reduction (%)		Combinatory antibiofilm effect against EAEC <sup>(a)</sup>	KPC biofilm reduction (%)		Combinatory antibiofilm effect against KPC <sup>(a)</sup>
	Biomass	Metabolic activity		Biomass	Metabolic activity	
<b>Individually</b>						
OEO (0.30 mg/mL)	×	×	×	53.85	42.28	×
OEO (0.15 mg/mL)	39.68	2.95	×	43.08	33.35	×
OEO (0.07 mg/mL)	19.30	0	×	×	×	×
CAR (0.15 mg/mL)	59.75	2.04	×	23.20	24.10	×
CAR (0.08 mg/mL)	0	0	×	15.34	26.88	×
Thy (0.12 mg/mL)	0	0	×	19.96	6.28	×
Thy (0.06 mg/mL)	0	0	×	2.29	0	×
bioAgNP (5.78 μM)	×	×	×	0	0	×
bioAgNP (2.89 μM)	×	×	×	0	0	×
bioAgNP (1.44 μM)	65.92	27.05	×	×	×	×
bioAgNP (0.72 μM)	21.27	12.66	×	×	×	×
<b>Combinations</b>						
<b>OEO plus bioAgNP</b>						
0.15mg/mL+ 1.44 μM	88.16*	69.59*	Improved	×	×	×
0.07 mg/mL+ 0.72 μM	48.96*	6.45	Improved	×	×	×
0.30 mg/mL+ 5.78 μM	×	×	×	97.30*	99.06*	Improved
0.15 mg/mL+ 2.89 μM	×	×	×	53.77*	58.15*	Improved
<b>CAR plus bioAgNP</b>						
0.15 mg/mL+ 1.44 μM	83.85*	63.88*	Improved	×	×	×
0.08 mg/mL+ 0.72 μM	51.33*	8.84	Improved	×	×	×
0.15 mg/mL+ 5.78 μM	×	×	×	97.13*	99.84*	Improved
0.08 mg/mL+ 2.89 μM	×	×	×	59.19*	21.42	Improved
<b>Thy plus bioAgNP</b>						
0.12 mg/mL+ 1.44 μM	99.61*	98.42*	Improved	×	×	×
0.06 mg/mL+ 0.72 μM	22.43	8.84	Not improved	×	×	×
0.12 mg/mL+ 5.78 μM	×	×	×	99.79*	100*	Improved
0.06 mg/mL+ 2.89 μM	×	×	×	12.29	0	Not improved
<b>CAR plus Thy</b>						
0.15 mg/mL+ 0.12 mg/mL	99.82*	99.22*	Improved	33.94*	33.92*	Improved
0.08 mg/mL+ 0.06 mg/mL	61.99*	19.33*	Improved	18.81	7.92	Not improved

OEO, *Oregano essential oil*; CAR, *Carvacrol*; Thy, *Thymol*; bioAgNP, *Biogenic silver nanoparticles*. (a) Antibiofilm effect of combination compared to antimicrobials individually at same concentrations, which was defined as “improved” or “not improved”. “Improved” and “Not improved” mean that antimicrobials in combination exhibit greater and less or similar (respectively) antibiofilm activity compared to compounds individually at same concentrations. \* Indicates statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between combination and both individual antimicrobials at same concentration.

**Table 5** – Combinatory effect of oregano derivatives and bioAgNP compared to both antimicrobials individually against Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) biofilms growth in microtiter plates, which were evaluated under eradication of preformed biofilm condition.

Antimicrobials	EAEC biofilm reduction (metabolic activity reduction, %)	Combinatory antibiofilm effect against EAEC <sup>(a)</sup>	KPC biofilm reduction (metabolic activity reduction, %)	Combinatory antibiofilm effect against KPC <sup>(a)</sup>
<b>Individually</b>				
OEO (0.30 mg/mL)	19.01	×	38.90	×
OEO (0.15 mg/mL)	5.58	×	30.91	×
CAR (0.31 mg/mL)	11.77	×		×
CAR (0.15 mg/mL)	6.61	×	32.78	×
CAR (0.07 mg/mL)	×	×	33.92	×
Thy (0.25 <sup>a</sup>   0.12 <sup>b</sup> mg/mL)	12.62 <sup>a</sup>   0.79 <sup>b</sup>	×	×	×
Thy (0.06 <sup>c</sup>   0.03 <sup>d</sup> mg/mL)	×	×	14.88 <sup>c</sup>   10.23 <sup>d</sup>	×
bioAgNP (46.25 <sup>e</sup>   23.13 <sup>f</sup> μM)	70.02 <sup>e</sup>   27.88 <sup>f</sup>	×	×	×
bioAgNP (11.56 <sup>g</sup>   5.78 <sup>h</sup> μM)	×	×	55.24 <sup>g</sup>   0 <sup>h</sup>	×
<b>Combinations</b>				
<b>OEO plus bioAgNP</b>				
0.30 mg/mL + 46.25 μM	99.35*	Improved	×	×
0.15 mg/mL + 23.13 μM	40.77*	Improved	×	×
0.30 mg/mL + 11.56 μM	×	×	80.52*	Improved
0.15 mg/mL + 5.78 μM	×	×	45.68*	Improved
<b>CAR plus bioAgNP</b>				
0.31 mg/mL + 46.25 μM	99.79*	Improved	×	×
0.15 mg/mL + 23.13 μM	26.40	Not improved	×	×
0.15 mg/mL + 11.56 μM	×	×	65.88*	Improved
0.07 mg/mL + 5.78 μM	×	×	36.72	Not improved
<b>Thy plus bioAgNP</b>				
0.25 mg/mL + 46.25 μM	100*	Improved	×	×
0.12 mg/mL + 23.13 μM	98.19*	Improved	×	×
0.06 mg/mL + 11.56 μM	×	×	62.46*	Improved
0.03 mg/L + 5.78 μM	×	×	3.28	Not improved
<b>CAR plus Thy</b>				
0.31 mg/mL + 0.25 mg/mL	93.07*	Improved	×	×
0.15 mg/mL + 0.12 mg/mL	91.70*	Improved	×	×
0.15 mg/mL + 0.06 mg/mL	×	×	73.76*	Improved
0.08 mg/mL + 0.03 mg/mL	×	×	53.42*	Improved

OEO, *Oregano essential oil*; CAR, *Carvacrol*; Thy, *Thymol*; bioAgNP, *Biogenic silver nanoparticles*. <sup>(a)</sup> Antibiofilm effect of combination compared to antimicrobials individually at same concentrations, which was defined as “improved” or “not improved”. “Improved” and “Not improved” mean that antimicrobials in combination exhibit greater and less or similar (respectively) antibiofilm activity compared to compounds individually at same concentrations. \* Indicates statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between combination and both individual antimicrobials at same concentration. <sup>a, b, c, d, e, f, g, h</sup> Same letter Indicates percentage of reduced biofilm and corresponding treatments (antimicrobial concentrations).

**Table 6** – Viable cells number (log CFU/mL) of untreated (control) and treated-*Chromobacterium violaceum* with oregano-derived antibacterials and bioAgNP (individually and in combination).

Antibacterial-treated bacterial sample	Antibacterial concentrations	CFU/mL
OEO	0.07 mg/mL	9.39 ± 0.06
CAR	0.04 mg/mL	8.92 ± 0.12
Thy	0.06 mg/mL	9.26 ± 0.21
bioAgNP	23.13 µM	9.40 ± 0.04
Thy + bioAgNP	0.008 mg/mL + 2.89 µM	9.26 ± 0.04
Control	No antimicrobial	9.14 ± 0.16

± (standard deviation)

OEO, *Oregano essential oil*; CAR, *Carvacrol*; Thy, *Thymol*; bioAgNP, *Biogenic silver nanoparticles*.

## FIGURES CAPTIONS

**Figure 1. BioAgNP plasmonic band and morphology.** (A) UV-Vis spectra show that plasmon resonance of bioAgNP is centered at 420 nm, and this absorption peak is not observed for fungal-free solution (negative control). (B) MET micrograph of bioAgNP shows spherical nanoparticles.

**Figure 2. Effect of oregano-derived antibacterials and bioAgNP, individually and in combination, on biofilm growth of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* evaluated under inhibition condition.** The four graphics data are related to antibacterial subinhibitory concentrations for planktonic cells and represent the treatment of biofilms at early stage (from 0 to 24 h of biofilm growth). Total biofilm biomass and metabolic activity were measured using crystal violet-staining and MTT assay respectively, after 24 h- biofilm formation. Control indicates bacterial biofilm growth with no antimicrobial. (A) EAEC 042 exposed to OEO at 0.15 mg/mL, CAR at 0.15 mg/mL, Thy at 0.12 mg/mL, and bioAgNP at 1.44  $\mu$ M. (B) EAEC 042 exposed to four double-antibacterial combinations; OEO (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (1.44  $\mu$ M), CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (1.44  $\mu$ M), Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (0.72  $\mu$ M), and CAR (0.08 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL). (C) KPC-producing *K. pneumoniae* exposed to OEO at 0.03 mg/mL, CAR at 0.15 mg/mL, Thy at 0.12 mg/mL, and bioAgNP at 5.78  $\mu$ M. (D) KPC-producing *K. pneumoniae* exposed to four double-antibacterial combinations; OEO (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (2.89  $\mu$ M), CAR (0.08 mg/mL) plus bioAgNP (2.89  $\mu$ M), Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (2.89  $\mu$ M), and CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.12 mg/mL). Values of biomass and viable cells (%) are the mean  $\pm$  standard deviation. <sup>a-e</sup> Indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) among treatments; different letters indicate difference, and same letters indicate absence of difference.

**Figure 3. Effect of oregano-derived antibacterials and bioAgNP, individually and in combination, on biofilm growth of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* evaluated under eradication condition.** The two graphics data show the reduction that antimicrobials caused in metabolic activity of sessile cells from preformed biofilm (24h) after 24 h of treatment. Metabolic activity was measured using MTT assay after total 48 h-biofilm formation. (A) Both bacterial strains were treated with antibacterials individually as follows: EAEC 042 exposed to OEO at 0.59 mg/mL, CAR at 0.61 mg/mL, Thy at 0.5 mg/mL, and bioAgNP at 185  $\mu$ M; KPC-producing *K. pneumoniae* exposed to OEO at 0.59 mg/mL, CAR at 0.31 mg/mL, Thy at 0.25 mg/mL, and bioAgNP at 46.25  $\mu$ M. (B) Both bacterial strains were treated with double-antibacterial in combination as follows: EAEC 042 exposed to OEO (0.3 mg/mL) plus bioAgNP (46.25  $\mu$ M), CAR (0.31 mg/mL) plus bioAgNP (46.25  $\mu$ M), Thy (0.25 mg/mL) plus bioAgNP (46.25  $\mu$ M), and CAR (0.31 mg/mL) plus Thy (0.25 mg/mL); KPC-producing *K. pneumoniae* exposed to OEO (0.3 mg/mL) plus bioAgNP (11.56  $\mu$ M), CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (11.56  $\mu$ M), Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (11.56  $\mu$ M), and CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL). Values of viable cells (%) are the mean  $\pm$  standard deviation. \* Indicates statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatment and control.

**Figure 4. Low magnification scanning electron micrographs of antibiofilm effect of oregano-derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination against Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042), showing the amount of biofilm on glass surface seen as cell density and cell aggregates.** Preformed biofilms (24h) in glass slides were exposed for 24h to eight different treatments at subinhibitory concentrations. (A)

Untreated control (biofilm at maturation stage, 48h of growth). **(B)** OEO at 0.3 mg/mL. **(C)** CAR at 0.31 mg/mL. **(D)** Thy at 0.12 mg/mL. **(E)** bioAgNP at 46.25  $\mu$ M. **(F)** Combination of OEO (0.01 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(G)** Combination of CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(H)** Combination of Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(I)** Combination of CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL). Micrographs (A-I) show cell density and biofilm cell clusters (1,600 x). **Arrows:** cell aggregates.

**Figure 5. Scanning electron micrographs (magnification 10,000x) of antibiofilm effect of oregano-derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination against Enterococcal *Escherichia coli* (EAEC 042), showing biofilm structure.** Preformed biofilms (24h) in glass slides were exposed for 24h to eight different treatments at subinhibitory concentrations. **(A)** Untreated control (biofilm at maturation stage, 48h of growth). **(B)** OEO at 0.3 mg/mL. **(C)** CAR at 0.31 mg/mL. **(D)** Thy at 0.12 mg/mL. **(E)** bioAgNP at 46.25  $\mu$ M. **(F)** Combination of OEO (0.01 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(G)** Combination of CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(H)** Combination of Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(I)** Combination of CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL). Micrographs (A-I) show cell density and exopolysaccharide matrix of EAEC 042 in details, including unstructured matrix. **Arrows:** structured exopolysaccharide matrix with undamaged intercellular networks. **Arrowheads:** unstructured exopolysaccharide matrix with poor intercellular networks.

**Figure 6. Scanning electron micrographs (magnification 20,000x) of antibiofilm effect of oregano-derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination against Enterococcal *Escherichia coli* (EAEC 042), showing biofilm cellular alterations in details.** Preformed biofilms (24h) in glass slides were exposed for 24h to eight different treatments at subinhibitory concentrations. **(A)** Untreated control (biofilm at maturation stage, 48h of growth). **(B)** OEO at 0.3 mg/mL. **(C)** CAR at 0.31 mg/mL. **(D)** Thy at 0.12 mg/mL. **(E)** bioAgNP at 46.25  $\mu$ M. **(F)** Combination of OEO (0.01 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(G)** Combination of CAR (0.15 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(H)** Combination of Thy (0.06 mg/mL) plus bioAgNP (23.13  $\mu$ M). **(I)** Combination of CAR (0.15 mg/mL) plus Thy (0.06 mg/mL). Micrographs (A-I) show cell density, size and shape of EAEC 042, and morphological changes on cell surface. **Arrows:** sinking of bacterial cell wall. **Arrowheads:** wrinkled cell surface. **Asterisk:** cells with reduced size compared to untreated control.

**Figure 7. Effect of oregano-derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination on violacein production by *Chromobacterium violaceum*.** *C. violaceum* was exposed for 24h to five treatments at subinhibitory concentrations as follows: OEO at 0.07 mg/mL, CAR at 0.04 mg/mL, Thy at 0.06 mg/mL, bioAgNP at 23.13  $\mu$ M, and combination composed of Thy at 0.008 mg/mL and bioAgNP at 2.89  $\mu$ M. **(A)** It shows result of qualitative analysis of effect of antimicrobials on violacein production by *C. violaceum*. First tube of each pair is untreated control, which shows high production of violacein pigment after 24h of incubation at 28°C. Second tube of each pair is *C. violaceum* treated with antibacterials at subinhibitory concentrations for 24h as follows: **(a)** OEO-treated bacterial cells, **(b)** CAR-treated bacterial sample, **(c)** Thy-treated bacterial sample, **(d)** bioAgNP-treated bacterial cells, and **(e)** Bacterial cells treated with combination of Thy plus bioAgNP. Color intensity of violet indicates the amount of violacein pigment. **(B)** It shows quantitative analysis of amount of violacein produced by *C. violaceum* treated with antimicrobials individually and in combination. Extracted violacein was measured at 595 nm. The amount of pigment produced by each treated-bacterial sample is based on amount produced by untreated sample (control which produce 100% of pigment as determined). Amounts of violacein (%) are the mean  $\pm$  standard deviation. \* Indicates statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatment

and control. <sup>a-d</sup> Indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) among treatments and control; different letters indicate difference, and same letters indicate absence of difference.

**Figure 8. Scanning electron micrographs of low magnification (1,000x) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042) and KPC-producing *K. pneumoniae* 24h-biofilms.** Both biofilms were grown on glass surface. **(A)** EAEC biofilm showing initial development of three-dimensional architecture, with cellular aggregates and remarkable amount of EPS. **(B)** KPC biofilm in early stage of development, without cells aggregates, no exopolysaccharide matrix and absence of three-dimensional structure.

## FIGURES

Figure 1

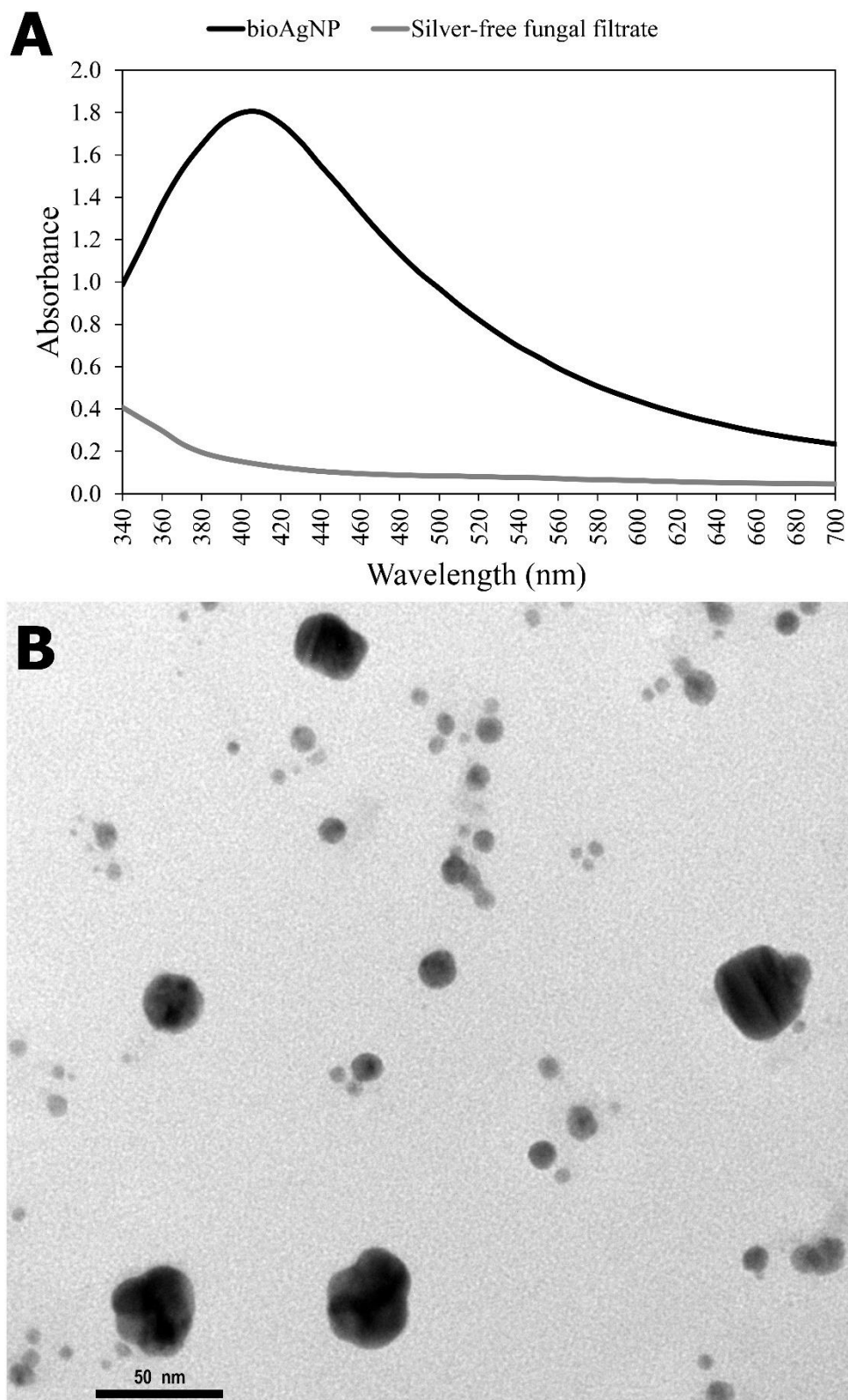


Figure 2

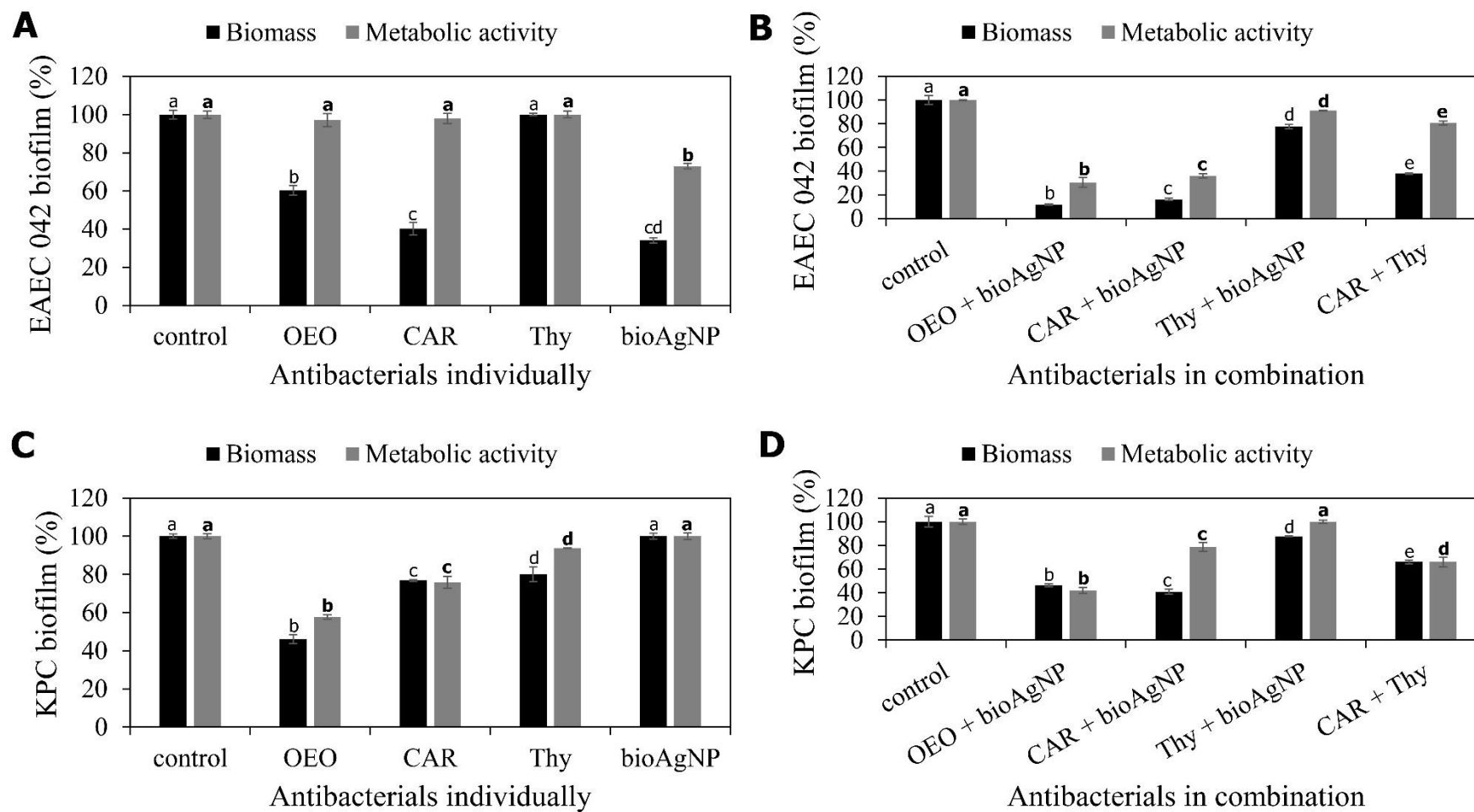
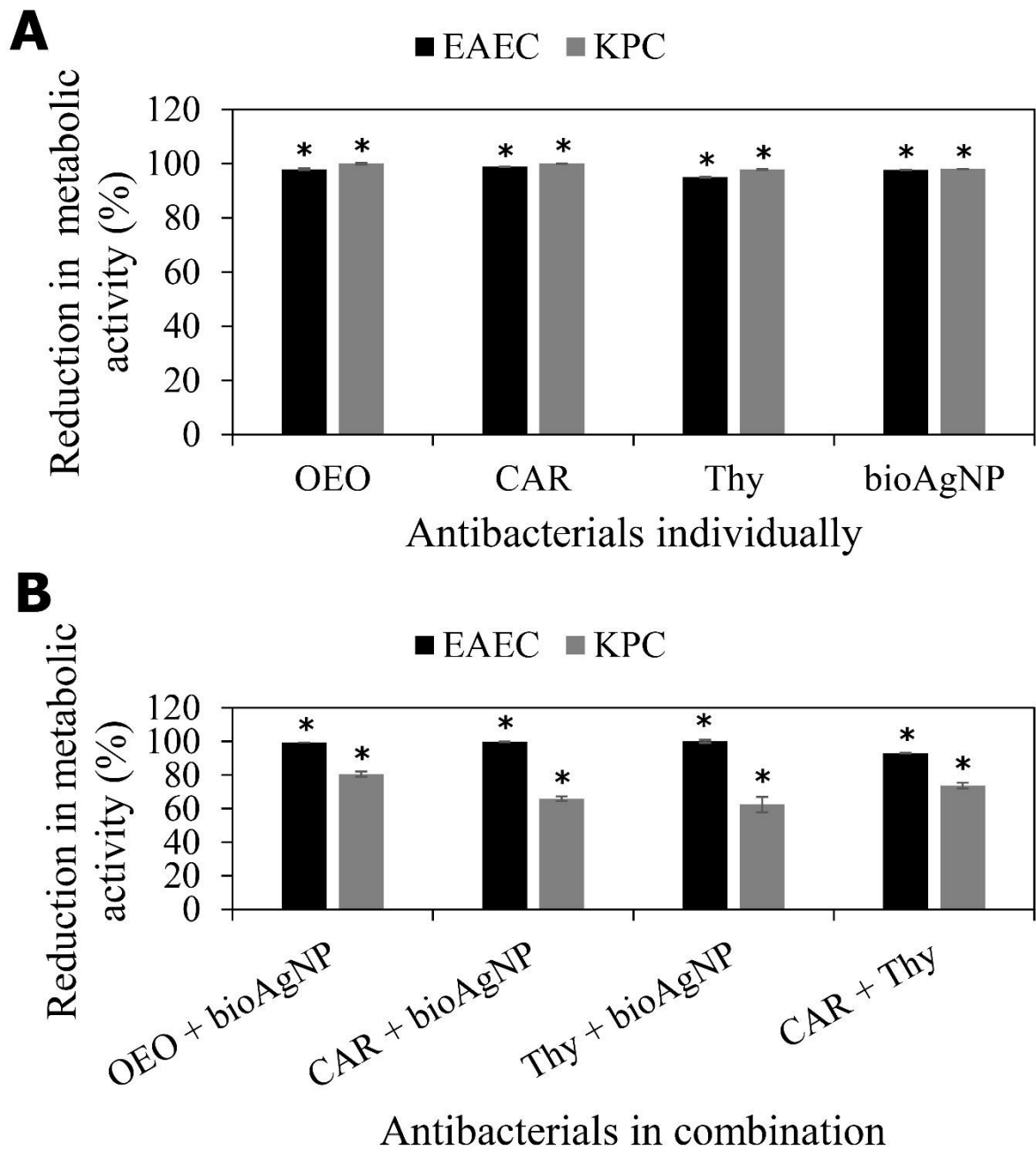
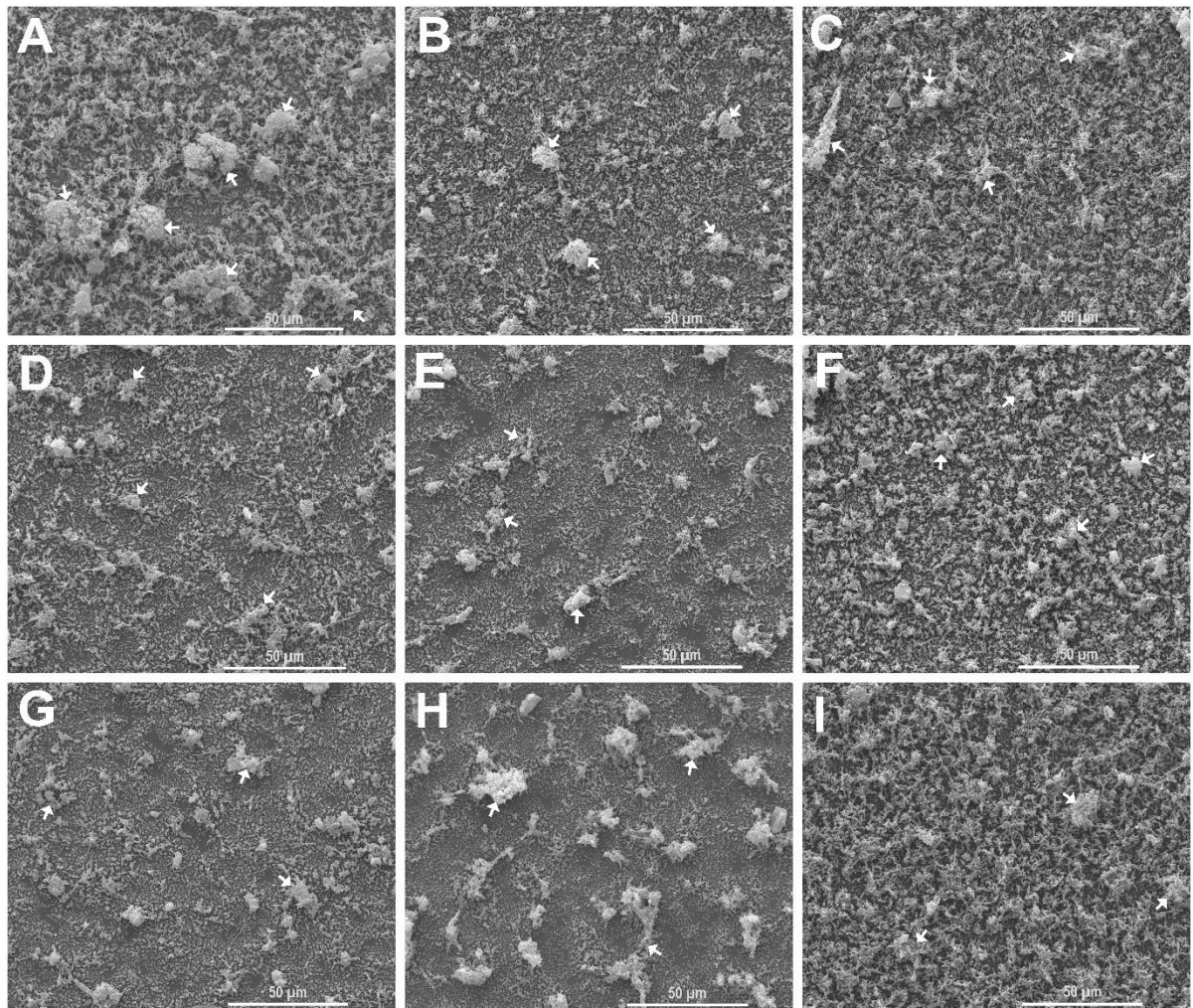


Figure 3



**Figure 4**

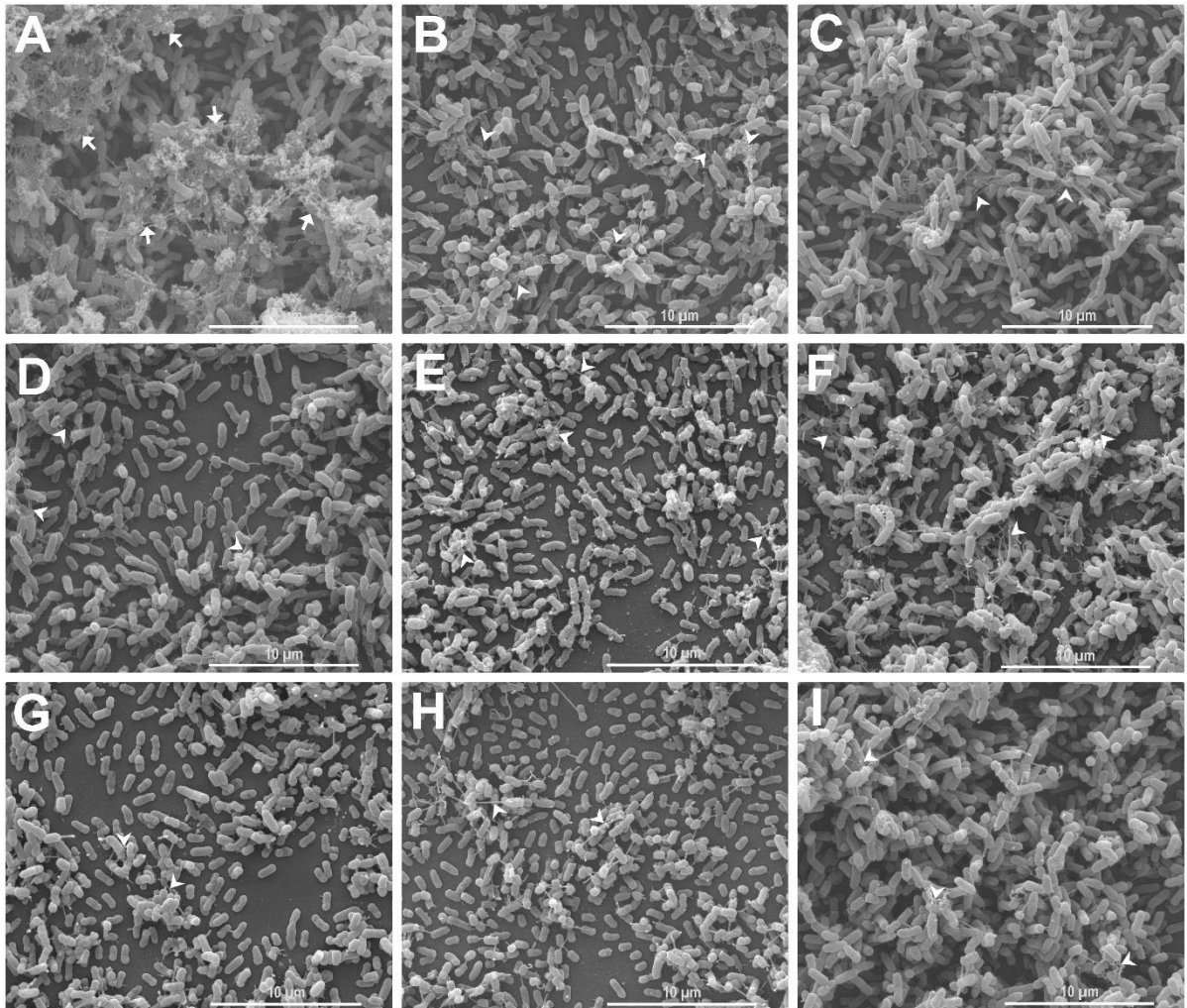
**Figure 5**

Figure 6

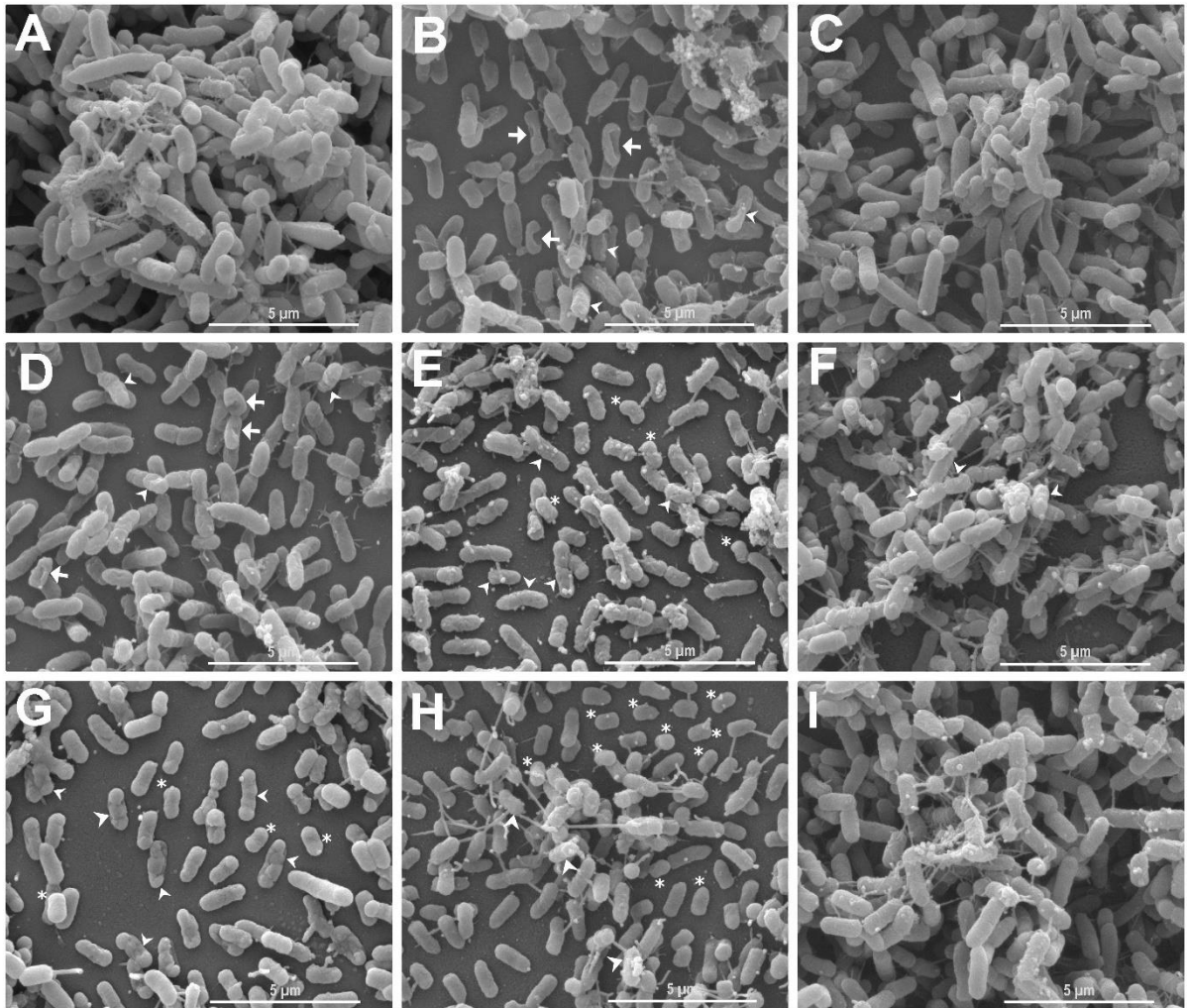


Figure 7

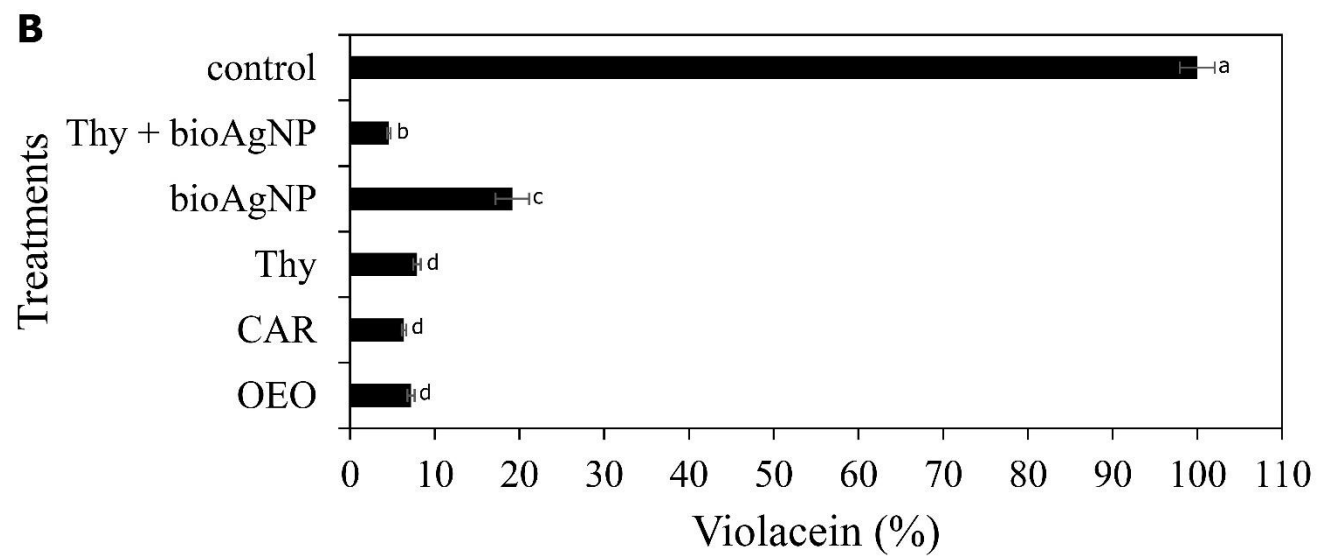
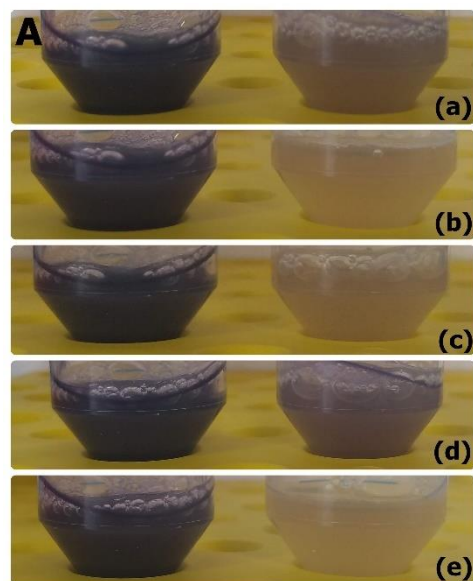
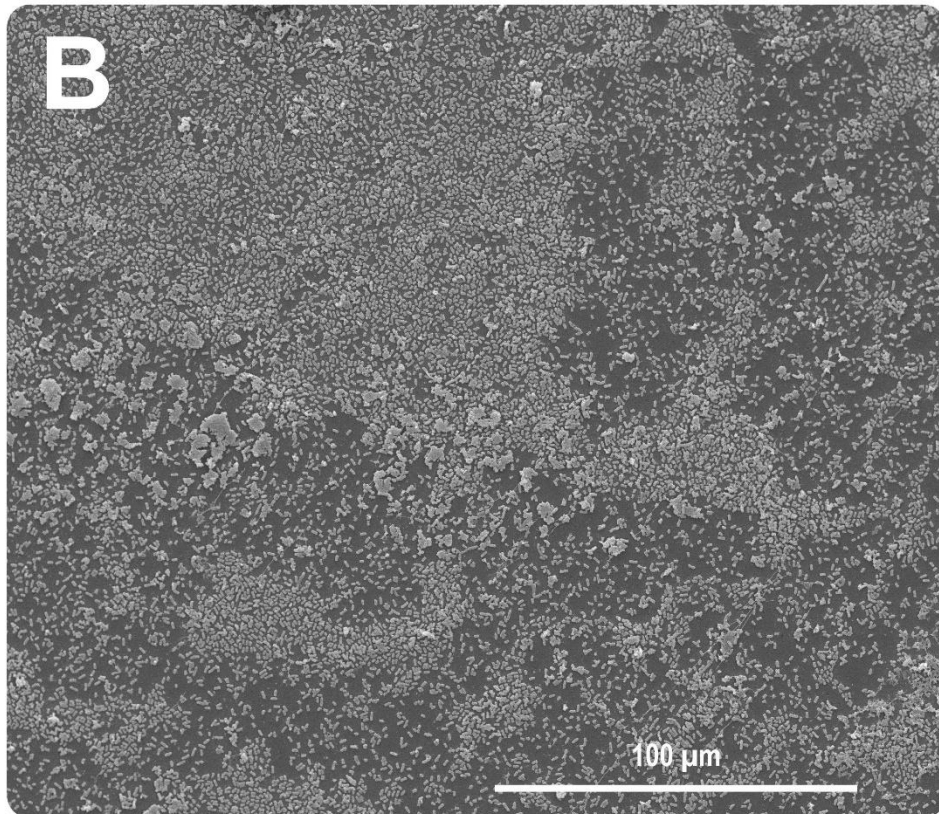
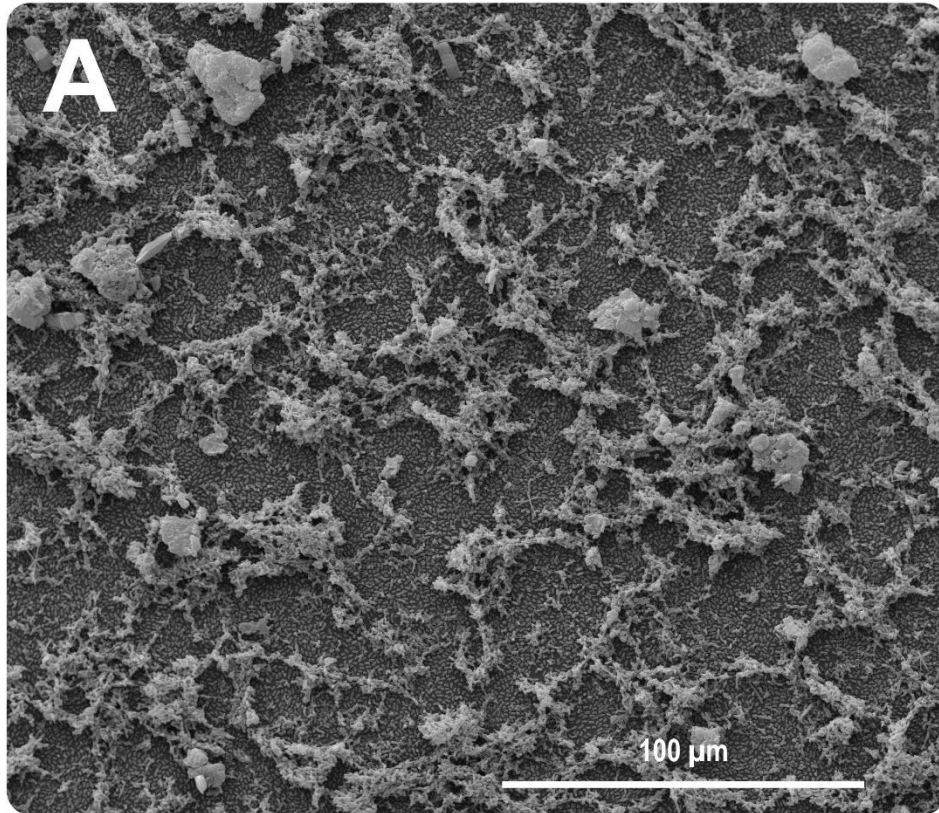


Figure 8



## 6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de prata biogênicas (bioAgNP) e todos os derivados do *Origanum vulgare*, óleo essencial de orégano (OEO), carvacrol (CAR) e timol (Thy), inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e negativas, incluindo cepas multirresistentes e produtoras de biofilme. Todas as combinações, além de serem pouco hemolíticas, exibiram maior atividade antibacteriana do que os compostos isolados, uma vez que reduziram significativamente as concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos envolvidos e atuaram em menor tempo de ação.

Duas associações se destacam, CAR/bioAgNP e Thy/bioAgNP, visto que mostraram efeito antibacteriano aditivo, preveniram a formação de biofilme, interferindo tanto no crescimento de células planctônicas quanto nas vias específicas das células sésseis, e inibiram o desenvolvimento de biofilme pré-formado em poliestireno e superfície de vidro. Além disso, Thy/bioAgNP foi mais eficiente do que a monoterapia com bioAgNP na prevenção de emergência de resistência.

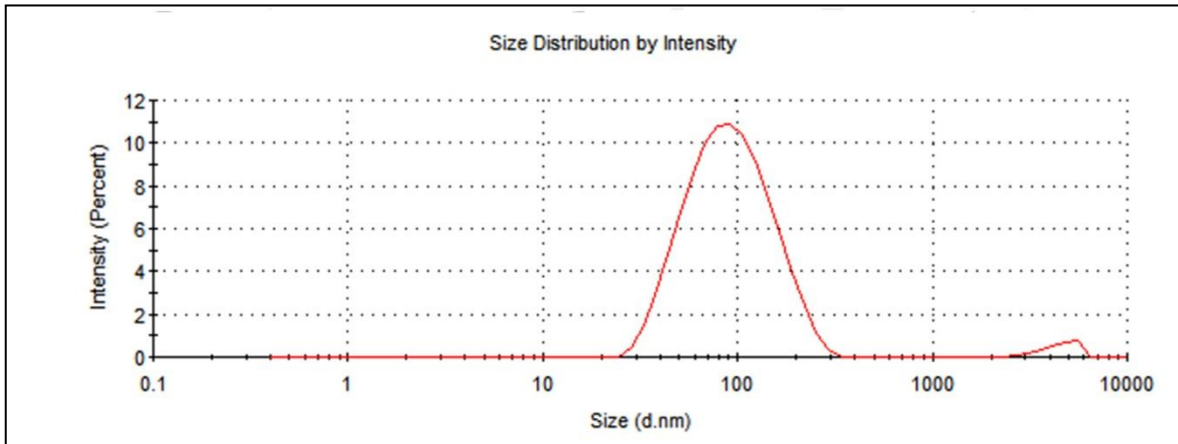
O mecanismo de ação da combinação Thy/bioAgNP, bem como de seus componentes individualmente, envolve estresse oxidativo e dano à membrana citoplasmática e parede celular. OEO e CAR não causaram estresse oxidativo, mas também afetaram a membrana e parede celular bacterianas.

Este estudo apresenta combinações com potencial de aplicação em setores industriais, clínicos e hospitalares. Visto que, as associações, compostas por bioAgNP e terpenoides derivados do orégano, minimizam a seleção de cepas resistentes e possuem efeito contra patógenos do grupo de prioridade crítica, como Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, para os quais o desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgente, uma vez que há pouca ou nenhuma opção de tratamento eficiente.

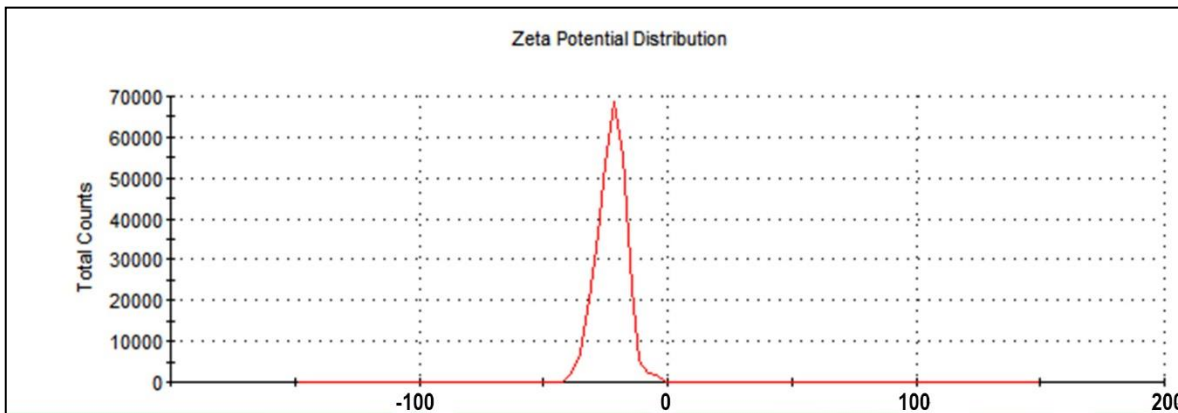
## ANEXOS

## ANEXO A

## Material Suplementar Referente ao Artigo 1



**Supplementary Figure 1** – Size distribution by intensity (%) of biologically synthesized silver nanoparticles (bioAgNP). Based on all of the intensities provided by photon correlation spectroscopy, the average diameter of bioAgNP was 72.57 nm. The polydispersity index (PDI) was 0.357.



**Supplementary Figure 2** – Zeta potential distribution of biologically synthesized silver nanoparticles (bioAgNP) determined using ZetaSizer NanoZS (Malvern). The average zeta potential value of was -22.5 mV.

## ANEXO B

## Material Suplementar Referente ao Artigo 1

**Supplementary Table 1 – Quantification of viable cells (log CFU/mL) of *E. coli* ATCC 25922 at five time points of treatments to determine subinhibitory concentrations of oregano-derived antimicrobials and bioAgNP individually and in combination.**

Treatments	0.008 h	0.5h	1h	2h	3h
Control	8.99 ± 0.01	8.95 ± 0.08	9.08 ± 0.17	9.16 ± 0.09	9.08 ± 0.07
OEO 0.31 mg/mL	7.46 ± 0.03	6.82 ± 0.17	4.75 ± 0.08	2.88 ± 0.11	2.60 ± 0.11
OEO 0.15 mg/mL <sup>(a)</sup>	9.10 ± 0.03	9.03 ± 0.12	9.10 ± 0.02	9.04 ± 0.04	8.95 ± 0.05
CAR 0.31 mg/mL	7.08 ± 0.00	5.31 ± 0.01	4.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CAR 0.15 mg/mL <sup>(a)</sup>	9.03 ± 0.05	9.03 ± 0.02	8.99 ± 0.07	9.03 ± 0.05	9.04 ± 0.11
Thy 0.25 mg/mL	3.05 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Thy 0.12 mg/mL <sup>(a)</sup>	9.00 ± 0.04	9.09 ± 0.05	9.05 ± 0.05	9.04 ± 0.04	9.05 ± 0.05
bioAgNP 92.5 µM <sup>(a)</sup>	9.07 ± 0.02	9.07 ± 0.14	9.04 ± 0.00	9.08 ± 0.04	9.17 ± 0.08
Thy 0.06 mg/mL + bioAgNP 46.25 µM	8.52 ± 0.14	7.37 ± 0.05	6.43 ± 0.17	4.00 ± 0.01	4.00 ± 0.00
*Thy 0.03 mg/mL + bioAgNP 46.25 µM <sup>(a)</sup>	9.03 ± 0.05	9.04 ± 0.04	8.99 ± 0.05	9.05 ± 0.06	8.97 ± 0.06

OEO; *Oregano essential oil*; CAR; *Carvacrol*; Thy, *Thymol*; bioAgNP, *Biogenically synthesized silver nanoparticles*.

Values of CFU/mL are the mean ± standard deviation.

<sup>(a)</sup>Antimicrobials at subinhibitory concentrations.

## ANEXO C

## Material Suplementar Referente ao Artigo 1

**Supplementary Table 2.** Prolonged exposition of *Escherichia coli* ATCC 25922 to Thy and bioAgNP (individually and in combination) for 25 days. The highest antimicrobial concentrations that do not inhibit bacterial growth are indicated in table.

Day	Thy	bioAgNP	Thy + bioAgNP
1	0.12 × MIC	0.12 × MIC	0.12 × A
2	0.12 × MIC	0.12 × MIC	0.12 × A
3	0.12 × MIC	0.12 × MIC	0.12 × A
4	0.12 × MIC	0.12 × MIC	0.12 × A
5	0.25 × MIC	0.25 × MIC	0.25 × A
6	0.25 × MIC	0.25 × MIC	0.25 × A
7	0.25 × MIC	0.25 × MIC	0.25 × A
8	0.25 × MIC	0.25 × MIC	0.25 × A
9	0.25 × MIC	0.5 × MIC	0.5 × A
10	0.4 × MIC	0.5 × MIC	0.5 × A
11	0.4 × MIC	0.5 × MIC	0.5 × A
12	0.4 × MIC	MIC	0.8 × A (Thy) + A (Ag)
13	0.4 × MIC	MIC	0.8 × A (Thy) + A (Ag)
14	0.4 × MIC	1.2 × MIC	0.5 × A (Thy) + A (Ag)
15	0.4 × MIC	1.4 × MIC	0.6 × A (Thy) + A (Ag)
16	0.4 × MIC	1.6 × MIC	0.6 × A (Thy) + A (Ag)
17	0.4 × MIC	1.8 × MIC	0.8 × A (Thy) + A (Ag)
18	0.4 × MIC	2 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)
19	0.4 × MIC	2.2 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)
20	0.5 × MIC	2.8 × MIC	A
21	0.5 × MIC	3.4 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)
22	0.6 × MIC	4.5 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)
23	0.6 × MIC	5.5 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)
24	0.6 × MIC	11 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)
25	0.6 × MIC	11 × MIC	0.9 × A (Thy) + A (Ag)

Thy, Thymol; bioAgNP, Biologically synthesized silver nanoparticles.

MIC, Minimum inhibitory concentration.

Thy MIC = 0.25 mg/mL

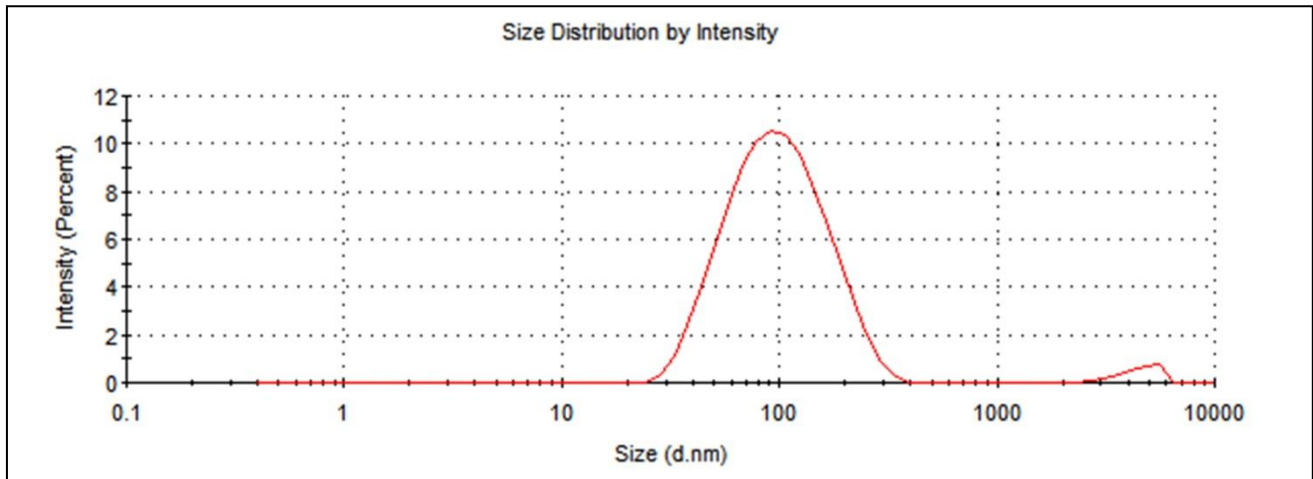
bioAgNP MIC = 92.5 μM

A, Antimicrobials in combination that inhibit bacterial growth (Thy = 0.12 mg/mL; bioAgNP = 46.25 μM)

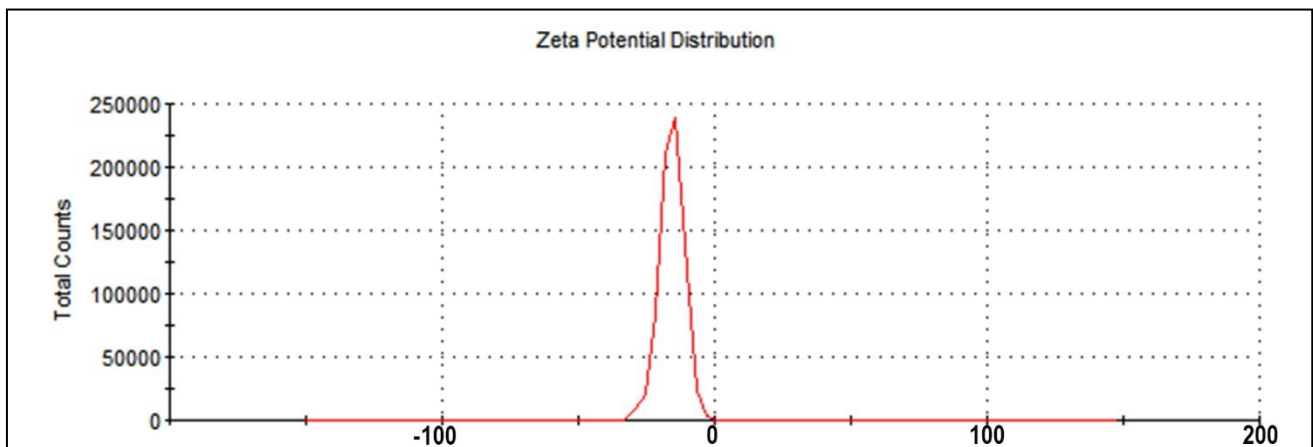
Bacterial sample that was treated with combination did not develop tolerance to bioAgNP, whose MIC remained 92.5 μM.

## ANEXO D

## Material Suplementar Referente ao Artigo 2



**Supplementary Figure 1** – Size distribution by intensity (%) of biologically synthesized silver nanoparticles (bioAgNP). Based on all of the intensities provided by photon correlation spectroscopy, the average diameter of bioAgNP was 84.10 nm. The polydispersity index (PDI) was 0.269.



**Supplementary Figure 2** – Zeta potential distribution of biologically synthesized silver nanoparticles (bioAgNP) determined using ZetaSizer NanoZS (Malvern). The average zeta potential value of was -15.9 mV.

**ANEXO E****Tabela 19** – Transformação da unidade de concentração “mg/mL” para “% (v/v)” do óleo essencial de orégano (OEO) e carvacrol (CAR) utilizados neste estudo

<b>Conversão de concentrações (OEO)</b>		<b>Conversão de concentrações (CAR)</b>	
<b>mg/mL</b>	<b>% (v/v)</b>	<b>mg/mL</b>	<b>% (v/v)</b>
9,5	1	9,76	1
4,75	0,5	4,88	0,5
2,38	0,25	2,44	0,25
1,19	0,12	1,22	0,12
0,59	0,06	0,61	0,06
0,30	0,03	0,31	0,03
0,15	0,01	0,15	0,01
0,07	0,008	0,08	0,008
0,04	0,004	0,04	0,004
0,02	0,002	0,02	0,002
Densidade OEO = 0,95 g/mL		Densidade CAR = 0,976 g/mL	

**FONTE:** Próprio autor (2020).

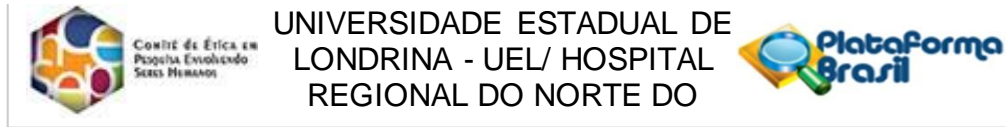
## ANEXO F

**Tabela 20** – Transformação da unidade de concentração “ $\mu\text{M}$ ” para “ $\mu\text{g/mL}$ ” de nanopartículas de prata sintetizadas extracelularmente com o fungo *Fusarium oxysporum*

Conversão de concentrações <sup>1</sup>	
$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/mL}$
740	126
370	63
185	31,5
92,50	15,75
46,25	7,88
23,13	3,94
11,56	1,97
5,78	0,98
2,89	0,49
1,45	0,25
0,72	0,12
0,36	0,06
0,18	0,03

<sup>1</sup> Para a conversão, considerou-se a massa molar de  $\text{AgNO}_3$  (169,87 g/mol)

**FONTE:** Próprio autor (2020).

**ANEXO G****Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (continua)****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS ALTERNATIVOS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

**Pesquisador:** Renata Katsuko Takayama Kobayashi

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 47661115.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCB - Departamento de Microbiologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.268.019

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto para avaliar a toxicidade de compostos alternativos com ação antimicrobiana, pois é sabido que a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais é um problema que está afetando o recinto hospitalar, o ambiente e a comunidade de forma geral.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Avaliar ação citotóxica de compostos antimicrobianos.

**Objetivo Secundário:** Determinar a concentração tóxica em hemácias (CC50; ou seja, concentração que danifica 50% das células) de compostos antimicrobianos alternativos. Comparar os resultados encontrados nessa linhagem celular com os resultados encontrados em células tumorais (HEp-2, HeLa, LLCMK2).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** O risco será mínimo. O risco é próprio de uma coleta de sangue, como dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Por isso, o procedimento será realizado por profissionais qualificados e normas de biossegurança serão utilizadas, como uso de luvas, jaleco e técnicas assépticas.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

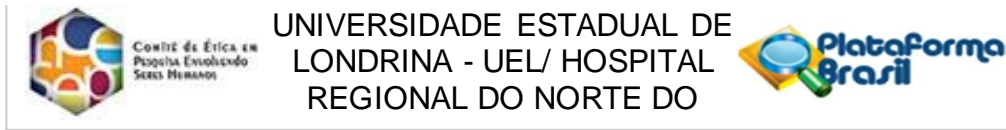
**Telefone:** (43)3371-5455

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br

## Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (continuação)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Além disso, todos os materiais que entrarem em contato com o sangue, seja por meio da coleta ou do experimento, serão descartados adequadamente.

Em caso de desconforto ou outros danos devido ao procedimento de coleta de sangue, o voluntário será encaminhado para a Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade (DASC – UEL).

**Benefícios:**

Esse estudo irá auxiliar no processo de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Após testes de toxicidade, tais agentes podem ganhar potencial para serem utilizados em indústrias farmacêuticas, alimentícias, hospitais, clínicas, entre outros.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo importante para área pois, a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais é um problema que está afetando o recinto hospitalar, o ambiente e a comunidade de forma geral. A pesquisadora pertence a um grupo de pesquisa que vem avaliando a resistência de microrganismos isolados de humanos e alimentos a antibióticos comerciais, principalmente no aspecto epidemiológico. O conhecimento resultante desse estudo poderá reverter em benefícios no desenvolvimento de novos agentes para controle de infecções bacterianas, visando métodos alternativos para o combate às bactérias, principalmente às multirresistentes aos antimicrobianos.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão corretos.

#### **Recomendações:**

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O pesquisador atendeu satisfatoriamente as pendências levantadas pelo CEP, apresentando o documento da DASC, com ciência da pesquisa e se comprometendo em atender os participante do estudo caso, for necessário. E adequou o cronograma. Projeto está aprovado2

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-5455

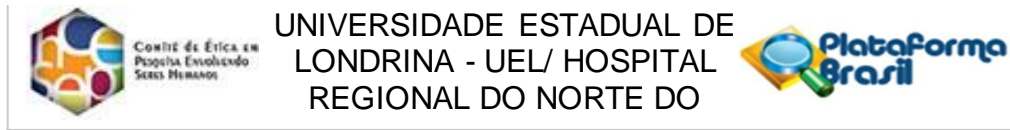
**CEP:** 86.057-970

**Município:** LONDRINA

**E-mail:** cep268@uel.br

## ANEXO G

## Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (conclusão)



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_549298.pdf	18/09/2015 21:42:46		Aceito
Outros	dasc.pdf	18/09/2015 21:42:13	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto3.pdf	18/09/2015 21:40:00	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 08:37:39	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito
Folha de Rosto	Doc1.pdf	09/09/2015 08:28:09	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 08 de Outubro de 2015

Assinado por:

Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli  
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

Município: LONDRINA

E-mail: cep268@uel.br