



Sinergismo antimicrobiano e atividades antibiofilme dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Eucalyptus globulus* contra cocos Gram-positivos

Antimicrobial synergism and antibiofilm activities of *Mentha piperita* L. and *Eucalyptus globulus* essential oils against Gram-positive cocci

N. S. Ferreira; R. C. Rosa; E. N. R. Fontes; K. A. Bastos; J. A. Resende; M. D. C. Ignacchiti*

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

* mariana.ignacchiti@ufes.br

(Recebido em 06 de junho de 2023; aceito em 21 de agosto de 2023)

O desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana e antibiofilme é uma prioridade urgente na saúde única. As infecções por cocos Gram-positivos (CGP) merecem atenção devido à sua capacidade de causar infecções graves e potencialmente fatais. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais (OE) de *Mentha piperita* L. e *Eucalyptus globulus* e suas associações frente *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. O potencial antimicrobiano foi avaliado pelo método de difusão em disco e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada por microdiluição em caldo. Os ensaios de associação entre os OE foram realizados pelo método *checkerboard* que determina a concentração fracionada mínima (FIC) e classifica a associação como sinérgicas, aditivas ou antagônicas. A atividade antibiofilme do OE isolado e em associação foi avaliada pelo cristal violeta. O teste de difusão em disco confirmou a capacidade dos OE em inibir as bactérias em sua forma planctônica. As CIM de *E. globulus* contra *S. aureus* e *E. faecalis* foram 1,25% e 0,15%, respectivamente, e para *M. piperita* L. foi 0,15% para ambos CGP, com efeito bactericida. A combinação dos OE mostrou atividade sinérgica para *S. aureus* (FIC = 0,375) e aditiva para *E. faecalis* (FIC = 0,750). Ambos CGP são formadores de biofilme moderadamente aderente. Após adição dos OE e sua combinação, o biofilme foi reclassificado como pouco aderente. Estes resultados indicam que tanto o OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. isolados quanto em associação são capazes de inibir a adesão celular inicial dos CGP.

Palavras-chave: biofilme bacteriano, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

The development of new compounds with antimicrobial and antibiofilm activity is an urgent priority in One Health. Gram-positive cocci (GPC) infections deserve attention due to their capacity to cause severe and potentially fatal infections. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils (EO) from *Mentha piperita* L. and *Eucalyptus globulus* and their combinations against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. The antimicrobial potential was evaluated by the disk diffusion method, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by broth microdilution. EO combination assays were performed by the checkerboard method, which determines the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) and classifies the association as synergistic, additive, or antagonistic. The antibiofilm activity of isolated EO and in combination was evaluated by crystal violet. The disk diffusion test confirmed the ability of EO to inhibit bacteria in their planktonic form. The MICs of *E. globulus* against *S. aureus* and *E. faecalis* were 1.25% and 0.15%, respectively, and for *M. piperita* L. it was 0.15% for both GPC, with bactericidal effect. The combination of EO showed synergistic activity for *S. aureus* (FIC = 0.375) and additive for *E. faecalis* (FIC = 0.750). Both GPC are moderately adherent biofilm formers. After addition of EO and their combination, the biofilm was reclassified as weakly adherent. These results indicate that both isolated and combined EO from *E. globulus* and *M. piperita* L. are capable of inhibiting the initial cellular adhesion of GPC.

Keywords: bacterial biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

1. INTRODUÇÃO

As infecções por cocos Gram-positivos têm uma importância significativa na saúde única, pois esses microrganismos são frequentemente responsáveis por uma ampla variedade de doenças infecciosas, que vão desde infecções superficiais da pele e do trato respiratório até infecções graves, como sepsis e meningite [1]. Bactérias potencialmente patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* possuem fatores de virulência que contribuem para sua capacidade de causar doenças, incluindo a formação de biofilme, produção de toxinas, enzimas e outras moléculas que podem danificar as células hospedeiras e promover a invasão do tecido [2, 3]. Além disso, muitas linhagens de bactérias Gram-positivas têm desenvolvido resistência a vários antimicrobianos, o que torna o tratamento dessas infecções mais desafiador e aumenta o risco de complicações graves [4].

A resistência antimicrobiana dos patógenos é um fenômeno crescente e preocupante a nível mundial, que apresenta uma ameaça significativa à saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu recentemente a resistência microbiana em sua lista de dez principais ameaças à saúde mundial [5]. As bactérias Gram-positivas, em particular, são conhecidas por sua capacidade genética de desenvolver resistência a quase todos os antimicrobianos disponíveis clinicamente. Essa resistência pode ocorrer através de diversos mecanismos, incluindo alterações nas proteínas ligantes das penicilinas (PBPs) que destroem o sítio ativo da droga, modificação das estruturas bacterianas, como espessamento do peptidoglicano e alteração da estrutura ribossomal, impedindo o fármaco de atingir e se ligar ao seu alvo ou efluxo da droga através da superexpressão de bombas de efluxo. Assim, patógenos Gram-positivos multirresistentes representam sérios desafios clínicos e são difundidos em todo o mundo [4, 6, 7].

A formação de biofilmes bacterianos é um fator que desempenha um papel significativo no desenvolvimento de infecções crônicas e persistentes [8]. Estudos indicam que aproximadamente 65-80% das infecções bacterianas são atribuídas à presença de biofilmes [9, 10]. Além disso, é importante notar que as doses terapêuticas normalmente utilizadas na farmacoterapia convencional têm demonstrado baixa eficácia no tratamento de biofilmes, exigindo concentrações de antimicrobianos até 1000 vezes maiores para erradicar as bactérias com esse fenótipo específico [10, 11].

Neste sentido, inovação e prospecção de produtos naturais como potenciais fornecedores de princípios para novos medicamentos ou melhoria dos atuais continua sendo importante, mesmo com o menor interesse das grandes empresas farmacêuticas [12, 13]. Dentre algumas opções de óleos essenciais (OE) com atividades antimicrobianas amplamente conhecidas, estão a *Mentha piperita* L. e *Eucalyptus globulus* [14, 15]. Seus componentes majoritários já são bem estudados [14, 16] e possuem uma gama de estudos contra os microrganismos escolhidos neste estudo, *S. aureus* e *E. faecalis*, porém o sinergismo de ação não é uma abordagem muito explorada, o que traz a contribuição necessária ao começo dos estudos nesse campo.

A composição dos OE é altamente variável e em uma mesma espécie de planta é possível encontrar diferentes compostos e concentrações [15, 16, 17]. Para potencializar a atividade biológica dos OE, é possível associá-los, resultando em um efeito que pode ser intensificado, não alterado ou diminuído. Isso é de grande importância na busca por interações de produtos naturais e novas combinações para inibir bactérias resistentes. Portanto, o estudo das associações dos OE é promissor para a possível utilização como insumo de tratamento de infecções bacterianas [14, 18, 19].

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do OE de *M. piperita* L. e *E. globulus* e suas associações frente a cocos Gram-positivos (CGP), *S. aureus* e *E. faecalis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais

As espécies vegetais testadas foram *Eucalyptus globulus* (eucalipto) e *Mentha piperita* L. (hortelã pimenta). Os OE foram adquiridos por doação da By Samia, empresa especializada em aromaterapia (By Samia, São Paulo – SP, <http://www.bysamia.com.br/>). A empresa responsável forneceu os dados sobre a composição e caracterização química dos óleos essenciais (OE), conforme apresentado na tabela a seguir (Tabela1).

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais *Mentha piperita* L. e *Eucalyptus globulus*.

	Composição química dos OE (%)	Lote
<i>M. piperita</i> L.	Mentol (43,45%); Mentona (23,15%); Acetato mentílico (4,48%); Iso-mentona (3,95%); mentofurano (3,0%).	371555BS
<i>E. globulus</i>	1,8- cineol/Eucaliptol (80,0%); Alfa- pineno (11,0%); Globulol (5,33%); Sesquiterpenos (1,63%); Beta- pineno (0,20%).	051604BS

2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Foram utilizadas as linhagens padrão de cocos Gram-positivos, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para confirmar a pureza das espécies, as culturas foram submetidas à coloração diferencial de Gram.

A caracterização da susceptibilidade a antibacterianos foi conduzido de acordo com o método de difusão em disco, segundo descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2015) [20]. Colônias isoladas foram ressuspensas em solução salina 0,9% e a turbidez foi ajustada para atingir o padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Em seguida, as suspensões bacterianas foram inoculadas em placas contendo Ágar *Mueller-Hinton* (AMH). Discos de papel estéreis com diâmetro de 6 mm foram impregnados com 10 µL do óleo essencial puro e colocados nas placas, junto com discos contendo 10 µg de gentamicina, um antimicrobiano comercial utilizado como controle positivo. Após período de incubação (35 ± 2 °C; 24 horas), a medição visual do halo de inibição do crescimento foi realizada com o auxílio de um paquímetro. O grau de inibição do crescimento bacteriano induzido pelos OE foi classificado da seguinte maneira: sem inibição se o diâmetro do halo de inibição foi inferior a 6 mm; moderadamente inibitório se variou de 7 a 13 mm; e fortemente inibitório se foi maior que 13 mm [21]. Todos os testes foram conduzidos em triplicata, sendo realizados dois ensaios independentes.

2.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada por meio do método de microdiluição, seguindo a metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) em 2015 [20], com algumas modificações.

Para o inóculo bacteriano, uma colônia isolada obtida do meio *Plate Count Agar* (PCA) foi transferida para o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Após tempo de incubação (35 ± 2 °C; 8 horas), a turbidez da cultura no caldo foi ajustada para atingir o padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Em seguida foi realizada diluição para ajuste da concentração em 1x10⁶ UFC/mL.

As soluções de OE de 1,56 a 100 mg/mL (0,15-10% v/v) foram preparadas em caldo *Mueller-Hinton* (CMH) acrescidas de 0,2% de *Tween* 80. O ensaio foi conduzido em triplicata em microplacas estéreis de 96 poços de fundo redondo. O volume final da mistura de reação foi de 200 µL em cada poço. Como controle positivo (CP) foi utilizado Canamicina (4 µg/mL). Como controle de esterilidade (CN), apenas CMH estéril contendo 0,2% *Tween* 80 foi utilizado. Para o controle de crescimento (CC), 100 µL de CMH contendo 0,2% *Tween* 80 e 100 µL do inóculo

foram adicionados. Após a montagem, a microplaca foi incubada por 35 ± 2 °C durante 24 horas. A determinação da CMI é considerada validada quando: o CN apresenta ausência de turbidez e o CC apresenta *pellet* no fundo do poço ou presença de turbidez. A CIM foi determinada como a menor diluição do OE que resultou na ausência de turbidez ou crescimento bacteriano.

Em seguida, a partir dos poços (CIM dos OE; CP; CN e CC) foi realizado subcultivo em ágar nutriente estéril. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18-24 horas. O resultado foi definido a partir da observação da presença ou ausência de colônias, classificando a ação como bacteriostática ou bactericida, respectivamente.

2.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Fracionária (FIC): método *Checkerboard*

O método *checkerboard*, “tabuleiro de xadrez”, avalia as possíveis interações entre drogas e as classifica como sinérgicas, aditivas ou antagônicas. Para tal método é utilizado o índice de concentração inibitória fracionária (FIC).

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo redondo, foram montadas uma matriz 6x6, onde as combinações dos OE foram distribuídas. Foram preparadas seis diluições seriadas dos OE, começando com 4 x CIM e terminando com $\frac{1}{8}$ x CIM de cada óleo isoladamente (Óleo a: *M. piperita* L.; Óleo b: *E. globulus*). A esta mistura foi adicionado 100 µL do inóculo ajustado para a concentração de 1×10^6 UFC/mL. O volume final da mistura de reação foi de 200 µL. A microplaca foi incubada por 18-24 horas a 35 ± 2 °C. A leitura dos resultados foi realizada observando a ausência de turvação dos poços e/ou crescimento. O CIM combinado foi determinado através da menor concentração da combinação dos OE que não apresentou turbidez e/ou crescimento. Os experimentos foram realizados em duplicata. Foi utilizado um CC (meio de cultura + inóculo) e CN (apenas meio de cultura).

O FIC foi calculado e classificado seguindo a fórmula e a seguir:

$$FIC = \frac{CIMa \text{ combinado}}{CIMa \text{ isolado}} + \frac{CIMb \text{ combinado}}{CIMb \text{ isolado}}, \text{ onde}$$

CIMa combinado = CIM do óleo “a” combinado com o óleo b;

CIMa isolado = CIM do óleo “a” isolado;

CIMb combinado = CIM do óleo “b” combinado com o óleo a;

CIMb isolado = CIM do óleo “b” isolado.

Interpretou-se o resultado como: efeito sinérgico quando $FIC < 0,5$; efeito aditivo quando FIC for entre 0,5 – 1,0; sem interação quando o valor for entre 1,0 – 4,0 e efeito antagonista quando $FIC > 4$ [23].

2.3 Determinação da atividade antibiofilme dos óleos essenciais

A influência dos OE na formação do biofilme bacteriano foi avaliada como protocolo descrito por Jadhav et al. (2013) [22] com adaptações. O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo em triplicata. Inicialmente, o inóculo bacteriano foi ajustado em CMH na concentração de 1×10^6 UFC/mL. Para montagem da microplaca, em cada poço foram adicionados o inóculo e a solução de OE ou a combinação dos OE (FIC). As soluções dos OE foram preparadas em CMH acrescido com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração de OE testada foi 1x CIM ou 1x FIC. Para o controle positivo da formação de biofilme bacterianos foi adicionado ao poço o inóculo em CMH + 5% de DMSO. Foram adicionados também dois controles negativos: I) apenas CMH; II) Solução 1X CIM ou 1x FIC em CMH + 5% de DMSO. O volume final em cada poço foi de 200 µL.

Após período de incubação (35 ± 2 °C) por 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de solução salina (0,9%) para remoção de células não

aderentes. Em seguida, 150 μL de metanol (96%) foram adicionados nos poços por 15min. Prosseguiu com a aspiração do sobrenadante e 100 μL de uma solução de cristal violeta 0,1% (p/v) foi adicionado a todos os poços. Após 15 minutos, o cristal violeta em excesso foi removido por lavagem das placas. As placas foram então secas à temperatura ambiente e o cristal violeta ligado foi ressolubilizado pela adição de solução etanol:acetona (8:2). A absorbância foi medida a 590 nm usando um espectrofotômetro (Multiskan Spectrum (Multiskan™ Sky; Thermo Fisher Scientific, Japan). Os resultados foram registrados como a média de três réplicas.

A intensidade de formação do biofilme foi classificada de acordo com os critérios propostos por Stepanovic et al. (2000) [23], baseada na absorbância do biofilme formado por cada linhagem comparada à absorbância do controle negativo (AbsCN). Os biofilmes com absorbância inferior a AbsCN foram classificados como não aderentes; aqueles $\leq 2x$ a AbsCN foram considerados ligeiramente aderentes; biofilmes entre 2 e 4 x a AbsCN foram categorizados como moderadamente aderentes; e biofilmes com absorbância maior que 4 x a AbsCN foram classificados como fortemente aderentes.

2.4 Análise estatística

A análise estatística da atividade antibiofilme dos OE foi conduzida utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5. O teste *One-way* ANOVA, seguido da análise post-hoc de Bonferroni's foi empregado para realizar comparações múltiplas entre os grupos. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antimicrobiana dos OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. sobre células planctônicas

A avaliação da atividade antimicrobiana dos OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. foi realizada para investigar sua ação sobre bactérias na forma planctônica. Os OE foram efetivos na inibição do crescimento de CGP de importância clínica humana avaliados. Ao avaliar os resultados da Tabela 2, é possível observar que o OE de *E. globulus* exibiu uma forte inibição sobre *E. faecalis* e moderada para *S. aureus*. Enquanto que o OE de *M. piperita* L. foi forte inibidor de *S. aureus* e moderado para *E. faecalis*. Ainda, observou-se a formação de halos de inibição para os controles positivos testados, de acordo com CLSI, evidenciando que as linhagens utilizadas foram sensíveis às substâncias padrão e que as condições de realização dos ensaios foram adequadas.

Tabela 2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. frente aos cocos Gram-positivos.

Microrganismo	Zona de inibição (mm)*	
	<i>E. globulus</i>	<i>M. piperita</i> L.
<i>E. faecalis</i>	14,60 \pm 2,50	9,33 \pm 0,65
<i>S. aureus</i>	11,35 \pm 1,05	16,0 \pm 1,00

*Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão dos halos de inibição após 24 horas de incubação. Experimentos realizados em triplicata em momentos independentes.

Para determinação da CIM foram realizadas as microdiluições dos OE *M. piperita* L. e *E. globulus*. O OE *M. piperita* L. mostrou efeito bacteriostático para os CGP, sendo determinada a CIM de 0,15% (1,56 mg/mL) para ambos (Tabela 3). Para *E. globulus*, a CIM foi de 1,25% (12,5 mg/mL) frente a *S. aureus* e CIM de 0,15% (1,56 mg/mL) contra *E. faecalis*.

Tabela 3. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e ação exercida pelos óleos essenciais *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. frente aos cocos Gram-positivos

Substância	CIM e ação exercida	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>M. piperita</i> L.	1,56 mg/mL (0,15%) Bacteriostática	1,56 mg/mL (0,15%) Bacteriostática
<i>E. globulus</i>	12,5 mg/mL (1,25%) Bacteriostática	1,56 mg/mL (0,15%) Bacteriostática

Não há um consenso na literatura sobre os níveis de inibição de crescimento microbiano desejáveis para compostos de plantas, quando comparados com antimicrobianos padrões. Diferentes trabalhos relatam diâmetros variados para os halos de inibição. Singh, Shushni e Belkheir (2015) [24] relataram que CGP (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. pyogenes* ATCC19615) foram sensíveis ao OE de *M. piperita* L. com zona de inibição de 17,2 mm e 13,1 mm, respectivamente; Ghabraie et al. (2016) [25] observaram que o OE de *M. piperita* L. inibiu *S. aureus* (ATCC 29213) com halos de 22,7mm. Ali et al. (2022) [26] relataram um diâmetro de $18,67 \pm 2,51$ mm para o OE de *E. globulus* contra *S. aureus* resistente a metilina (MRSA); Bouras, Abbaci e Bennadja (2016) [27] relataram um diâmetro de inibição igual a $16,0 \pm 1,41$ mm contra *S. aureus* sensível a metilina e $15,5 \pm 0,70$ mm contra MRSA para o OE de *E. globulus*. Em contraste, Čmiková et al. (2023) [28] relataram halos de $2,33 \pm 0,58$ mm e $5,67 \pm 0,58$ para *E. globulus* contra *E. faecalis* e *S. aureus*, respectivamente.

Com relação aos dados de CIM, observa-se que *E. faecalis* foi mais suscetível aos OE, uma concentração maior de *E. globulus* (1,25%) foi necessária para eliminação de *S. aureus*. Outras pesquisas relatam diferentes concentrações efetivas dos diferentes OE. Para *M. piperita* L, Bazargani e Rohloff (2016) [29] relataram CIM de 3,1 μ L/mL inibindo *S. aureus* (CCUG 4151). Outro estudo ainda (2018) [30] encontrou CIM de 625 μ g/mL para *S. aureus*. Na inibição de *E. faecalis*, Talei et al. (2017) [31] relataram CIM de 4200 μ g/mL para o OE de *M. piperita* L. Já para o OE de *E. globulus*, De Miranda et al. (2022) [32] evidenciaram atividade sobre *S. aureus*, na concentração de 10 mg/mL e Tyagi e Malik (2011) [33] relataram CIM de 2,25 mg/mL para *S. aureus*.

A inibição do crescimento microbiano pode ser bacteriostática ou bactericida devido à ação de substâncias antimicrobianas. Neste estudo, ambos os OE demonstraram ação bacteriostática frente aos CGP testados. Sugere-se que ocorra um impedimento do crescimento bacteriano, mantendo a célula na fase estacionária [34]. Isso provavelmente acontece devido à capacidade desses compostos em interferir nos processos metabólicos essenciais dessas bactérias, impedindo sua proliferação.

A atividade antimicrobiana dos OE é influenciada pela sua composição química, pelos grupos funcionais dos componentes ativos e suas interações sinérgicas entre eles. O mecanismo de ação dos OE varia de acordo com o tipo de microrganismo e a capacidade de penetração de seus componentes na parede celular. A partir da análise dos resultados é possível observar que as bactérias Gram-positivas apresentaram uma maior suscetibilidade ao OE em comparação com às Gram-negativas. Isso ocorre devido à presença de uma membrana externa complexa rica em lipopolissacarídeo (LPS) nas Gram-negativas, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. Por outro lado, as Gram-positivas possuem uma parede de peptidoglicano mais densa, o que permite um maior acesso das moléculas antimicrobianas à membrana celular. Adicionalmente, as extremidades lipofílicas do ácido lipoteicoico presentes na parede celular das Gram-positivas podem facilitar a infiltração de compostos hidrofóbicos dos OE [35, 36, 37].

Ao comparar as diferenças encontradas no efeito antibacteriano dos OE testados, deve-se levar em consideração as características biológicas e metodológicas dos testes. Alguns aspectos importantes a se considerar são: concentração de inóculo bacteriano, tempo e temperaturas de incubação, disponibilidade de oxigênio, o meio de cultura, espessura e uniformidade do ágar, o pH que deve permitir o crescimento microbiano e ser compatível com a atividade e estabilidade das substâncias testadas; disponibilidade de oxigênio. Além disso, observa-se que as diferenças nos dados encontrados nos estudos podem ser explicadas pela diferença na composição dos OE,

que podem mudar dependendo de fatores bióticos e abióticos como: genética, temperatura, luminosidade e sazonalidade do local de plantio, estágio de desenvolvimento, horário de coleta da planta, água, nutrição e processamento pós-colheita [17, 22].

3.2 Associações dos OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. e determinação da concentração inibitória fracionária (FIC) sobre células planctônicas

A combinação de OE derivados de diferentes espécies de plantas pode ser considerada uma alternativa viável para aumentar a eficácia desses compostos [17, 19, 22]. A associação tem como objetivos redução de toxicidade de dosagens individuais e aumento de eficácia no tratamento, podendo a associação ser classificada como: sinérgica (interação positiva), aditiva (interação positiva), antagônica (interação negativa) e sem interação (mesmo resultado produzido individualmente).

Após analisar e determinar os valores de CIM para cada OE foi-se determinado a FIC seguindo os padrões da metodologia do *checkerboard*. Este método é baseado no princípio de combinar diferentes OE em diferentes concentrações em uma microplaca de 96 poços, diluindo em série os OE a partir dos CIM para um determinado microrganismo. Os resultados do FIC contra *S. aureus* e *E. faecalis* estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Associação dos óleos essenciais (OE) *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. e suas interações frente aos cocos Gram-positivos.

Linhagens	CIMA combinado	CIMb combinado	FICa	FICb	FIC	Interação
<i>S. aureus</i>	0,195 mg/mL	3,125 mg/mL	0,125	0,250	0,375	Sinérgica
<i>E. faecalis</i>	0,390 mg/mL	0,780 mg/mL	0,250	0,500	0,750	Aditiva

a = OE de *M. piperita* L.; b = OE de *E. globulus*; FICa = CIMA/CIM do OE de *M. piperita* L. isolado; FICb = CIMb/CIM do OE de *E. globulus* isolado; FIC = FICa + FICb.

O efeito combinatório de dois OE na atividade bacteriana ocorre quando a utilização desses compostos em conjunto apresenta uma atividade antimicrobiana maior do que a esperada quando são usados separadamente [35]. Uma combinação é classificada como sinérgica quando a atividade resultante das substâncias combinadas é superior à soma de suas atividades individuais. Por outro lado, o efeito aditivo é observado quando o efeito da combinação é equivalente à soma dos efeitos individuais [38]. Neste estudo, foi observado um efeito sinérgico na associação dos OE de *M. piperita* L. ($\frac{1}{8}$ x CIM) + *E. globulus* ($\frac{1}{4}$ x CIM) para *S. aureus* e efeito aditivo quando combinado os OE de *M. piperita* L. ($\frac{1}{4}$ CIM) + *E. globulus* ($\frac{1}{2}$ x CIM) para *E. faecalis*. Esses resultados podem ser justificados pela presença de compostos orgânicos voláteis nos OE, cada um com atividades antimicrobianas distintas, e que quando utilizado em associação ampliam os alvos de ação [38, 39].

M. piperita L. contém compostos como mentol e mentona, que possuem atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos [38]. *E. globulus* contém compostos como 1,8-cineol, que também apresenta atividade antimicrobiana. Quando esses OE são combinados, há uma sinergia entre os compostos, o que potencializa a atividade antimicrobiana, levando a uma maior eficácia na eliminação de microrganismos. Essa sinergia pode ser explicada pelo fato de que os compostos presentes podem atuar em diferentes alvos celulares dos microrganismos, o que aumenta a eficácia [35]. Adicionalmente, a combinação de OE pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento de resistência bacteriana, uma vez que os microrganismos podem ter dificuldade em desenvolver resistência a múltiplos compostos atuando em diferentes alvos celulares [38, 40]. Esta abordagem combinada representa uma estratégia promissora no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos de origem natural.

3.3 Efeitos dos OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. isolados e em associação na inibição de biofilme bacteriano

As bactérias podem formar biofilmes como uma estratégia de sobrevivência e persistência, frente as diferentes pressões seletivas do meio ambiente [41]. Os biofilmes são considerados comunidades microbianas complexas, envoltas por uma matriz extracelular, que se estabelecem em superfícies bióticas e abióticas [42]. Quando há o estabelecimento de um biofilme bacteriano é observada uma maior resistência das células bacterianas à presença de quaisquer condições de estresse ou às defesas do sistema imunológico do hospedeiro, do que seus equivalentes plactônicos. Além de representar um sério problema na área da saúde, a formação de biofilme também impacta na área industrial por ser uma das principais causas da bioincrustação na linha de produção industrial [10].

Nas condições testadas, *S. aureus* e *E. faecalis* apresentam fenótipo de formador de biofilme moderadamente aderente (Tabela 5). Os resultados indicam que o tratamento com os OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. isolados ou a associação combinada deste reduziu significativamente a adesão celular inicial dos CGP ($p < 0,0001$), demonstrando um potencial antibiofilme dos OE (Figura 1). Após o tratamento com os OE isolados ou a associação dos óleos, o biofilme formado foi reclassificado como pouco aderente para ambos CGP (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização fenotípica do biofilme formado por *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* na ausência e na presença dos OE *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. isolados e em associação.

Linhagens	OD _{590nm} (fenótipo do biofilme)			
	Sem tratamento	<i>E. globulus</i>	<i>M. piperita</i> L.	<i>M. piperita</i> L. + <i>E. globulus</i>
<i>S. aureus</i>	0,199 (aderência moderada)	0,100 (pouco aderente)	0,132 (pouco aderente)	0,108 (pouco aderente)
<i>E. faecalis</i>	0,167 (aderência moderada)	0,066 (pouco aderente)	0,109 (pouco aderente)	0,095 (pouco aderente)

Para *S. aureus*, o efeito anti-adesão promovido pelo tratamento com os OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. isolados e em associação causou uma redução de 33,6%, 49,74% e 45,72%, respectivamente, entretanto não foi observada diferença estatística (Figura 1A). Para *E. faecalis*, o tratamento com o OE de *E. globulus* isolado promoveu uma inibição de 60,47%, enquanto o OE de *M. piperita* L. reduziu a formação do biofilme em 34,73%. A associação de ambos os óleos causou uma inibição de 43,11%, porém sem diferença estatística quando comparado aos óleos isolados (Figura 1B).

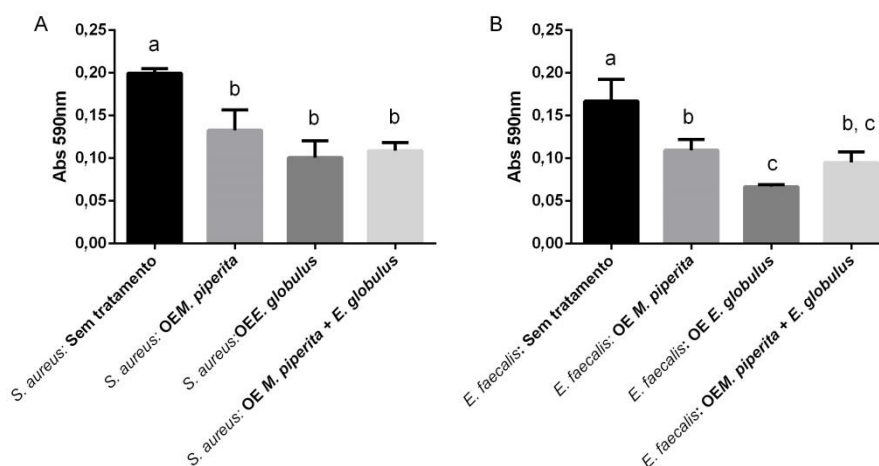


Figura 1: Efeito dos OE *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. isolados e em associação na inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* (A) e *Enterococcus faecalis* (B). Os resultados são média \pm desvio padrão. Diferentes letras dentro dos grupos bacterianos indicam diferença significativa.

Neste estudo, a associação combinatória dos óleos não resultou em uma ação antibiofilme mais potente quando comparada ao efeito dos OE individualmente (Figura 1). Isto pode ser explicado pela menor concentração dos OE que foi utilizado para avaliar o efeito antibiofilme da sinergia dos óleos, uma vez que estes testes foram conduzidos utilizando concentrações subinibitórias (variando de $\frac{1}{8}$ – $\frac{1}{4}$ x CIM para *M. piperita* L. e $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ x CIM para *E. globulus*) em relação à concentração usada para testar o OE isoladamente (1x CIM). Desta forma, percebe-se que a associação de OE pode potencializar a eficácia e otimizar o efeito inibidor no desenvolvimento microbiano, reduzindo a concentração do agente antimicrobiano utilizado [39, 43]. Além disso, o uso de substâncias combinadas pode melhorar a biodisponibilidade dos agentes antimicrobianos e ampliar os alvos de ação, reduzindo o tempo de uso e a dosagem do agente antimicrobiano, apresenta-se como uma alternativa aos protocolos de terapia antimicrobiana existentes [44-46].

Além disso, vale destacar que o método *in vitro* utilizado para avaliar a formação de biofilme não representa com precisão as condições presentes nos diversos ambientes. Fora do ambiente *in vitro*, há uma interação complexa entre o meio ambiente e o patógeno, a qual não pode ser facilmente reproduzida. Variações de temperatura, umidade, população microbianas e a influência de xenobióticos podem ocasionar alterações metabólicas nos microrganismos, respostas ao estresse, interrupção da comunicação interbacteriana, aumento da mutabilidade e troca de material genético [47].

Este estudo fornece evidências que indicam o potencial uso destes OE como insumo para o tratamento de infecções bacterianas (complementando a ação de antimicrobianos) e desinfecção de áreas contaminadas (quando incluídos em sanitizantes) devido à sua atividade antibiofilme. No entanto, para uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis por essas atividades, bem como para elucidar possíveis mecanismos de toxicidades associados, estudos complementares são necessários. Essas investigações adicionais contribuirão significativamente para a consolidação do potencial clínico desses OE, estabelecendo assim sua relevância no campo da terapia antimicrobiana.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo são promissores, mostrando que os OE de *E. globulus* e *M. piperita* L. possuem capacidade de inibir bactérias em sua forma planctônica. Além disso, a combinação de OE apresentou atividade sinérgica e aditiva contra CGP testados, demonstrando seu potencial para otimizar a eficácia antimicrobiana. Embora a combinação de OE não tenha resultado em uma ação antibiofilme mais efetiva do que o uso individual, a utilização de concentrações subinibitórias em combinação pode ser uma estratégia promissora para reduzir a concentração do

agente antimicrobiano utilizado e otimizar o efeito inibitório sobre o crescimento microbiano. Esses achados enfatizam a necessidade de continuar explorando as interações entre os OE e suas concentrações para desenvolver novas terapias antibacterianas mais eficazes e sustentáveis.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sizar O, Unakal CG. Gram positive bacteria. In: Panneerselvam D, Vaqar S. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Statpearls Publishing; 2021 [citado em 24 abr 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557457/>
2. Podbielski A, Kreikemeyer B. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis*. 2004 Mar;8(2):81-95. doi: 10.1016/j.ijid.2003.04.001
3. Ruhul R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res*. 2021 Oct;(251):126829. doi: 10.1016/j.micres.2021.126829
4. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, 2020 Jun;25(12):2888. doi: 10.3390/molecules25122888
5. World Health Organization (WHO). World antimicrobial awareness Week. WHO [Internet]; 18-24 nov 2020 [citado em 24 abr 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week/2020>
6. Munita JM, Bayer AS, Arias CA. Evolving resistance among Gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis*. 2015 Sep;61(Suppl2):S48-57. doi: 10.1093/cid/civ482
7. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*, 2021 Oct;10(10):1310. doi: 10.3390/pathogens10101310
8. Resende JA, Fontes ENR, Rosa RC, Gava LD, Fernandes FJN, Ignacchiti MDC. Potencial antimicrobiano e antibiofilme de *Eucalyptus globulus* e *Mentha piperita* L. e a associação com antimicrobianos comerciais. *Scientia Plena*. 2022 nov;18(11):114501. doi: 10.14808/sci.plena.2022.114501
9. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2010 Nov;83(2):89-105. doi: 10.1016/j.mimet.2010.08.018
10. El-Tarabily KA, El-Saadony MT, Alagawany M, Arif M, Batiha GE, Khafaga AF, Elwan HAM, et al. Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi J Biol Sci*. 2021 Sep;28(9):5145-56. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.05.033
11. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
12. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Jan;14:111-29. doi: 10.1038/nrd4510
13. Elangovan S, Mudgil P. Antibacterial properties of *Eucalyptus globulus* essential oil against MRSA: A systematic review. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Mar;12(3):474. doi: 10.3390/antibiotics12030474
14. Yilmaztekin M, Lević S, Kalušević A, Cam M, Bugarski B, Rakić V, Nedović V. Characterisation of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil encapsulates. *J Microencapsul*. 2019 Mar;36(2):109-19. doi: 10.1080/02652048.2019.1607596
15. Hafsa J, Ali Smach M, Khedher MRB, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H, et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT*. 2016 May;(68):356-64. doi: 10.1016/j.lwt.2015.12.050
16. Said ZBOS, Haddadi-Guemghar H, Boulekbache-Makhlouf L, Rigou P, Remini H, Adjaoud A, et al. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Ind Crops Prod*. 2016 Oct;(89):167-75. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.05.018
17. Soltanbeigi A, Özgüven M, Hassanpouraghdam MB. Planting-date and cutting-time affect the growth and essential oil composition of *Mentha piperita* and *Mentha arvensis*. *Ind Crops Prod*. 2021 Oct;(170):113790. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113790

18. Eslahi H, Fahimi N, Sardarian AR. Chemical composition of essential oils: chemistry, safety and applications. In: Hashemi SMB, Khaneghah AM, Sant'Ana AS, editor(s). Essential oils in food processing. Nova Jersey (US): John Wiley & Sons; 2017. p. 119-171. doi: 10.1002/9781119149392.ch4.
19. Nikolic I, Vukovic D, Gavric D, Cvetanovic J, Aleksic Sabo V, Gostimirovic S, et al. An optimized checkerboard method for phage-antibiotic synergy detection. *Viruses*. 2022 Jul;14(7):1542. doi: 10.3390/v14071542
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-S25). 25 th ed. Wayne (PA): CLSI; 2015.
21. Benzaid C, Lazhari T, Ryad D, Mahmoud R. Evaluation of the chemical composition, the antioxidant and antimicrobial activities of *Mentha piperita* essential oil against microbial growth and biofilm formation. *TEOP*. 2019 Jun;22(2):335-46. doi: 10.1080/0972060X.2019.1622456
22. Jadhav S, Shah R, Bhavne M, Palombo EA. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria planktonic* cells and biofilms. *Food Control*. 2013 Jan;29(1):125-30. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.071
23. Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr;40(2):175-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6
24. Singh R, Shushni MAM, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab J Chem*. 2015 May;8(3):322-8. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.01.019
25. Ghabraie M, Vu KD, Tata L, Salmieri S, Lacroix M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT*. 2016 Mar;(66):332-9. doi: 10.1016/j.lwt.2015.10.055
26. Ali T, Anjum AA, Sattar MMK, Ali MA, Kamran M, Tariq M, et al. Antibacterial activity of plant essential oils against indigenously characterized methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Trop Biomed*. 2022 Mar;39(1):17-25. doi: 10.47665/tb.39.1.005
27. Bouras M, Abbaci NB, Bennadja S. Antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globulus* against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharmacogn. Pharm. Res.*. 2016;8(10):1717-21.
28. Čmiková N, Galovičová L, Schwarzová M, Vukic MD, Vukovic NL, Kowalczewski PŁ, Bakay L, Kluz MI, Puchalski C, Kačaniová M. Chemical composition and biological activities of *Eucalyptus globulus* essential oil. *Plants*. 2023 Feb;12(5):1076. doi: 10.3390/plants12051076
29. Bazargani MM, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 2016 Mar;(61):156-64. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.09.036
30. Göger G, Karaca N, Büyükkiliç B, Demirci B, Demirci F. In vitro antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory evaluation of *Eucalyptus globulus* essential oil. *Nat Volatiles Essent Oils*. 2020;7(3):1-11. doi: 10.37929/nveo.759607
31. Talei GR, Mohammadi S, Fazeli MR, Sahranavard S, Mirkhani H. Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int J Pharm Investig*. 2017 Apr-Jun;7(2):82-7. doi: 10.4103/jphi.JPHI_18_17
32. De Miranda DM, Rocha MP. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Braz J H Pharm*. 2022 Jul;4(1):27-38. doi: 10.29327/226760.4.1-3
33. Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 2011 May;126(1):228-35. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.002
34. Bernatová S, Samek O, Pilát Z, Jonáš A, Zemánek P, Třešňák O. Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules*. 2013 Nov;18(11):13188-99. doi: 10.3390/molecules181113188
35. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines (Basel)*. 2017 Aug;4(3):58. doi: 10.3390/medicines4030058
36. El Moussaoui A, Jawhari FZ, Almehti AM, Elmsellem H, Benbrahim KF, Bousta D, et al. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*. *L. Bioorg Chem*. 2019 Dec;(93):103337. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103337
37. Chen H, Davidson PM, Zhong Q. Impacts of sample preparation methods on solubility and antibacterial characteristics of essential oil components in milk. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Feb;80(3):907-16. doi: 10.1128/AEM.02696-13

38. Merradi M, Heleili N. Screening for antibacterial activity of some essential oils and evaluation of their synergistic effect. *Int J Biosci.* 2018 Apr;12(4):292-301. doi: 10.12692/ijb/12.4.291-300
39. Goudarzian A, Pirbalouti AG, Hossaynzadeh M. Menthol, balance of menthol/menthone, and essential oil contents of *Mentha Piperita* L. under foliar-applied chitosan and inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *TEOP.* 2020 Dec;23(5):1012-21. doi: 10.1080/0972060X.2020.1828177
40. Rajkumar V, Gunasekaran C, Christy IK, Dharmaraj J, Chinnaraj P, Paul CA. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. *Pestic Biochem Physiol.* 2019 May;(156):138-44. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.02.016
41. Satpathy S, SenGupta S, Mishra PK, Ahirwar B. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2016 Jul;(7):56-66. doi: 10.1016/j.bcab.2016.05.002
42. Zhao YQ, Zhang L, Tao J, Chi CF, Wang B. Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): Isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Food Res Int.* 2019 Jul;(121):197-20. doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.035
43. Iseppi R, Mariani M, Condò C, Sabia C, Messi P. Essential oils: A natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics (Basel).* 2021 Apr;10(4):417. doi: 10.3390/antibiotics10040417
44. Sharma K, Guleria S, Razdan VK, Babu V. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Ind Crops Prod.* 2020 Oct;(154):112569. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112569
45. Owen L, Webb JP, Green J, Smith LJ, Laird K. From formulation to in vivo model: A comprehensive study of a synergistic relationship between vancomycin, carvacrol, and cuminaldehyde against *Enterococcus faecium*. *Phytother Res.* 2020 Jul;34(7):1638-49. doi: 10.1002/ptr.6631
46. Van Vuuren S, Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med.* 2011 Jul;77(11):1168-82. doi: 10.1055/s-0030-1250736
47. Fernández-Barat L, Ben-Aicha S, Motos A, Vila J, Marco F, Rigol M, et al. Assessment of in vivo versus in vitro biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from endotracheal tubes. *Scientific Reports.* 2018 Aug;8(1):11906. doi: 10.1038/s41598-018-30494-7