

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**  
**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANNA CAROLINA MILTOS VALIENTE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum***

**DOURADOS-MS**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**  
**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANNA CAROLINA MILTOS VALIENTE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal da Grande Dourados, como parte  
das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia,  
da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a  
orientação da prof<sup>a</sup>. Dra. Simone Simionatto.

Co-orientadora: Suzana Meira Ribeiro

Área de concentração: Microbiologia

**DOURADOS-MS**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

V172a Valiente, Anna Carolina Miltos  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Protium  
heptaphyllum* [recurso eletrônico] / Anna Carolina Miltos Valiente. -- 2021.  
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Simone Simionatto.

Coorientadora: Suzana Meira Ribeiro.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Biofilme. 2. multirresistente. 3. *Acinetobacter baumannii*. 4. *Protium heptaphyllum*. I. Simionatto, Simone. II. Ribeiro, Suzana Meira. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**Anna Carolina Miltos Valiente**

**TÍTULO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME  
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum***

Trabalho de Conclusão de Curso  
aprovado pela Banca Examinadora como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia, da Universidade  
Federal da Grande Dourados.

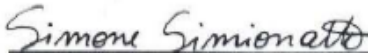
Orientador: Simone Simionatto

Co-orientadora: Suzana Meira Ribeiro

Área de Concentração: Microbiologia

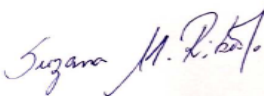
Aprovado em: 10/12/2020

**BANCA EXAMINADORA**



---

Simone Simionatto  
Presidente



---

Suzana Meira Ribeiro  
Membro



---

Luana Rossato  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à Profa. Dra. Simone Simionatto, pela disposição em esclarecer as dúvidas e sempre aconselhando de maneira excepcional nos devidos rumos deste trabalho, assim como minha co-orientadora Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro por me auxiliar e orientar em todo o experimento realizado, além de todo o incentivo para concluir o trabalho.

Agradeço aos meus pais, Valéria Aparecida Miltos e Rigoberto Antônio C. Valiente, pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos de estresse e ausência.

Aos meus irmãos, Igor, Larissa, Maria e Júnior, pela confiança em minha pessoa acreditando sempre no meu potencial e sempre apoiando com palavras de livre disposição e motivacionais.

Agradeço também, aos meus queridos colegas de laboratório que muito me ajudaram durante essa trajetória. Sempre bem animados e dispostos a ajudar. E enfim, a todos que contribuíram para realizar esse trabalho, seja de forma direta ou indireta.

**Muito Obrigada!**

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1:</b> Principais fatores de virulência envolvidos em <i>A. baumannii</i> .....	15
<b>Figura 2:</b> Etapas da formação de biofilme em <i>Ab</i> -MDR .....	16
<b>Figura 3:</b> Principais fatores associados à formação de biofilme em <i>Ab</i> -MDR que incluam PNAG, proteína associada ao biofilme (BAP), sistema de secreção de acompanhante, Pili e detecção de quórum .....	18
<b>Figura 4:</b> Biofilmes incorporados em cateter uretral .....	19
<b>Figura 5:</b> Infecções causadas por biofilmes .....	19
<b>Figura 6:</b> etapas dos ensaios realizados para a obtenção da formação de biofilmes em diferentes meios de cultura.....	25
<b>Figura 7:</b> etapas dos ensaios realizados para a obtenção atividade antibiofilme nos óleos essenciais.....	26
<b>Figura 8:</b> Crescimento de planctônico e de biofilme de <i>A. baumannii</i> multirresistente em diferentes meios nutritivos. A significância estatística foi determinada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste posthoc de Tukey para comparar o crescimento bacteriano em distintos meios de cultura (*, $P = 0,0123-0,03$ ; **, $P \leq 0,0024$ ; ***, $P = 0,0004$ ; **** $P < 0,0001$ ).....	28
<b>Gráfico 1:</b> Efeito do óleo essencial de <i>P. heptaphyllum</i> em células planctônicas e na formação de biofilme em diferentes níveis de concentração (% v/v) eixo Y, lidas em espectrofotômetro (595 nm).....	29

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** representa a correlação entre a densidade óptica (D.O) e unidade formadora de colônia (UFC), estimando a quantidade inserida no experimento.....27

## RESUMO

O controle à infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente ainda é um desafio para a saúde pública, uma vez que esse patógeno possui mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência, além de estar envolvido com aumento de taxa de morbidade e mortalidade principalmente em ambiente hospitalar. A Organização Mundial da Saúde designou *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos como grupo prioritário para pesquisa que visem o controle de sua disseminação bem como para o desenvolvimento de novos antibióticos capazes de controlar a infecção causada por este patógeno. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibiofilme do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Breu branco) frente a isolados clínicos de *A. baumannii* multirresistente. Para a formação da unidade formadora de colônia (UFC), a diluição foi realizada em 1:100 (v/v) de culturas crescidas por 20 h de 8 cepas de *A. baumannii* multirresistente e apresentaram uma concentração de  $8 \times 10^5$  -  $2,3 \times 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>. A capacidade de formação de biofilme entre as cepas foi determinada em três meios de culturas: Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion, BHI), Caldo Mueller Hinton (MH) e Caldo de Soja Triptonada (Trypticase Soy Broth, TSB). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de *P. heptaphyllum* contra as cepas de *A. baumannii* multirresistente através da microdiluição em caldo MH. Observou-se também que houve uma maior tendência de formação de biofilme no meio BHI, e uma menor tendência de formação de biofilmes em meio TSB, sugerindo que diferenças em nutrientes podem influenciar a formação de biofilmes. O crescimento planctônico e a formação de biofilmes foram variáveis entre os isolados, quando considerado o mesmo meio de cultura, sugerindo que variações genéticas ou plasticidade fenotípica podem influenciar no crescimento de *A. baumannii* multirresistente. A diluição de 0,25% do óleo foi capaz de inibir células planctônicas de *A. baumannii* multirresistente, demonstrando eficácia antimicrobiana. A incapacidade de formar biofilme nessa mesma concentração e total capacidade de crescimento planctônico e formação de biofilmes em concentrações menores que 0,25% (v/v), indica a inexistência de atividade antibiofilme do óleo de *P. heptaphyllum*. Desta forma, esse óleo poderia potencialmente ser útil para combater bactérias resistentes oriundas de infecções de pele, por meio de pomadas ou para desinfecção de superfícies, porém, além de *A. baumannii* multirresistente, análises com outras espécies bacterianas precisam ser realizadas, assim como a segurança biológica do óleo.

**Palavras chave:** Biofilme; multirresistente; *Acinetobacter baumannii*; *Protium heptaphyllum*.



## ABSTRACT

Controlling infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is yet a challenge for public health, once this pathogen has intrinsic and acquired resistance mechanisms, being involved with morbidity and mortality rate increase in hospital environment. World Health Organization nominated carbapenem resistant *A. baumannii* as a priority group for research aiming dissemination control as well as new antibiotic development to control the infections caused by this pathogen. The objective of this study was to evaluate *Protium heptaphyllum* (white pitch) essential oil antibiofilm activity against clinical isolates of *A. baumannii* multidrug-resistant. A dilution 1:100 (v/v) of 20-hour grown cultures from eight *A. baumannii* multidrug-resistant strains presented a concentration of  $8 \times 10^5$  -  $2,3 \times 10^6$  cfu.mL<sup>-1</sup>. Biofilm formation capability of the analyzed strains was determined in three culture means: Brain Heart Infusion (BHI), Mueller Hinton broth (MH) and Trypticase Soy Broth (TSB). Planktonic growth and biofilm formation were variable among the isolates when considering the same culture mean, suggesting that genetic variations or phenotypical plasticity can influence on multidrug-resistant *A. baumannii* growth. We also observed that there was a higher propensity of biofilm formation in BHI, and a lower propensity in TSB, suggesting that nutrient differences can influence on biofilm formation. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *P. heptaphyllum* oil against *A. baumannii* multidrug-resistant strains was determined using microdilution in MH broth. 0,25% dilution of the oil was capable to inhibit multidrug-resistant *A. baumannii* planktonic cells, showing antimicrobial activity. Incapability of biofilm production in this concentration and maintenance of total planktonic growth capability and biofilm formation in concentrations lower than 0,25% (v/v) indicate the absence of *P. heptaphyllum* oil antibiofilm activity. Thus, this oil could be useful to treat skin infections via ointment compounds or to disinfect surfaces; however, besides multidrug resistant *A. baumannii*, antimicrobial activity against other bacterial species needs to be analyzed, as well as the biological safety of the oil.

**Keywords:** Biofilm; multiresistant; *Acinetobacter baumannii*; *Protium heptaphyllum*

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÃO .....	5
LISTA DE TABELAS .....	6
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 HISTÓRICO DO SURGIMENTO DA <i>ACINETOBACTER BAUMANNI</i> .....	13
2.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA .....	14
2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	16
2.4 ADERÊNCIA DE BIOFILME A.b-MDR HOSPITALAR EM CONDIÇÕES ADEQUADAS DE CRESCIMENTO .....	18
2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL .....	20
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1 ISOLADOS BACTERIANOS .....	23
4.2 ÓLEO ESSENCIAL DE PROTIIUM HEPTAPHYLLUM.....	23
4.3 DETERMINAÇÃO DA UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC).....	23
4.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS.....	24
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME .....	25
5. RESULTADOS.....	27

5.1 CORRELAÇÃO ENTRE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC) E DENSIDADE ÓPTICA.....	27
5.2 EFEITO DO MEIO DE CULTURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	27
5.3 EFEITO ANTIBIOFILME DE ÓLEO ESSENCIAL CONTRA <i>A. BAUMANNII</i> MULTIRRESISTENTE.....	28
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS.....	34

## 1. INTRODUÇÃO

O controle das infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente ainda é um desafio para a saúde pública, uma vez que esse patógeno possui mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência, incluindo bombas de efluxo, porinas, lipopolissacarídeos (LPS), cápsulas polissacarídicas, fosfolipase, secreção de sistemas de proteínas,  $\beta$ -lactamases e formação de biofilme (SKARIYACHAN, 2019). Com isso, *A. baumannii* multirresistente contém diversos mecanismos de resistência, que podem eliminar a atividade de diferentes classes de antibióticos (BUTLER et al. 2019).

Uma característica relevante em patógenos oportunistas como *A. baumannii* multirresistente é a formação de biofilme. Células bacterianas em biofilmes, que se formam tanto em superfícies bióticas ou abióticas, apresentam contato íntimo. Em biofilmes, as células apresentam-se incorporadas em uma substância polimérica extracelular (EPS), uma matriz de produção própria (Zhang et al. 2018), podendo haver canais que auxiliam no transporte de nutrientes e sinais (Davies, 2003; Romling e Balsalobre, 2012; Haussler e Fuqua, 2013).

Biofilmes podem se formar nos mais diversos ambientes, desde que sejam favoráveis e tenham condições nutricionais adequadas (Wilks et al, 2006; Morgan et al, 2010). Os biofilmes têm a capacidade de se aderir em qualquer parte do corpo humano, como por exemplo, dentes, pulmões, feridas e sistema urinário. *A. baumannii* multirresistente possui uma predileção por pacientes com feridas abertas, imunocomprometidos ou idosos, e existe uma relação dessa contaminação entre essa bactéria e o uso de equipamentos médicos pelos pacientes, como cateteres, ventiladores, drenos ventriculares externos e até as luvas (Peleg et al., 2008; Park et al., 2013). Estima-se que aproximadamente 80% dos casos de doenças infecciosas nos seres humanos estão diretamente relacionadas a biofilmes patogênicos (JORGE, 2012; Harriot e Noverr, 2011). Alguns fatores genéticos, como a transferência de genes e o envolvimento da matriz celular contribuem para o aumento da tolerância dos biofilmes, tornando-os mais resistentes ao tratamento com antibióticos (Kart et al; 2014).

A falta de antibióticos existentes no gerenciamento de infecções causadas por organismos MDR aumentou o interesse em alternativas para tratamento. Isso é demonstrado pela amplitude de estudos publicados na área de antimicrobianos naturais, especialmente os efeitos antimicrobianos de óleos essenciais de origem vegetal (Adukwu et al, 2016). Os óleos essenciais podem restaurar a sensibilidade aos

antibióticos, diminuir a dose efetiva de antibióticos, estender o espectro antimicrobiano e reduzir o custo da terapia anti-infecciosa (Fadli et al. 2012). As plantas aromáticas e seus óleos essenciais são cada vez mais exploradas e utilizadas como agentes antimicrobianos e aromatizantes devido a seus conteúdos terpenóides e fenólicos variáveis (Helander et al, 1998). Devido a essas características, as plantas podem desempenhar um papel terapêutico importante. Alguns estudos mostram que compostos de plantas podem inibir o crescimento de microrganismos, mediante atuação em diferentes alvos bacterianos. Isso pode limitar a seleção de determinantes de resistência (Sharma et al, 2016). Os óleos essenciais podem agir como antifúngicos, agentes antivirais e inseticidas, antibacterianos e antibiofilme (Burt 2004).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO DO SURGIMENTO DA *ACINETOBACTER BAUMANNII*

*A. baumannii* é pertencente à família *Moraxellaceae* da classe *Proteobacteria*, são cocobacilos, Gram-negativos aeróbicos de natureza onipresente, não fermentativo, não esporulado, o que é notório por sua capacidade de sobreviver em várias condições ambientais (Evans et al, 2013). Existem várias espécies de *Acinetobacter sp.* (CHAN et al, 2012), porém, a espécie de *Acinetobacter baumannii* é a mais frequente em processos infecciosos em humanos (Munoz-Price, 2008).

Durante a guerra entre Iraque e Afeganistão, tendo início em 2001, foi necessário o auxílio do exército militar, este por sua vez voltava da guerra com fraturas expostas, feridas abertas e inúmeras lesões causadas durante este evento. Esse contexto, fez com que esses soldados necessitassem de um local para tratamento médico na zona de guerra. Entretanto, esses locais apresentavam uma pobre higienização. Essa situação favorecia infecções por *A. baumannii*, também conhecida como "Iraqibacter" causando pneumonia, infecções de pele e tecidos moles, meningite, etc (DIJKSHOORN et al, 2007).

Atualmente, *A. baumannii* multirresistente é considerado um problema em centros de cuidado à saúde no mundo todo. Em 2017, *A. baumannii* multirresistente foi citado como prioridade entre os patógenos resistente a antibióticos identificados pela Organização Mundial da Saúde como necessidade de mais pesquisas que visem a controle da sua disseminação (World Health Organization 2017). *A. baumannii* multirresistente faz parte do grupo de patógenos "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*), responsáveis por várias infecções hospitalares multirresistentes (MDR) (Costa et al, 2019, Boucher et al. 2009; RICE, 2008).

A disseminação de *A. baumannii* multirresistente ocorre de modo vertiginoso. Essa bactéria pode sofrer constantes modificações genéticas que levam a resistência de antibióticos e isso limita o tratamento (Willyard, 2017). Adicionalmente, apresenta uma alta capacidade para formação de biofilme. Quando em biofilmes *A. baumannii* multirresistente pode sobreviver a ambientes secos, tornando-se uma fonte de infecção,

especialmente para pacientes imunossuprimidos nas unidades hospitalar de terapia intensiva (Perez et al, 2007).

## 2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Unidades hospitalares ainda enfrentam dificuldades no combate às infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente, pois esse patógeno possui mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência, tornando-os uma das principais causas de morbidade e mortalidade (SKARIYACHAN, 2019). A resistência intrínseca está relacionada à característica da espécie, não necessitando de uma exposição a um antibiótico (DAVIES, DAVIES, 2010). Em contrapartida, a resistência adquirida está relacionada à pressão seletiva por determinado antibiótico, ocorrendo à seleção de cepas resistentes, ou seja, é uma alteração estrutural ou fisiológica na bactéria (PORTUGAL, 2014).

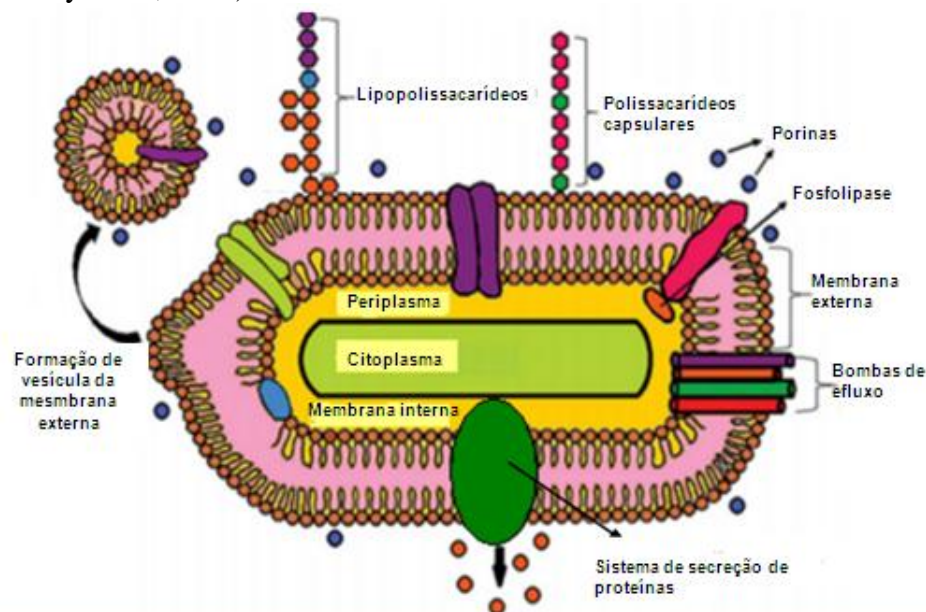
Atualmente, os carbapenêmicos são os antibióticos de escolha contra infecções por *A. baumannii* multirresistente. Porém, a resistência a carbapenêmicos está sendo relatada cada vez mais, deixando poucas opções terapêuticas disponíveis (Peleg, 2008; Walther-Rasmussen, 2006; Walsh, 2005). As enzimas carbapenemase pertencem as classificações dos tipos A, B e D. Os mais frequentes em *A. baumannii* multirresistente são *Carbapenem-Hydrolysing Class D  $\beta$ -lactamase* (CHDLs), também conhecidas como oxacilinases (OXAs) codificadas pelo gene blaOXA-like e em segundo lugar, metaloenzimas (MBL) como VIM, IMP e NDM (Walther-Rasmussen, 2006; Walsh, 2005). As enzimas de oxacilinases frequentemente encontradas em isolados de *A. baumannii* multirresistente estão divididas em quatro subgrupos filogenéticos: s OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like e OXA-58-like (MOSTACHIO, LEVIN, RIZEK, et al., 2012; KAMOLVIT, SIDJABAT, PATERSON, 2015, Woodford, 2006). Em vista disso, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) categorizou *Acinetobacter spp* multirresistente como uma ameaça séria, promovendo o monitoramento e contínuas atividades de prevenção na saúde pública (CDC, 2013).

Além disso, *A. baumannii* multirresistente contém alguns fatores que colaboram para sua virulência, dentre elas estão as porinas (como a proteína *ompA* e o *omp22*) encontrados nas superfícies das células ajudam na regulação da biogênese; lipopolissacarídeos formados na parte externa membrana desempenha um papel importante na sobrevivência; polissacarídeos capsulares encontrados na membrana

externa envolvidos em agentes antimicrobianos resistência; sistemas de secreção de proteínas transportam proteínas do espaço do periplasma para o extracelular para fora da célula; fosfolipase embutida na membrana envolvida no metabolismo do fosfolípido; vesículas de membrana externa agem como entrega sinais de bactérias para a célula hospedeira (Skariyachan, 2019) e estes, por sua vez, estão ilustrados na figura 1.

Portanto, a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana contra *A. baumannii* multirresistente é cada vez mais necessária (BUTLER et al. 2019). Para isso estudos de tratamentos incluem diversas terapias alternativas como o uso de peptídeos antimicrobianos, terapia com bacteriófagos, anticorpos antibacterianos, além do uso de antibióticos em combinação com adjuvantes, dentre outros. Isso se torna extremamente importante para facilitar o tratamento de doenças causadas pelo microrganismo (Mandal et al., 2014; Kaur, 2016).

**Figura 1:** Principais fatores de virulência presente em *A. baumannii* (adaptado de Skariyachan, 2019).



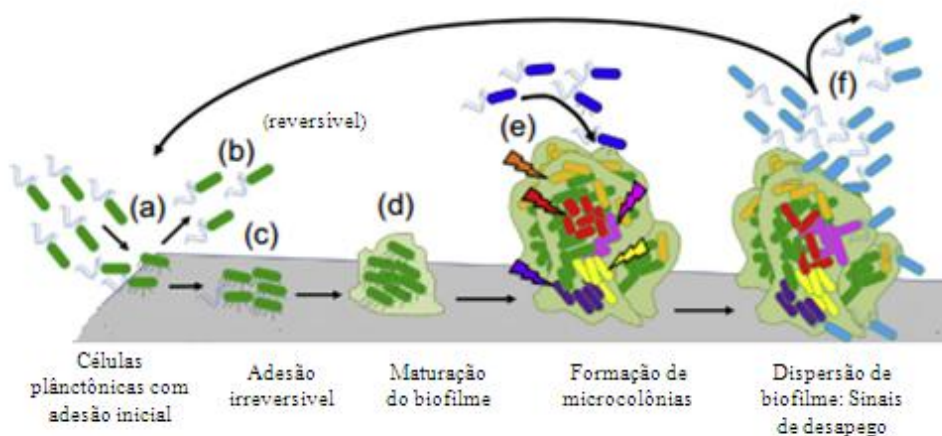
*A. baumannii* multirresistente forma comunidades de biofilme na maioria das superfícies abióticas, incluindo equipamentos associados à assistência médica, como tubo endotraqueal, bem como policarbonato e aço inoxidável (Greene et al, 2016). Essa bactéria pode usar estruturas como apêndices de superfície, adesinas, determinantes de virulência e resistência e estruturas de superfície protetoras, como polissacarídeos capsulares, contribuindo grandemente para a formação e manutenção de biofilmes (Harding & Hennon, & Feldman, 2018).



## 2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Uma característica relevante em patógenos oportunistas como *A. baumannii* multirresistente é a formação de biofilme. Células bacterianas em biofilmes, que se formam tanto em superfícies bióticas ou abióticas, apresentam contato íntimo (Zhang et al. 2018). Embora a primeira observação de bactérias associadas à superfície tenha sido feita por Anthony van Leeuwenhoek, em 1684, o termo "biofilme" só foi usado e definido em um relatório em 1978, por Costerton et al. (Bjarnsholt, 2011). Em biofilmes, as células apresentam-se incorporadas em uma substância polimérica extracelular (EPS), uma matriz de produção própria (Zhang et al. 2018). A capacidade de produção de fatores de virulência de *A. baumannii* multirresistente durante a fase de biofilme contribui para as várias etapas da ligação das células de biofilme nas superfícies (Gaddy & Actis, 2009). As bactérias na maioria dos ambientes vivem no modo de crescimento de biofilme, enquanto o estado planctônico é considerado uma fase de transição. A mudança de bactérias do modo de crescimento planctônico para o biofilme depende da produção de adesinas e componentes da matriz extracelular que envolvem as bactérias nos biofilmes (Tolker-Nielsen, 2015).

**Figura 2:** Etapas da formação de biofilme em *A. baumannii* multirresistente (adaptado de Floyd, 2017).



O mecanismo do ciclo de biofilme ocorre principalmente em cinco estágios. A capacidade de adesão inicial de bactérias planctônicas em superfícies abióticas depende da hidrofobicidade da superfície celular (Zhang et al. 2018). Então ocorre a produção de polímeros extracelulares, o que leva a uma adesão irreversível, onde ocorre com a

formação de microcolônias e maturação do biofilme, a massa celular tridimensional (3D) varia em sua bioarquitetura constituindo estruturas semelhantes a cogumelos. Durante a formação do biofilme, as bactérias produzem moléculas envolvidas em um fenômeno conhecido como quorum sensing (QS), que é definido como sistema de comunicação entre as células (Lopez et al. 2017; Wood et al. 2018) e utiliza-se para coordenar a expressão de múltiplos fatores de virulência e formação de biofilmes em *A. baumannii* multirresistente (Ahmed & Salih, 2019; Saipriya et al, 2019; Di Domenico et al, 2017). Pequenas moléculas chamadas de "sinais" geram QS pelas bactérias, produzindo a homoserina acilada lactonas (Di Domenico et al. 2017). A concentração de QS aumenta quando o número de células numa população aumenta, os receptores reconhecem as moléculas e iniciam a transdução de sinal que levam a expressão gênica, e esses sinais moleculares fizeram com que a população sobrevivesse e proliferasse. Com esse mecanismo de comunicação, as moléculas de QS ajudaram a manter o biofilme para regular a resistência a antibióticos em *A. baumannii* multirresistente (Zhang et al. 2018). A detecção de quorum sensing (QS) ocorre em uma densidade celular específica. Após isso, as células são destacadas e dispersas para colonizar novas regiões devido às forças físicas (Di Domenico et al. 2017).

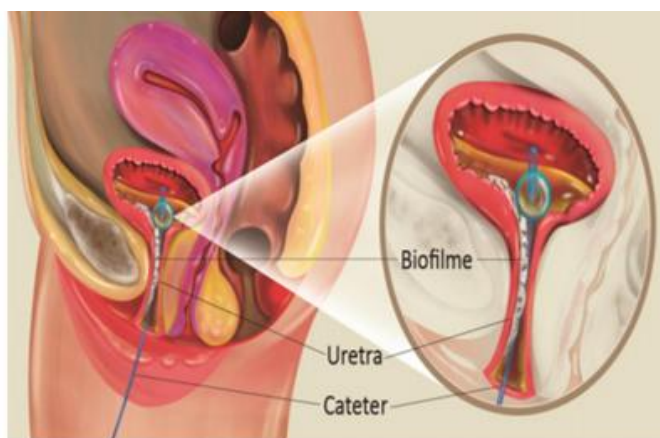
A formação de biofilme de *A. baumannii* multirresistente em superfícies abióticas é mediada por um complexo proteico chamado de Csu pili. O Csu pili é elaborado a partir de quatro subunidades de proteínas, CsuA/B, CsuC, CsuD e CsuE e com ajuda dessas pilis faz as bactérias resistirem a condições desfavoráveis (Tomaras et al, 2003). Além disso, existe a proteína associada ao biofilme (BAP) visa principalmente carboidratos, que mantém o complexo de biofilme (Zhang et al. 2018). É referida como alta proteína de peso molecular na superfície bacteriana, consistindo cerca de 8620 aminoácidos e funções no biofilme maturação e interações célula a célula (Wood et al. 2018) (fig. 2). A formação de biofilme tem um papel importante na sobrevivência das bactérias, causando maior tolerância à exposição a ácidos e/ou desidratação em *A. baumannii* multirresistente (Di Domenico et al, 2017).



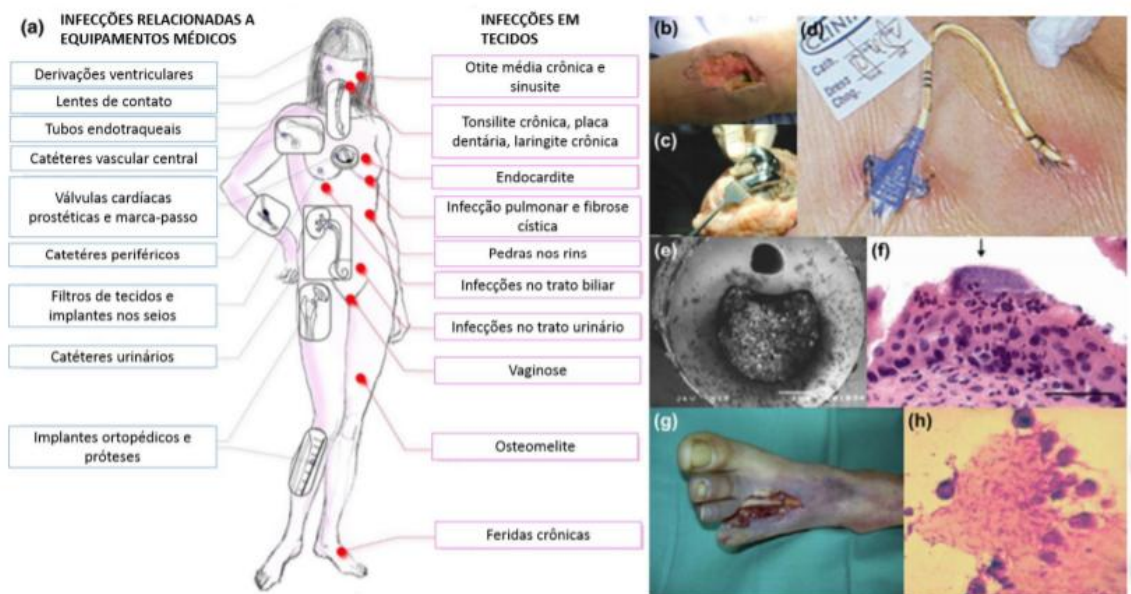
ventiladores, drenos ventriculares externos e até as luvas (Peleg et al., 2008; Park et al., 2013).

Os biofilmes podem se aderir, por exemplo, no canal da uretra até a bexiga, formando um biofilme ao longo do cateter urinário inserido no paciente, conforme demonstrado na figura 3 (LAMB, 2011). Os dispositivos invasivos estão associados a um maior índice de infecções hospitalares, porém, com a implementação de medidas de controle e vigilâncias referente à infecção hospitalar houve diminuição de 30 a 70% dos casos de infecções por equipamentos (MACIEL et al, 2016).

**Figura 4:** Biofilmes incorporados em cateter uretral (RÖMLING et al., 2014).



**Figura 5:** Infecções causadas por biofilmes (RÖMLING et al., 2014).



*A. baumannii* multirresistente permanece sendo um patógeno Gram negativo de difícil tratamento. A incapacidade de diagnosticar e otimizar infecções por *A. baumannii* multirresistente em tempo hábil, particularmente aquelas devido a fenótipos resistentes, repertório de mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência, falta de uso rotineiro de diagnóstico rápido apropriado, um número limitado de opções de tratamento eficazes (Vikas et al 2010) faz com que haja uma capacidade notável do microrganismo para persistir e se espalhar no ambiente hospitalar (Villegas & Hartstein, 2003; Lee et al., 2006; Rodriguez-Bano et al., 2008).

## **2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL**

Os óleos essenciais são misturas de compostos aromáticos voláteis gerados a partir de metabolismo secundário em plantas. Cada óleo essencial é composto vários componentes, que estão inclusos os terpenos e terpenóides incluindo derivados oxigenados, tais como aldeídos, cetonas, álcoois, éteres, ésteres e epóxidos (Bajpai e Baek, 2016). E as plantas aromáticas e seus óleos essenciais são cada vez mais exploradas como possível agente antiterapêutico, pois eles podem matar o microrganismo com diversos mecanismos de ação com chance mínima para as bactérias desenvolverem resistência a ela (Sharma et al, 2016). Além de desempenhar um papel importante na proteção das plantas, os óleos essenciais agem como antifúngico, agentes antivirais, inseticidas (Nazzaro et al, 2013; Alitonou et al, 2012; Burt 2004), assim como antibactericida e antibiofilme (Viktorová et al, 2020). Sendo que em sua estrutura tanto foliar, caulinar e radicular as plantas apresentam substâncias químicas, dentre elas estão os óleos essenciais como o elemento mais importante, sendo ele uma substância volátil, e quando utilizados em meios, vários estudos identificam a sua capacidade em conter o crescimento de fungos e bactérias, tornando um agente químico eficaz para tal uso (Gibbons, 2008; Vasconcelos et al, 2020; Viktorová, 2020; Dorman & Deans 2000). Os óleos essenciais podem restaurar a sensibilidade aos antibióticos, diminuir a dose efetiva de antibióticos, minimizando assim efeitos, estender o espectro antimicrobiano e reduzir o custo da terapia anti-infecciosa (Fadli et al. 2012, Hammoudi, Moubareck e Sarkis, 2014).

Tradicionalmente, as plantas têm sido consideradas fonte de novos medicamentos e estudos clínicos demonstrando o valor terapêutico dessas biomoléculas para a descoberta de novos produtos terapêuticos (ABREU et al, 2012). O óleo essencial

de *Protium heptaphyllum* já foi abordado em estudos relacionados à medicina popular por apresentar, em sua resina, compostos com atividade antiinflamatória e antimicrobiana (Sian, et al, 1999 & Bandeira, 2006). Essa planta pode ser conhecida como Almesca, amescla, breu branco dentre outros, além de ter sua origem na América do Sul (Corrêa, 1982) podendo ser encontrada com grande facilidade na Mata Atlântica no nordeste do Brasil (Nogueira et al, 2018). Durante sua extração, a partir de seu tronco, o *P. heptaphyllum* libera uma resina oleosa, chamada de breu branco, essa resina liberada contém compostos químicos como triterpenos da  $\alpha$ -*amyrina* (ursano) e  $\beta$ -*amyrin* (oleane) e um óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos (Pernet, 1972; Maia, 2000). E com o passar dos anos, óleo essencial da resina *P. heptaphyllum* teve um desfecho maior devido à sua composição química e possíveis atividades farmacológicas (Siani et al, 1999 & Oliveira et al, 2005). Desse modo, os óleos podem apresentar atividade antimicrobiana que não é derivada apenas de um único mecanismo de ação, mas de uma cascata de reações envolvendo toda a célula bacteriana por apresentar várias substâncias em diferentes estruturas químicas em sua composição (Burt 2004; Nazzaro et al. 2013).

### **3. OBJETIVO**

Prospectar a atividade antibiofilme do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* frente *A. baumannii* multirresistente.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar a padronização do teste de UFC com a densidade óptica das cepas de *A.baumannii* multirresistente; avaliar o crescimento de biofilme *A. baumannii* multirresistente em meio de cultura; verificar a capacidade de erradicação/inibição de biofilme de *A.baumannii* multirresistente em óleo essencial de *P. heptaphyllum*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

As bactérias de *A. baumannii* multirresistente utilizadas neste estudo foram isoladas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) e Unidade intermediária neonatal (NIU), de um hospital terciário de Dourados, Mato Grosso do Sul/MS, entre Setembro/2013 à Setembro/2015, devidamente numeradas e selecionadas de acordo com o local de coleta das bactérias, assim como apresentação da situação encontrada do paciente. A bactéria de número 22 foi coletada a partir de secreção traqueal, na qual o paciente veio a óbito; de número 35 por swab retal, se encontrava em recuperação; 58 e 65, por cateter e estavam em recuperação; 75 não foi informado; 103 foi coletado por swab retal e o paciente estava em recuperação; 153 coletado por swab nasal e o paciente veio a óbito e 185 coletado por urocultura e o paciente estava em recuperação. Todas as cepas apresentam a sequência de inserção IS*Abal* à montante do gene *bla*OXA-23 e o gene *bla*OXA-51 ou seja, as bactérias utilizadas são produtoras de carbapenemases (KPC) (MACIEL et al, 2016).

### 4.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *PROTIUM HEPTAPHYLLUM*

A resina do caule de árvores adultas de *Protium heptaphyllum* (Breu branco) foi coletada na região de Porto Seguro-BA, em bima Mata Atlântica e submetido ao processo de hidrodestilação na temperatura de 90°C, em aparelho tipo Clevenger, para extração do óleo essencial que foi caracterizado quimicamente por CG-EM. Foram identificados 32 compostos, sendo 7 majoritários: Pineno < $\alpha$ -> (~ 39,28%); Careno < $\delta$ -3-> (~21,31%); Pineno < $\beta$ -> (~9,77%); Sabineno (~9,24%); Cymeno < $\rho$ -> (~4,22%); Cineole <1,8-> (~2,65%); Terpinen-4-ol (~2,45%), sem variações significativas em função da temperatura de extração (Viktorová et al, 2020).

### 4.3 FORMAÇÃO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC)

Foi determinado a correlação de densidade óptica e unidade formadora de colônia (UFC) de cada uma das 8 estirpes hospitalares de *A. baumannii* multirresistente para estabelecer uma quantidade aproximada de bactérias inoculadas durante o experimento de susceptibilidade antimicrobiana. Para isso, foi realizada a cultura em meio Müller Hinton (MH) das cepas entre 18-24 horas. Após esse tempo, a cultura foi



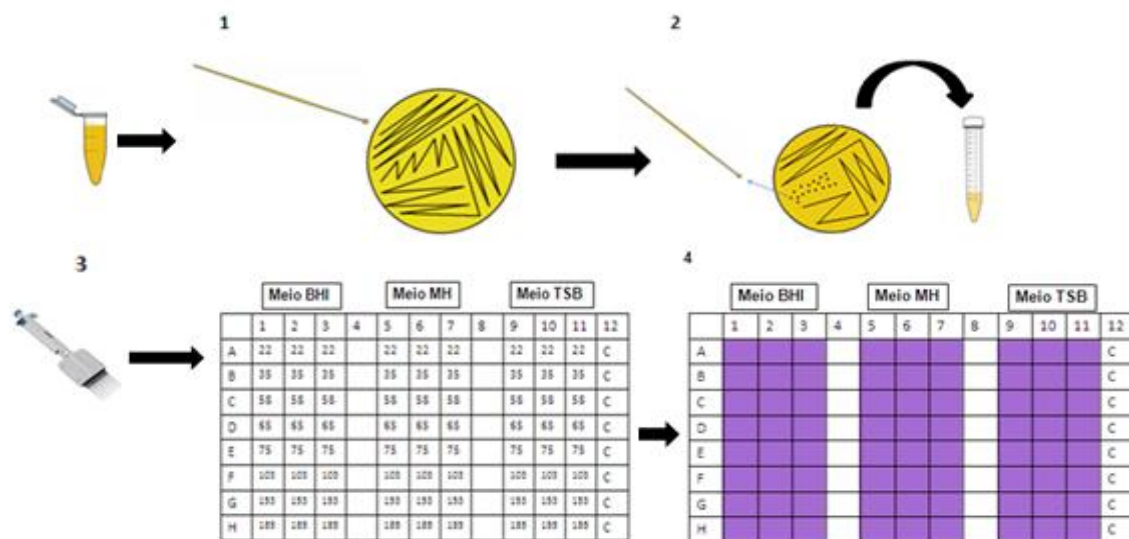
diluída em meio Müller Hinton 1/100 (v/v). A cultura diluída foi submetida a leitura da densidade óptica a 600 nm e a diluição seriada. Cada diluição foi plaqueada em meio de cultura MH sólido e incubada por 24 horas. Após a incubação foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

#### **4.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS**

As cepas de *A. baumannii* multirresistente foram plaqueadas em placas de petri contendo meio Ágar MH, as mesmas foram incubadas à 37 °C entre 18-24 horas (1). Após 20 horas, as colônias foram inoculadas em meio líquido contendo Infusão de cérebro e coração (BHI), Caldo Mueller Hinton (MH) e Caldo de Soja Tryptonada (TSB) e incubadas à 37°C, durante 24 horas, sob agitação constante (2). Após esse período as mesmas foram diluídas em uma proporção de 1:100 (v/v). Em uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços foram adicionados 100 uL da cultura diluída, devidamente selecionadas nas placas de forma que houvesse as repetições (triplicata) biológicas e técnicas e incubadas à 37°C, durante 24 horas (3).

Após incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm para obtenção da absorbância de células planctônicas. Logo após a placa foi lavada com água destilada (2x) e corada com 110 µl de cristal violeta 0,1%, ao qual reagiu em temperatura ambiente durante 20 minutos. Novamente a placa foi lavada com água destilada por duas vezes, e em seguida foram adicionados 110 µl de álcool 70% e submetida a leitura em 595 nm, no espectrofotômetro, para obtenção das absorbâncias oriundas da formação de biofilme (4) (Figura 6).

**Figura 6:** Etapas dos ensaios realizados para a obtenção da formação de biofilmes em diferentes meios de cultura.



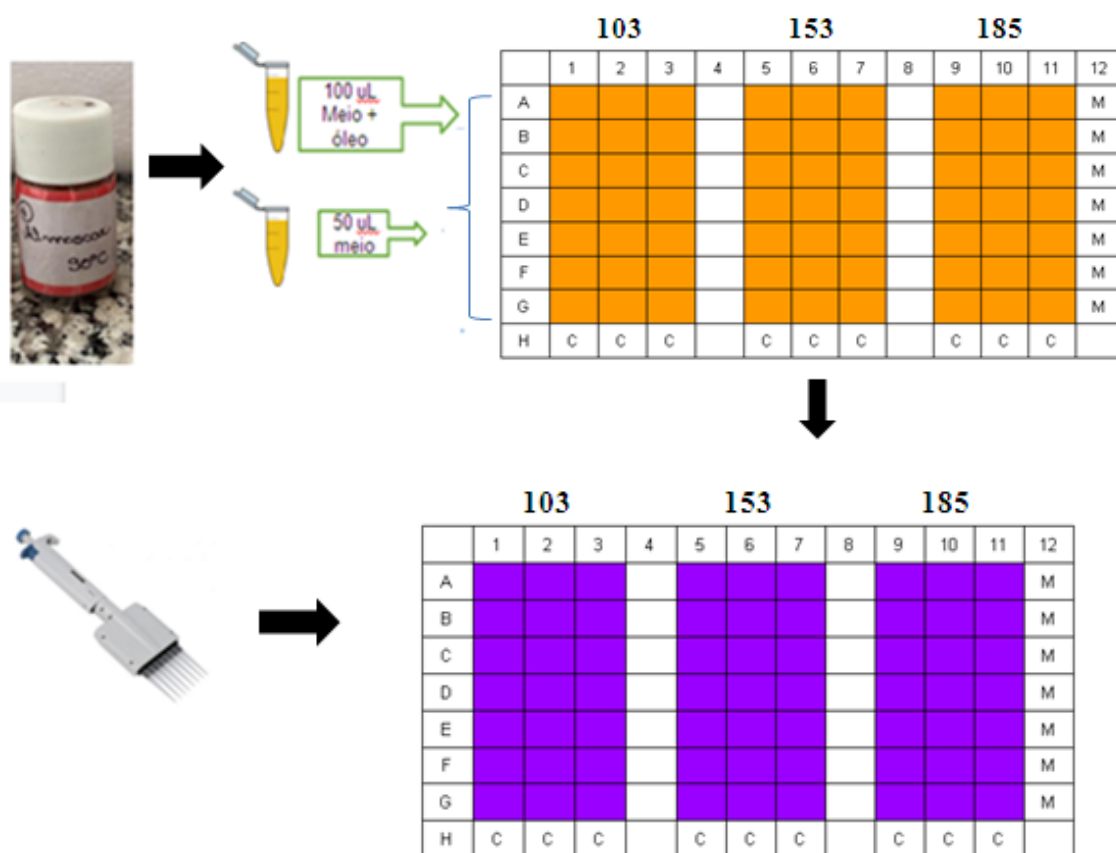
#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Os experimentos para comparação do crescimento bacteriano em diferentes meios de cultura, foram conduzidos com três réplicas biológicas e três réplicas técnicas. Os resultados correspondem a média das replicatas mais o desvio padrão. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey foi usado para calcular o valor P entre os diferentes grupos de tratamento. Diferenças com  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Seguiram-se os mesmos passos anteriores para crescimento do biofilme (etapas 1 e 2 da figura 6), onde foram selecionadas 3 cepas bacterianas que apresentaram formação de biofilme superior a 1 UA em todos os meios de cultura. O teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços em caldo de Mueller Hinton Broth. Foi adicionado 50 uL de diferentes concentrações do óleo de *P. heptaphyllum* (0,03 – 2%), 50 uL da suspensão bacteriana diluída a 1/100 (v/v) e incubado à 37°C por 24 horas. Em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos (etapa 4) para todos ensaios planctônicos, de adesão e de biofilme, representadas na figura 7.

**Figura 7:** etapas dos ensaios realizados para a obtenção atividade antibiofilme nos óleos essenciais.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. CORRELAÇÃO ENTRE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC) E DENSIDADE ÓPTICA

A correlação entre UFC e densidade óptica da cultura foi realizada com o objetivo de determinar a concentração da bactéria na cultura crescida por 20 horas. As estimativas obtidas com esse experimento foram usadas para ajustar a concentração das bactérias nos experimentos de susceptibilidade antibiofilme. Os resultados da densidade óptica foram obtidos pelo equipamento automatizado Biodrop, na qual cada estirpe bacteriana foi devidamente numerada e o valor de cada unidade formadora de colônia correspondeu a cada estirpe de *A. baumannii* multirresistente (tabela 1).

**Tabela 1:** Representa a correlação entre a densidade óptica (D.O) e unidade formadora de colônia (UFC), estimando a quantidade inserida no experimento.

Isolado clínico de <i>A. baumannii</i>	Local isolado (UTI)	*Desfecho clínico	Densidade óptica	Quantidade de UFC/mL
22	Secreção traqueal	Morte	0,074	$1,2 \times 10^5$
35	Swab retal	Recuperação	0,062	$2,0 \times 10^5$
58	Cateter	Recuperação	0,039	$2,3 \times 10^5$
65	Cateter	Recuperação	0,083	$2 \times 10^5$
75	Não informado	Não informado	0,063	$1,4 \times 10^5$
103	Swab retal	Recuperação	0,057	$8 \times 10^5$
153	Swab retal	Morte	0,077	$9 \times 10^5$
185	Urocultura	Recuperação	0,037	$1,0 \times 10^6$

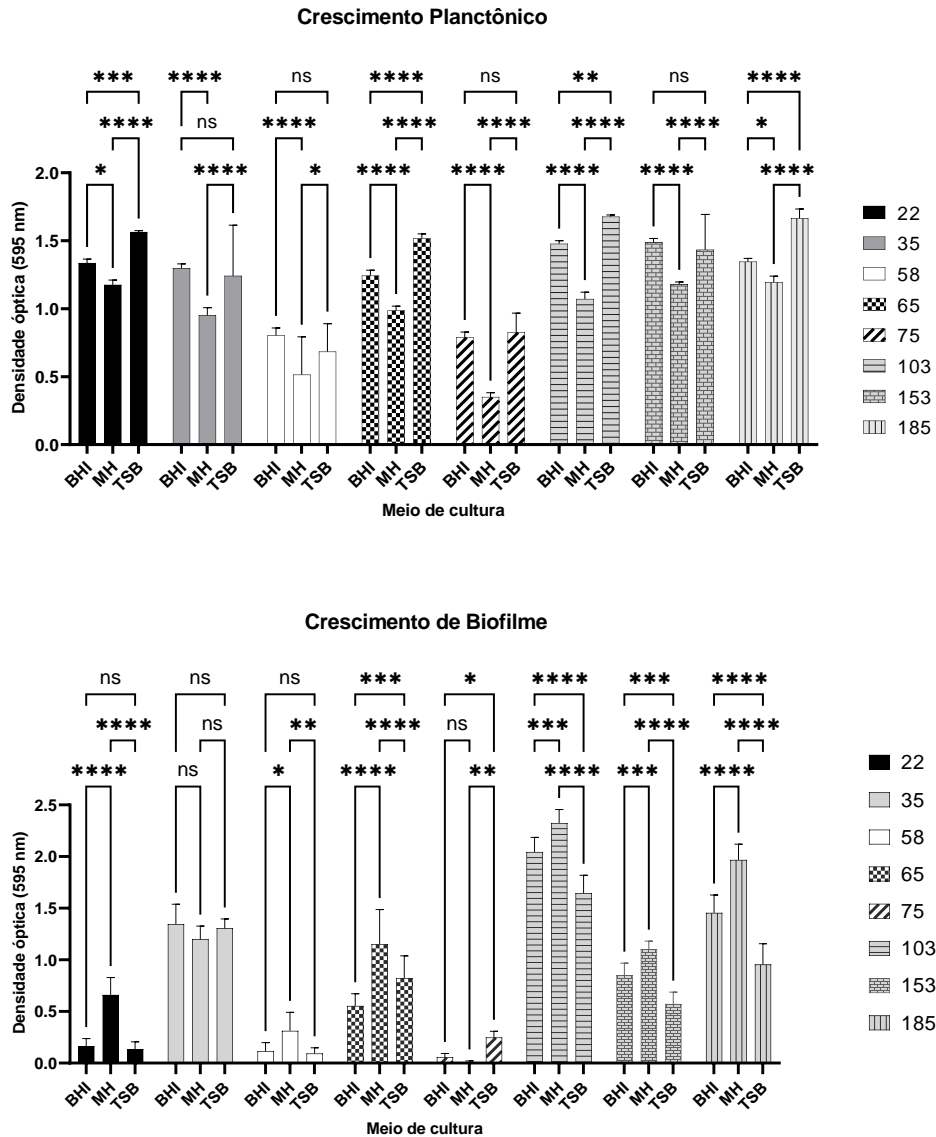
\*Dados do desfecho clínico obtido por MACIEL et al, 2016.

### 5.2 EFEITO DO MEIO DE CULTURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para avaliar o efeito da fonte de nutrientes sobre o crescimento planctônico e formação de biofilmes, isolados clínicos de *A. baumannii* multirresistente foram crescidos em diferentes meios de cultura. Os resultados mostraram que, de uma forma geral, o meio TSB é o meio nutritivo que mais potencializa o crescimento planctônico, seguido pelo meio BHI (Fig. 8). Observou-se que todos os isolados apresentam um menor crescimento planctônico em MH. Em contrapartida, o meio MH é o que mais favorece a formação de biofilmes (6 dos 8 isolados apresentam crescimento de biofilme significativo em meio MH quando comparado aos outros meios). Além disso, observou-se que existe variabilidade no crescimento planctônico e na formação de biofilmes entre

alguns dos isolados bacterianos quando utilizado o mesmo meio de cultura (Tabela 2 e 3). Interessantemente, isolados com o mesmo crescimento planctônico em todos os meios, apresentam diferentes potenciais para formar biofilmes, como observado entre os isolados 22 e 103 (Fig. 8 ; Tab. 2 e 3).

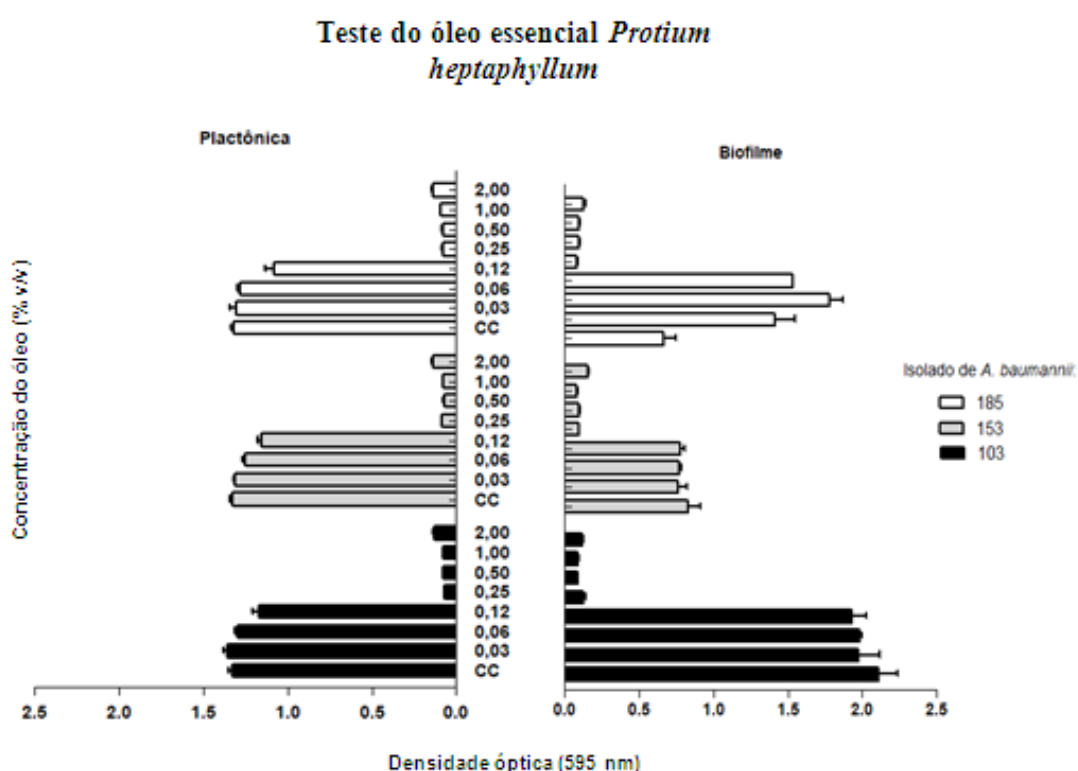
**Figura 8:** Crescimento de planctônico e de biofilme de *A. baumannii* em diferentes meios nutritivos. A significância estatística foi determinada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste posthoc de Tukey para comparar o crescimento bacteriano em distintos meios de cultura (\*,  $P = 0,0123-0,03$ ; \*\*,  $P \leq 0,0024$ ; \*\*\*,  $P = 0,0004$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).



### 5.3 EFEITO ANTIBIOFILME DE ÓLEO ESSENCIAL CONTRA *A. BAUMANNII* MULTIRRESISTENTE

O óleo essencial de *P. heptaphyllum* (Breu branco) foi testado contra os isolados clínicos de *A. baumannii* 185, 153 e 103 em meio de cultura MH. O óleo essencial apresentou uma CIM 0,25% (v/v) contra todos os isolados (Fig. 8). A atividade do óleo essencial de *P. heptaphyllum* foi especificamente antimicrobiana, uma vez que ausência do crescimento planctônico impacta a formação de biofilmes e concentrações inferiores a CIM apresentam formação de biofilme similar ao controle. Assim resultado mostra que o óleo é ineficiente em inibir biofilme.

**Gráfico 1:** Efeito do óleo essencial de *P. heptaphyllum* na inibição de células planctônicas e na formação de biofilmes. O ensaio foi realizado em meio MH.



## 6. DISCUSSÃO

O uso de compostos naturais tem auxiliado na investigação de propriedades antibacterianas, na influência na adesão bacteriana, formação de biofilmes e até mesmo na interrupção da comunicação bacteriana em biofilmes (Simões et al 2010; Borges et al 2014). Nesse estudo foi utilizado óleo essencial de *P. heptaphyllum* para avaliar a antibiofilme de seus compostos contra de *A. baumannii* multirresistente. Inicialmente, realizamos a correlação entre a densidade óptica e UFC da cultura crescida possibilitando mostrar que essa diluição apresenta uma concentração média de  $10^6$  UFC/mL, permitindo padronizar as condições de diluição e a concentração de bactérias utilizadas em experimentos (Maier, 2008).

Os experimentos para determinar a capacidade de formação de biofilmes das diferentes cepas de *A. baumannii* multirresistente mostraram variação no crescimento planctônico e em biofilmes, incluindo a baixa produção de biofilmes em algumas cepas, assim como alta capacidade de formação de biofilme. Fato observado no estudo realizado por Lianou & Koutsoumanis, 2011, que ocorreram diferenças em relação ao crescimento entre isolados de *Salmonella entérica* da mesma espécie microbiana tratadas de forma idêntica. Essa variação entre isolados da mesma espécie possivelmente se deve a variabilidade genética e fenotípica de cada isolado, resultantes de processos como mutações e fluxo gênico (Imperi et al, 2011, Rossum et al, 2020). Outra justificativa seria o uso de diferentes meios de cultura na indução da formação de biofilmes sugerindo que as bactérias podem crescer melhor como biofilmes em um determinado meio de cultura, verificado pelo método de coloração de Cristal Violeta (Haney et al, 2018).

Além disso, conseguimos demonstrar, conforme a tabela 2 e figura 8, que o meio de cultura pode apresentar variação de crescimento em isolados com o mesmo crescimento planctônico em todos os meios e apresentar diferente crescimento em biofilmes. Essa variação pode estar relacionada com a interferência do meio de cultura suplementado com nutrientes para o crescimento de biofilme, na qual as mesmas espécies demonstra diferença no crescimento entre elas, tanto para células planctônicas quanto em biofilmes (Bowden & Li, 1997). Isso significa que os resultados podem apresentar divergências em um determinada cepa microbiana e, desse modo, não podem

ser estendido com segurança a qualquer outra cepa da mesma espécie (Lianou & Koutsoumanis, 2011).

O meio nutritivo no desenvolvimento de biofilmes entre cepas da mesma espécie pode apresentar vários fatores como, por exemplo, o nutriente pode fornecer energia, nitrogênio ou carbono para um ou mais microrganismos. A metabolização dos microrganismos também pode influenciar, onde os produtos do metabolismo de um organismo fornece determinado nutriente que é mais significativo para outro, assim como os produtos do metabolismo de um nutriente altera o ambiente que pode influenciar o crescimento (BOWDEN, 1997). Isso demonstra que cepas bacterianas da mesma espécie apresentam uma variabilidade (Whiting e Golden, 2002).

Estudos demonstrando o efeito antimicrobiano do óleo de *P. Heptaphyllum* contra *A. baumannii* multirresistente ainda é inexistente na literatura, porém, inúmeros trabalhos avaliando a atividade de óleos essenciais contra *A. baumannii* multirresistente já foram relatados apresentando eficácia e de interesse para a indústria farmacêutica (Ismail et al, 2020; Kim, 2016; Duarte et al, 2013). É possível que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais seja conferida pela mistura de diferentes compostos, aumentando assim o efeito antibacteriano (Silva, Ferreira, Duarte, et al. 2011).

Após conhecer a capacidade de formação de biofilme de cepa de *A. baumannii* multirresistente, realizou-se os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana e antibiofilmes. Nesse estudo, o óleo essencial de *P. heptaphyllum* apresentou atividade antimicrobiana em uma concentração inibitória mínima de 0,25%, desse modo, não foi capaz de inibir o crescimento nas demais concentrações, além de não apresentar nenhuma eficácia para atividade antibiofilme. A determinação da atividade antimicrobiana do óleo de *P. heptaphyllum* contra isolados clínicos multirresistentes a antibióticos com alta capacidade de formação de biofilme, abre possibilidades para futuros ensaios, como por exemplo, testes para avaliar sinergismo desse óleo contra antibióticos. Um estudo realizado, demonstrou atividade antibacteriana do óleo essencial de flores de *Nectandra megapotamica* contra *A. baumannii* multirresistente - OXA-23-like, além de constatar a capacidade de melhoraria da atividade de antibióticos (imipenem) contra as bactérias testadas (Vasconcelos et al, 2020) e isso comprova que óleos essenciais podem ser capazes de restaurar a sensibilidade aos antibióticos e podendo também diminuir a dose efetiva desses antibióticos (Fadli et al. 2012).



Outro estudo utilizando óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), avaliou a atividade antimicrobiana da mistura dos compostos do óleo essencial em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, dentre elas estavam *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (resistente à meticilina). Seus resultados demonstraram atividade antibacteriana contra as bactérias *P. Aeruginosa* e *S. aureus* (Viktorová et al, 2020). Isso demonstra a relevância do uso de óleos essenciais no combate das bactérias pertencentes ao grupo das ESKAPE, assim como *A. baumannii* multirresistente, apresentando resultados promissores na superação da resistência aos medicamentos, por resultar em citotoxicidade bacteriana direta. Nesse estudo, o óleo essencial de *P. Heptaphyllum*, apresentou apenas atividade antimicrobiana, porém, ainda assim, pode ser uma alternativa para um possível antimicrobiano e antibiofilme.

Os óleos essenciais podem apresentar possibilidades de uso nos mais diversos setores como, por exemplo, no sistema alimentar utilizadas como sabonete antimicrobiano e desinfetante para controlar bactérias patogênicas. Podem ser usadas para prevenção e/ou tratamento de doenças infecciosas na área da aquicultura assim como na área da saúde, minimizando os efeitos de antibióticos para tratamento de doenças. De uma forma geral as plantas podem representar uma fonte promissora de novas drogas naturais para eliminação de bactérias patogênicas (Bajpai et al, 2011; Anon, 2006; Tajkarimi et al. 2010; Cunha et al, 2018; Dorman & Deans 2000).

## 7. CONCLUSÃO

A padronização das cepas bacterianas de *A. baumannii* por UFC/mL permitiu demonstrar que todas as culturas estavam padronizadas em uma concentração  $10^6$  UFC/mL. Além disso, o teste usando diferentes meios de cultura possibilitou a visualização do crescimento dessas cepas em meios de culturas distintos, visando também o crescimento entre o mesmo meio de cultura, demonstrando assim, que pode haver alteração no crescimento quando comparadas tanto em células planctônicas quanto em biofilmes. Desse modo, o teste de sensibilidade das bactérias por concentração inibitória mínima demonstrou que o óleo essencial de *P. hepttaphyllum* foi eficiente em inibir o crescimento planctônico de *A. baumannii* multirresistente com robusta capacidade de formação de biofilmes. Esse óleo poderia potencialmente ser útil para combater bactérias resistentes oriundas de infecções de pele, por meio de pomadas ou para desinfecção de superfícies. Entretanto, outros estudos são necessários para comprovar o potencial antimicrobiano do óleo de *P. hepttaphyllum* contra diferentes espécies de bactérias multirresistentes a antibióticos, além de um modelo *in vivo*, como por exemplo, os nematóides *Caenorhabditis elegans*, bem como para confirmar a segurança biológica do mesmo.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABOU El Ela, N.E., El-SAHN, A.A., ENAN, E.E. **Pediculicidal activity of certain plant essential oils against head lice *Pediculus humanus capitis***. Journal of the Egyptian Public Health Association. v.79, p.383–397, 2004.
- ABRAHIM , D., FRANCISCHINI, A.C., PERGO, E.M., KELMER-BRACHT, AM., ISHIIWAMOTO, E.L.. **Effects of a-pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings**. Plant Physiology. Biochemistry. v.41, p. 985–991, 2003
- ABREU, A. C., MCBAIN, B. A. J., SIMÕES, M. **Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents**. Nat. Prod. Rep., v. 29, p. 1007-1021, set/2012.
- ADUKWU EC., BOWLES, M., EDWARDS-JONES, V., BONE H. **Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral**. Applied Microbiology Biotechnology. v.100, n.22, p.9619–9627, 2016.
- AHMED, A. A, SALIH, F. A. **Quercus infectoria gall extracts reduce quorum sensing-controlled virulence factors production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn wounds**. BMC. Complementary and Alternative Medicine. v.19, p.177-185, jul/2019.
- ALITONOU, G.A.; NOUDOGBESSI, J.-P.; SESSOU, P.; TONOUHEWA, A.; AVLESSI, F.; MENUT, C.; SOHOUNHLOUE, D. **Chemical composition and biological activities of essential oils of *Pimenta racemosa* (Mill.)**. JW Moore. from Benin. Int. J. Biosci. 2012, 2, 1–12.
- ARAGÃO G. F., CUNHA PINHEIRO, M. C., NOGUEIRA BANDEIRA P., GOMES LEMOS, T. L., DE BARROS VIANA, G. S. **Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March**. Journal of Herbal Pharmacotherapy. v.7, p.31-47, 2007.
- BAJPAI, V.K., BAEK, K.H., 2016. **Biological efficacy and application of essential oils in foods-A review**. Essent. Oil-Bear. Plants. v. 19, p. 1–19, mar/2016.
- BANDEIRA, P.N., FONSECA, A.M., COSTA, S.M., LINS M.U., PESSOA, ODL., MONTE, FJQ., LEMOS, TLG. **Anti-bacterial and antioxidant activities of the essential oil of resin of *Protium heptaphyllum***. Nat. Prod.Comm. (2006). v.1, n.2, p.117–200.
- BAZARGANI, MITRA M., ROHLOFF, JENS. **Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms**. Food Control, v. 61, p. 156-164, set/2016.
- BELOIN, C., RENARD, S., GHIGO, J. M., LEBEAUX, D. **Novel approaches to combat bacterial biofilms**. Current Opinion in Pharmacology, v. 18, p. 61-68, out/2014.

BUCHBAUER G. **The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties.** Flavour and Fragrance Journal. v.25, p. 64-67, 2000

BHARDWAJ, A. K., VINOTHKUMAR, K., RAJPARA, N. **Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance.** Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. v. 8, p. 68–83, abr/2013.

BJARNSHOLT, T., JENSEN, PØ., MOSER, C., HOIBY, N. *Biofilm infections.* Springer, New York, NY. ed. 2011.

BOUCHER, HW., TALBOT GH., BRADLEY, JS., EDWARDS, JE., GILBERT, D., RICE, LB., SCHELD M, SPELLBERG B., BARTLETT J. **Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America.** Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12.

BORGES, A., SERRA, S., ABREU, C. A., SAAVEDRA, M. J., SALGADO, A., SIMÕES, M. **Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity.** Biofouling. v. 30, p.183–195, 2014.

BUTLER, D. A., BIAG, M., T., XING, Q. S., BULMAN, Z. P., WENZLER, E. **Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: Resistance by Any Other Name Would Still be Hard to Treat.** Antimicrobial development and drug resistance (k claeys and a vega, section editors). Springer Science, v. 21, n. 46, nov./2019.

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

CEGELSKI, L., MARSHALL, G. R., ELDRIDGE, G. R., HULTGREN, S. J. **The biology and future prospects of antivirulence therapies.** Nature Reviews Microbiology, v. 6, n. 1, p. 17-27, jan/2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, (CDC, 2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.* Disponível em: <https://immunizationevidence.org/sources/antibiotic-resistance-threats-in-the-united-states-2013-report/>. Acesso em: 30 nov 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC, ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, Canadá.** v. 10(4), p. 1-11, 2013. Disponível em: < [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)>. Acesso em: 30 nov/2020.

CHAN, J. Z-M., HALACHEV, M. R., LOMAN, N. J., CONSTANTINIDOU, C., PALLEN, M. **Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*.** BMC Microbiol, v.12, n.1, p. 302, dez/2012.

CORRÊA M. P., PENA, M. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.2, p. 82, 1984.

COELHO JM; TURTON JF; KAUFMANN ME, GLOVER J; WOODFORD N; WARNER M; PALEPOU M; PIKE R, PITT TL, PATEL BC, LIVERMORE DM. **Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England.** Journal Clinical Microbiology. v.44, n.10, p.3623-7, 2006.

COSTA D.M., JOHANI K., MELO D.S., LOPES L.K.O., LIMA L.L.K.O. , TIPPLE A.F.V., HU H. and VICKERY K. **Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. Latter in applied microbiology.**v.68, n4, p.269-276. Abr/2019.

CUNHA, J. A., HEINZMANN, B. M., & BALDISSEROTTO, B. **The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens - a review.** Journal of Applied Microbiology, v.125, n.2, p.328–344. 2018.

DA SILVA, B. R., DE FREITAS, V. A., NASCIMENTO-NETO, L. G., CARNEIRO, V. A., ARRUDA, F. V., DE AGUIAR, A. S., CAVADA, B. S., TEIXEIRA, E. H. **Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature.** Peptides, v. 36, n. 2, p. 315-321, jun/2012.

DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.** Microbiology and molecular biology reviews, v.64, p.847-767, dez/2000.

DAVIES, D.. **Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.** Nature Reviews Drug Discovery, v.2, n.2, p.114-22, fev/2003.

DAVIES, J & DAVIES, D. **Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.** Microbiological Molecular Biology Review. v.74, n.3, p.417–433, set/2010.

DEDEIĆ-LJUBOVIĆ, A., GRANOV, D., HUKIĆ, M. **Emergence of extensive drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* in the Clinical Center University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.** Med Glas (Zenica), v.12, n.2, p.169-176, ago/2015.

DIJKSHOORN, L., NEMEC A., SEIFERT, H. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** Nature Review Microbiology. v.5(12), p.939-951, 2007.

DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. M. **Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms.** Clinical Microbiology Reviews, v.15, p.167-193, abr/2002.

DOMENICO, EG., FARULLA, I., PRIGNANO, G., GALO, MT., VESPAZIANI, M., CAVALLO, I., SPERDUTI, I., PONTONE, M., BORDIGNON, V., CILLI, L., SANTIS, A., SALVO, FD., PIMPINELLI, F., PAROLA, ILP., TOMA, L & ENSOLI, F. **Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype.** *Int J Mol Sci.* v.18, n.5, p.1077, mai/2017.

DORMAN, H. J. & DEANS, S. G. **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.** *Journal of Applied Microbiology*, v.2, p.308-316, jan/2000.

EVANS, B. A., HAMOUDA, A., AMYES, S. **The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Current Pharmaceutical Design*, v.19, n.2, p.223-238, dez/2013.

FENELEY, R. C., HOPLEY, I. B., WELLS, P. N. **Urinary catheters: history, current status, adverse events and research agenda.** *J Med Eng Technol* v. 39, p. 459–570, set/2015.

FADLI, M., SAAD, A., SAVADI, S., CHEVALIER J., MEZRIOUI, N-E., PAGÈS, J-M., HASSANI, L. **Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics.** 2012 Mar 15;19(5):464-71.

FOUNOU, R. C., FOUNOU, L. L., ESSACK, S. Y. **Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis) Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis.** *PLOS ONE* v.12, n.12, dez/2017.

FLOYD, K. A., EBERLY, A. R., & HADJIFRANGISKOU, M. **Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices.** *Biofilms and Implantable Medical Devices*, p. 47–95, 2017.

FRANCISCO, K. M. S. **Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico.** *Revista saúde*, v.4, n.1, 2010.

FRIEDMAN, N. D., TEMKIN, E., CARMELI, Y. **The negative impact of antibiotic resistance.** *Clin Microbiol Infect.* v.22, n.5, p.416-22, mai/2016.

GADDY, J. A. & ACTIS, L. A. **Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation.** *Future Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 273 278, abr/2009.

GIBBONS, S. **Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities.** *Planta Medica*, v. 6, p. 594-602, mai/2008.

GONZALEZ, M. R. FLEUCHOT, B., LAUCIELLO, L., JAFARI, P., APPLGATE, L. A., RAFFOUL, W. **Effect of human burn wound exudate on *Pseudomonas aeruginosa* virulence.** *mSphere.* v.1 p.1-7, 2016.

GREENE, C., WU, J., RICKARD, A. H., XI, C. **Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces.** Letters. Applied Microbiology. v. 63, p. 233–239, 2016.

GREENE, C., VADLAMUDI, G., NEWTON, D., FOXMAN, B., XI, C. **The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*.** American Journal of Infection Control v. 44, p.65–71, mai/2016.

HADDADIN, Y. & REGUNATH, H. **Central Line Associated Blood Stream Infections (CLABSI), 2017.** Disponível em: <<https://blog.piccexcellence.com/central-line-associated-blood-stream-infections-clabsi/>>. Acesso em: 30 de nov 2020.

HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P., KATHJU, S., HØIBY, N., MOSER, C., COSTERTON, J. W., MOTER, A., BJARNSHOLT, T. **Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections.** Fems Immunology and Medical Microbiology, v. 65, n. 2, p. 127-145, mai/2012.

HANEY, E., TRIMBLE, M., CHENG, J., VALLÉ, Q., HANCOCK, R. **Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides .** Biomolecules. v.8, n.2, Mai/2018.

HAMMOUDI D., MOUBARECK C.A. and SARKIS D.K. **How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods.** Journal of Microbiological Methods, v.107, p.106–118, dez/2014.

HARDING, C. M., HENNON, S. W., FELDMAN, M. F. **Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence.** Nature Reviews Microbiology, v. 16(2), p. 91–102, 2018.

HARRIOTT, M. M. & NOVERR, M. C. **Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease.** Trends Microbiology, v.19, n. 11, p.557-563, nov/2011.

HAUSSLER, S., & FUQUA, C. **Biofilms 2012: New Discoveries and Significant Wrinkles in a Dynamic Field.** Journal of Bacteriology, v.195, n.13, p.2947-2958, jul/2013.

HELANDER, IM, ALAKOMI, HL, LATVA-KALA, K, MATILLA-SANDHOLM, T., POL I, SMID, EJ, GORRIS, LGM & WRIGHT, A. **Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria.** Journal Agriculture Food Chemical 1998; 46:3590-3595.

HOLMES, A. H., MOORE, L. S., SUNDSFJORD, A., STEINBAKK, M., REGMI, S., KARKEY, A., GUERIN, P. J., PIDDOCK, L. J. **Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance.** Lancet, p. 176,387, 2016.

HOOD, S. K., ZOTTOLA, E. A. **Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems.** International Journal of Food Microbiology. v.37(2-3), p. 145–53, jul/1997.

JESSYKA AC., BERTA M. HEINZMANN., BALDISSEROTTO, B. **The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens.** A review. *Journal of Applied Microbiology.* v.125(2):328-344. Aug/2018

JORGE, A. O. C. **Microbiologia e Imunologia oral.** Editora Elsevier, edição 1, pp.384, São Paulo, 2012.

KART, D., TAVERNIER, S., ACKER HV., NELIS, HJ., COENYE T. **Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*.** *Biofouling.* v.30, n.3, p377-83, 2014.

KAUR, I. **Novel strategies to combat antimicrobial resistance.** *J. Infectious Diseases Therapy.* v.4 p.292. doi: 10.4172/2332-0877.100029.

KAMOLVIT, W., SIDJABAT, H. E., PATERSON, D. L. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *Acinetobacter* ssp. in Asia and Oceania. *Microbial Drug Resistance.* v.21, n.4, p.424-434, 2015.

KIM, M. K., ZHAO, A., WANG, A., BROWN, Z. Z., MUIR, T. W., STONE, H. A. **Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development.** *Nature Microbiology.* v.2 17080-17086, 2017.

LAMB, A. D., VOWLER, S. L., JOHNSTON, R., DUNN, N., WISEMAN, O. J. **Meta-analysis showing the beneficial effect of  $\alpha$ -blockers on ureteric stent discomfort.** *BJU International.* v. 108 n.11, p. 1894–1902. Mar/2011.

LANG G., BUCHBAUER, G. **A review on recent research results (2008– 2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals.** *Flavour Fragr. J,* v. 27, p. 13-39, 2012.

LEE J. C., KOERTEN, H., VAN DEN BROEK P., BEEKHUIZEN, V. H., WOLTERBEEK, R., VAN DEN BARSELAAR, M., VAN DER REIJDEN, T., VAN DER MEER, J., VAN DEN GEVEL J., DIJKSHOORNV, L. **Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelialVcells.** *Research Microbiological.* p.157, 360-366, 2006.

LOB, S. H., HOBAN, D. J., SAHM, D. F., BADAL, R. E. **Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*.** *International. Journal Antimicrobiology. Agents.* v.47, p. 317–323, 2016.

LOEHFELM, T. W., LUKE, N. R. & CAMPAGNARI, A. A. **Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein.** *Journal. Bacteriology* v.190, p.1036–1044, 2008.

LÓPEZ-CAUSAPÉ, C., SOMMER LM., CABOT G., RUBIO R., OCAMPO-SOSA AA., JOHANSEN HK., FIGUEROLA J., CANTÓN R, KIDD TJ, MOLIN S, OLIVER A. **Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international cystic fibrosis clone.** *Sci Rep* 7:5555(2017).



- MACIEL, W, G; SILVA, K, E; BAMPI, J, V, B; BET, G, M, S; RAMOS, A, C; GALES, A, C, SIMIONATTO, S. Identification of SPM-1 producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Central-West region of Brazil: a case study. *Revista Brasileira de Medicina tropical*. 2016
- MACHADO, T. B., PINTO, A. V., PINTO, M. C. F. R., LEAL, I. C. R., SILVA, M. G., AMARA, C. F., KUSTER, L. R. M., NETO, K. R. **In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.21, p.279-284, mar/2003.
- MADEO, J., & FRIERI, M.. **Bacterial biofilms and chronic rhinosinusitis.** *Allergy and Asthma Proceedings*, v. 34, n. 4, p. 335-341, abr/2013.
- MAGILL, S. S. *ET AL.* **Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections.** *New England Journal of Medicine*. v. **370**, p.1198–1208, 2014.
- MAIA, R. M., BARBOSA, P. R., CRUZ, F. G., ROQUE, N. F, FASCIO, M. **Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): characterization in binary mixtures.** *Quím Nova* v.23 p.623-6, 2000.
- MANDAL, S. M., ROY, A., GHOSH, A. K., HAZRA, T. K., BASAK, A., FRANCO, O. L. **Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization.** *Front. Pharmacol.* v. 5, p.105, 2014. doi: 10.3389/fphar.2014.00105.
- MANN, N. H. **The Third Age of Phage.** *PLoS Biology* v. 3(5): e182.
- MORGAN, D. J., LIANG, S. Y., SMITH, C. L., JOHNSON, J. K., HARRIS, A. D., FURUNO, J. P., THOM, K. A., SNYDER, G. M., DAY, H. R., PERENCEVICH, E. N. **Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers.** *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2010 Jul;31(7):716-21. doi: 10.1086/653201.
- MOSTACHIO, A. K; LEVIN, A. S.; RIZECK, C. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistance *Acinetobacter* ssp. isolates in Brazil.. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.39, n.5, p.396-401.2012.
- MUNOZ-PRICE, LS, WEINSTEIN RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. v.20, n. 12, p.1271-81 mar/2008.
- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., MERTINO, L., COPPOLA, R., FEO, V. **Effect of essential oils on pathogenic bacteria.** *Pharmaceuticals* v.6, p.1451 –1474 dez/2013.
- NOGUEIRA, A. O., OLIVEIRA, Y. I. S., ADJAFRE, B. L., DE MORAES, M. E. A., & ARAGÃO, G. F. **Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyrin from *Protium heptaphyllum* : a literature review.** *Fundamental & Clinical Pharmacology*. p. 60430-275, 2018.

NORBURY, W. D. N., HERNDON, J., TANKSLEY, M. G., JESCHKE, C. C. **Finnerty, Infection in burns. Surg. Infect. (Larchmt).** V. 17 p.250-255 abr/2016.

OLIVEIRA, F. A., COSTA, C. L., CHAVES, M. H., ALMEIDA, F. R., CAVALCANTE, I. J., LIMA, A. F. **Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from Protium heptaphyllum resin in mice.** Life Sci, v.77 p.2942-52, 2007.

OLIVEIRA, F. A., VIEIRA-JÚNIOR, G. M., CHAVES, M. H., ALMEIDA, F. R., FLORÊNCIO, M. G., LIMA, R.C. JR. **Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from Protium heptaphyllum in mice and rats.** Pharmacol Res v.49, p.105-11, 2004.

NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK. **Psc protocol combined manual. In: bloodstream infection event** (Central line -Associated Bloodstream Infection and non -Central line - Associated Bloodstream Infection). USA: NHSN. 2018.

PARK, KH., SHIN, JH., LEE, SY., KIM, SH., JANG, MO., KANG, SJ., JUNG, SI., CHUNG, EK., KO, KS., JANG, HC. The clinical characteristics, carbapenem resistance, and outcome of *Acinetobacter* bacteremia according to genospecies. Plos One. v.8, n.6, s/p. 2013.

PELEG AY; SEIFERTH; PETERSON DL. **Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen.** Clinical Microbiology Reviews. v. 21, p. 538-82, jul/2008.

PEREZ, F., HUJER, A. M., HUJER, K. M., DECKER, B. K., RATHER, P.N., BONOMO, R. A. **Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii.** Antimicrob Agents Chemother. v.51(10) p. 3471-3484, 2007.

PERNET R. **Phytochimiedes Burseraceae.** Lloydia v.35, p. 280-7, 1999.

PERNET R. **Phytochimiedes Burseraceae.** Lloydia v. 35, p.280-7, 1972.

PORTUGAL, Direção Geral de Saúde, Lisboa. **Documento eletrônico, de novembro de 2014. Programa de Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos. Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números.** Disponível em: <<https://www.dgs.pt/em-destaque/portugal-controlo-da-infecao-e-resistencia-aos-antimicrobianos-em-numeros-2015.aspx>>. Acesso em setembro de 2019.

PRESTINACI, F., PEZZOTTI, P., PANTOSTI, A. **Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon.** Pathog Glob Health. v.109, n.7 p. 309-18, 2009. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.

PROIA, L., VON, D. S., SÀNCHEZ-MELSIÓ, A., SABATER, S., BORREGO, C. M., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S., BALCÁZAR, J. L. **Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers.** Environmental Pollution, v. 8 p. 210,-121 mar/2016.

RICE, L. B. **Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE.** The Journal of Infectious Diseases. v.197, n.8, p.1079-1081, 2008.

RICICOVÁ, M., KUCHARÍKOVÁ, S., TOURNU, H., HENDRIX, J., BUJDÁKOVA, H., ELDERE, J., LAGROU, K., DIJCK, P. **Candida albicans biofilm formation in a new in vivo rat model.** Journal Microbiology, v.156, s/p, 2010.

RODRÍGUEZ-BAÑO J., MARTÍ S., SOTO S., FERNÁNDEZ- CUENCA F., CISNEROS J. M., PACHÓN J., PASCUAL A., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L., MCQUEARY C., ACTIS L. A., VILA J. **Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications.** Clin. Microbiol. Infect. v.14, p. 276-278, 2008.

ROMLING, U., BALSALOBRE, C. **Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies.** Journal of Internal Medicine, v.272, n.6, p.541-561, 2012.

ROMLING, U., KJELLEBERG, S., NORMARK, S., NYMAN, L., UHLIN, B. E., & AKERLUND, B. **Microbial biofilm formation: a need to act.** Journal of Internal Medicine, v.276, n.2, p.98–110, 2014.

SIANI A.C., RAMOS M.F., LIMA OM. Jr., SANTOS RR., FERREIRA EF., SOARES RO., ROSAS EC., SUSUNAGA GS., GUIMARÃES AC., ZOGHBI MG, HENRIQUES MG. **Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium.** Journal. Ethnopharmacology. v.66, p.57–69, 1999.

SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., VIEIRA, M. J. **A review of current and emergent biofilm control strategies.** Elsevier. LWT - Food Science and Technology". ISSN 0023-6438. v. 43:4, p. 573–583, 2010.

SINGH, R., NADHE, S., WADHWANI, U., SHEDBALKAR, B. A. **Chopade, Nanoparticles for control of biofilms of Acinetobacter species,** Materials (Basel). v. 9, p. 383-387, 2016.

SKARIYACHAN, S., TASKEEN, T., GANTA, M., & KRISHNA, BV. **Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii.** Critical Reviews in Microbiology. v.45, n.3, p.315-333, mai/2019.

STICKLER, D. J. **Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done.** Journal of Internal Medicine. v.276, p. 120–129, 2014.

STICKLER, D. J. & MORGAN, S. D. **Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters.** J Hosp Infect v.69, p. 350–360, 2008.

SAIPRIYA, K., SWATHI, C. H., RATNAKAR, K. S., SRITHARAN, V. **Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development**, Journal Applied Microbiology. v.128(1) p.15-27, 2019. doi: 10.1111/jam.14330.

SHARMA, G., SHARMA, S., SHARMA, P., CHANDOLA, D., DANG S., GUPTA, S. GABRANI, R. ***Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies**. Journal of Applied Microbiology. v. 121, n. 2, p 309-19 Ago/2016.

TAJKARIMI, M.M., IBRAHIM, S.A. CLIVER, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Journal Food Control. v.21, p. 1199-1218., 2010.

TAYLOR, P. K., YEUNG, A. T., HANCOCK, R. E. **Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies**. Journal Biotechnology, v. 191, p. 121- 30, set/2014.

THOMSEN, T., HALL-STOODLEY, L., MOSER, C., STOODLEY, P. The role of bacterial biofilms in infections of catheters and shunts. p 91–109, 2011.

TOLKER-NIELSEN, T. **Biofilm Development**. Microbiol Spectr. v.3, n.2, s/p. abr/2014.

TOMARAS, A. P., DORSEY, C. W., EDELMANN, R. E., ACTIS, L. A. **Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system**. Microbiology. v. 149, p. 3473–3484, 2003.

VASCONCELOS G, NATHALIE., MALLMAN, VIVIANE., COSTA, R ÉRICA., SIMIONATTO EUCLÉSIO., COUTINHO, J EDUARDO., SILVA, ROGÉRIO CL SILVA., RIBEIRO, M SUZANA., FRANCO, L OCTÁVIO., MIGLILOLO, LUDOVICO., CRODA, JÚLIO., SIMIONATTO, SIMONE. **Antibacterial activity and synergism of the essential oil of *Nectandra megapotamica* (L.) flowers against OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii***. Journal of Essential Oil Research. p 260-268 abr/ 2020.

VASCONCELOS G, NATHALIE., SILVA, E KÉSIA ., CRODA, JÚLIO.,SIMIONATTO, SIMONE. **Antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in a carbapenem- and polymyxin-resistant *Klebsiella aerogenes* strain**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol.:53) 2020

VADAKKAN, K., CHOUDHURY, A. A., GUNASEKARAN, R., HEMAPRIYA, J., VIJAYANAND, S. **Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression**. J. Genet. Eng. Biotechnol. v.16, p. 239–252, 2018.

VILLEGAS M. V., HARTSTEIN A. I. ***Acinetobacter* Voutbreaks, 1977-2000**. Infect. Control Hosp. Epidemiol.v.24, p. 284-295. 2003.

VIKTOROVÁ, J; STUPÁČK, M; ŘEHOŘOVÁ, K; DOBIASOVÁ, S; HOANG, S; HAJŠLOVÁ, J; THANH T. V.; TRI, L. V.; THUAN, N. V.; RUMML, T. **Lemon Grass Essential Oil Does not Modulate Cancer Cells Multidrug Resistance by Citral—Its Dominant and Strongly Antimicrobial Compound**. Foods. v,5, n.5, p.585. mai/2020.

VIVEK K; BAJPAI A; KWANG-HYUN BAEK A; SUN CHUL KANG. **Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review.** Food Research International. v.45, n2, p. 722-734. 2011.

VIKAS, M., SINHA, S., SINGH NP. **Multidrug resistant acinetobacter.** J Glob Infect Dis. v.2, n.3, p. 291-304, SET/2010.

WALTHER-RASMUSSEN, J & HOIBY N. **OXA-type carbapenemases.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.57, p.373-83, 2006.

WALSH T; TOLEMAN M; POIREL L; NORDMANN P. **Metallo-- lactamases: the quiet before the storm?** Clinical Microbiology Reviews. v,18, p.306-325, 2005.

WILKS, M., WILSON, A., WARWICK, S., PRICE, E., KENNEDY, D., ELY, A., MILLAR, M. **Control of an Outbreak of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Colonization and Infection in an Intensive Care Unit (ICU) Without Closing the ICU or Placing Patients in Isolation.** Infection Control & Hospital Epidemiology, v. 27(7), p. 654-658, 2010. doi:10.1086/507011

WILLYARD, C. **The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats.** Nature. v.28, p. 543(7643):15, fev, 2017. doi: 10.1038/nature.2017.21550.

WOOD, C. R., OHNECK, E. J., EDELMANN, R. E., ACTIS, L. A. **A Light-Regulated Type I Pilus Contributes to Acinetobacter baumannii Biofilm, Motility, and Virulence Functions.** Infect Immun. 22, 86(9): e00442-18, aug/2018 doi: 10.1128/IAI.00442-18.

WOODFORD N., ELLINGTON M.J., COELHO J.M., TURTON J.F., WARD M.E., BROWN S., AMYES S.G. and LIVERMORE D.M.. **Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 27n.4, p. 351–353, abr/2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics** (World Health Organization, Geneva, 2017).

ZHANEL, G. G., ADAM, H. J., BAXTER, M. R., FULLER, J., NICHOL, K. A., DENISUIK, A. J., LAGACE-WIENS, P. R., WALKTY, A., KARLOWSKY, J. A., SCHWEIZER, F., HOBAN, D. J. **Canadian Antimicrobial Resistance Alliance. Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007-11 study.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 68. 7–22, mai/2013.

ZHANG, J., XU, L. L., GAN, D., ZHANG, X. **In vitro study of bacteriophage AB3 endolysin LysAB3 activity against Acinetobacter baumannii biofilm and biofilm-bound Acinetobacter baumannii.** Clinical Laboratory. v. 64, p.1021–1030, 2018.