

Mestrado Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia

**Bactérias do grupo *ESKAPE*: desenvolvimento de uma
solução desinfetante de superfícies abióticas à base de
produtos naturais**

Beatriz Cleto Rocha

2023



Bactérias do grupo *ESKAPE*: desenvolvimento de uma solução desinfetante de superfícies abióticas à base de produtos naturais

Autora: Beatriz Cleto Rocha

Orientadora: Professora Doutora Maria José Gonçalves Alves

Coorientadora: Doutora Catarina Milho

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Ciências Aplicadas à Saúde** - Ramo **Biotecnologia** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Bragança.

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação só foi possível devido à contribuição e apoio de várias pessoas, às quais quero expressar o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, um grande agradecimento à Professora Doutora Maria José Gonçalves Alves, por me ter orientado nesta etapa académica, por toda a ajuda, disponibilidade, partilha e profissionalismo.

Agradeço, de igual forma, à minha coorientadora, a Doutora Catarina Milho, por todos os conhecimentos transmitidos, pela sua disponibilidade, apoio e amizade.

Que agradecer a todos os docentes que fizeram parte deste mestrado, por toda a aprendizagem adquirida, que terei presente em toda minha futura vida profissional.

A toda a equipa do AquaValor, que me recebeu, que foi parte fundamental neste trabalho, colaborando em todas as dúvidas que apresentei, no processo laboratorial e na colheita das amostras.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, pela paciência, incentivo e confiança na conclusão desta nova etapa, da minha vida.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento especial aos meus pais, irmã e namorado, por todo o apoio, amor e motivação que me deram ao longo deste percurso.

Resumo

As infecções relacionadas com cuidados de saúde representam um desafio sério, afetando a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que muitas vezes estão ligadas a doenças graves. Estas infecções são frequentemente causadas por um grupo de bactérias patogénicas conhecido como 'ESKAPE', que inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Estas bactérias têm vindo a tornar-se resistentes a muitos antibióticos devido ao seu uso excessivo e descontrolado, doses inadequadas e baixa adesão às diretrizes de tratamento. Muitas destas infecções ocorrem em ambiente hospitalar, onde os pacientes podem entrar em contato com esses microrganismos através de superfícies contaminadas, como bancadas e camas.

Os produtos naturais têm sido usados desde a antiguidade para tratamentos devido aos seus benefícios terapêuticos e à sua baixa toxicidade. Os óleos essenciais, conhecidos pelas suas propriedades antibacterianas e antibiofilme, apresentam-se como uma alternativa natural aos desinfetantes comerciais. Da mesma forma, as águas minerais naturais possuem propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antibiofilme, devido às suas características físico-químicas.

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana e antibiofilme dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, bem como da água termal de Chaves, individualmente e em combinação, como uma alternativa de desinfecção de superfícies contaminadas. As atividades antibacteriana e antibiofilme das amostras estudadas foram analisadas pelo método de microdiluição e a determinação do crescimento bacteriano através da leitura de densidade ótica e por citometria de fluxo, respetivamente.

Os resultados mostraram uma forte atividade antimicrobiana e antibiofilme, quando os óleos essenciais foram combinados com água termal de Chaves, especialmente contra as bactérias do grupo *ESKAPE*.

Conclui-se que a combinação destes produtos naturais é vantajosa, potenciando as suas capacidades individuais, tornando-se uma opção viável para a desinfecção e limpeza, incluindo a produção de soluções desinfetantes eficazes.

Palavras-chave: Bactérias *ESKAPE*; óleos essenciais; água termal; resistência a antibióticos; infecção nosocomial; solução desinfetante; atividade antibacteriana; atividade antibiofilme.

Abstract

Healthcare-associated infections pose a serious challenge, affecting patients' quality of life, often linked to severe illnesses. These infections are frequently caused by a group of pathogenic bacteria known as 'ESKAPE', including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. These bacteria have become increasingly resistant to many antibiotics due to their overuse and misuse, inadequate dosages, and low adherence to treatment guidelines. Many of these infections occur in a hospital environment, where patients can come into contact with these microorganisms through contaminated surfaces, such as countertops and beds.

Natural products have been used since ancient times for their therapeutic benefits and low toxicity. Essential oils, known for their antibacterial and antibiofilm properties, serve as a natural alternative to commercial disinfectants. Similarly, natural mineral waters possess anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-biofilm, properties due to their physicochemical characteristics.

This study assessed the antibacterial and antibiofilm activity of essential oils from *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris*, as well as natural mineral water from Chaves, both individually and in combination, as an alternative for disinfecting contaminated surfaces. The antibacterial and anti-biofilm activities of the samples were analysed using the microdilution method, measuring bacterial growth at optical density, and flow cytometry, respectively.

The results demonstrated strong antimicrobial and antibiofilm activity when essential oils were combined with natural mineral water, particularly against *ESKAPE* group bacteria.

In conclusion, the combination of these natural products offers advantages by enhancing their individual capabilities, making it a viable option for disinfection and cleaning, including the production of effective disinfectant solutions.

Keywords: *ESKAPE* bacteria; essential oils; thermal water; antibiotic resistance; nosocomial infection; disinfectant solution; antibacterial activity; antibiofilm activity.

Índice

1. Introdução	12
1.1 Bactérias <i>ESKAPE</i>	14
1.1.1. <i>Enterococcus faecium</i>	14
1.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	16
1.1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.1.6. <i>Enterobacter</i> spp.....	17
1.2 Biofilmes bacterianos.....	18
1.3 Produtos Naturais	19
1.3.1. Plantas medicinais	20
1.3.2 <i>Origanum vulgare</i>	21
1.3.3 <i>Thymus vulgaris</i>	22
1.3.4 Água Termal	23
2. Objetivos.....	28
3. Material e Métodos	29
3.1 Óleos essenciais	29
3.2 Microrganismos e condições de crescimento.....	30
3.3 Preparação das amostras para análise	30
3.4 Controlos.....	31
3.5 Avaliação da atividade antibacteriana.....	32
3.6 Avaliação da atividade antibiofilme.....	33
3.6.1 Inibição do biofilme.....	33
3.6.2. Redução do biofilme.....	34
4. Resultados.....	36

5. Discussão	48
6. Conclusão.....	54

Índice de Figuras

FIGURA 1 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE UM BIOFILME MICROBIANO.....	19
FIGURA 2 - <i>O. VULGARE</i>	22
FIGURA 3 - <i>T. VULGARIS</i>	23
FIGURA 4 - AMN EM PORTUGAL CONTINENTAL.....	25
FIGURA 5 – OE DE <i>T. VULGARIS</i>	29
FIGURA 6 – OE DE <i>O. VULGARE</i>	29
FIGURA 7 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO OE DE <i>T. VULGARIS</i> EM BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> EM SUSPENSÃO	37
FIGURA 8 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO OE DE <i>O. VULGARE</i> SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> EM SUSPENSÃO.....	39
FIGURA 9 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA AT DE CHAVES SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> EM SUSPENSÃO	40
FIGURA 10 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO OE DE <i>T. VULGARIS</i> EM ASSOCIAÇÃO COM AT DE CHAVES SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> EM SUSPENSÃO.....	42
FIGURA 11 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO OE DE <i>O. VULGARE</i> EM ASSOCIAÇÃO COM AT DE CHAVES SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> EM SUSPENSÃO.....	43
FIGURA 12 - INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> PELA AÇÃO ANTIBIOFILME DO OE DE <i>T. VULGARIS</i> EM ASSOCIAÇÃO COM AT DE CHAVES.....	45
FIGURA 13 - INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> PELA AÇÃO ANTIBIOFILME DO OE DE <i>O. VULGARE</i> EM ASSOCIAÇÃO COM AT DE CHAVES.....	45
FIGURA 14 - REDUÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> PELA AÇÃO ANTIBIOFILME DO OE DE <i>T. VULGARIS</i> EM ASSOCIAÇÃO COM AT DE CHAVES.....	46
FIGURA 15 - REDUÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> PELA AÇÃO ANTIBIOFILME DO OE DE <i>O. VULGARE</i> EM ASSOCIAÇÃO COM AT DE CHAVES.....	47

Índice de Tabelas

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AT DE CHAVES	27
TABELA 2 - CONTROLOS REALIZADOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE OE E DE AT, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO.....	31
TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE <i>T. VULGARIS</i> , ISOLADAMENTE, SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i>	37
TABELA 4 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE <i>O. VULGARE</i> , ISOLADAMENTE, SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i>	38
TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA AT DE CHAVES, ISOLADAMENTE, SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i>	40
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE <i>T. VULGARIS</i> EM ASSOCIAÇÃO COM A AT DE CHAVES SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i>	41
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE <i>O. VULGARE</i> EM ASSOCIAÇÃO COM A AT DE CHAVES SOBRE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i>	43
TABELA 8 - INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> PELO OE DE <i>T. VULGARIS</i> OU <i>O. VULGARE</i> EM ASSOCIAÇÃO COM A AT DE CHAVES.....	44
TABELA 9 - REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS DO GRUPO <i>ESKAPE</i> PELO OE DE <i>T. VULGARIS</i> OU <i>O. VULGARE</i> EM ASSOCIAÇÃO COM A AT DE CHAVES..	46

Abreviaturas

AMN - Água Mineral Natural

AT - Água Termal

BHI - Brain Heart Infusion

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO - Densidade ótica

ESBL – Beta-lactamase de espectro alargado

IACS - Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

ITU – Infecção do trato urinário

MRSA - *S. aureus* resistente à metilina

OE – Óleo essencial

OMS - Organização mundial de saúde

PI - Iodeto de propídio

RAM – Resistência antimicrobiana

TO - Laranja de tiazole

TSB - Tryptic Soy Broth

VRE - *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina

1. Introdução

A infecção associada aos cuidados de saúde (IACS) é uma infecção adquirida pelos doentes em consequência dos cuidados e procedimentos de saúde. Estas infeções representam um sério problema de saúde pública devido à sua elevada incidência, impactando diretamente a qualidade de vida dos pacientes, pois estão associados a um alto risco de mortalidade, e resultam no aumento dos custos hospitalares (Cristino et al., 2007; Du et al., 2021). A IACS encontra-se entre as complicações mais frequentes provenientes da hospitalização, podendo ser provocada por uma grande variedade de microrganismos, sendo os principais causadores as bactérias, fungos, vírus e parasitas (Santajit & Indrawattana, 2016a).

As bactérias patogénicas que pertencem ao grupo *ESKAPE*, nomeadamente *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., estão entre os agentes infecciosos mais comumente associados a IACS. O acrónimo *ESKAPE* reflete a capacidade dessas bactérias de “escapar” à ação dos antibióticos e desafiar a erradicação por terapias (Ma et al., 2020; Pendleton et al., 2013).

Cuidados de saúde onde são utilizados dispositivos médicos de uso prolongado como ventiladores e cateteres revelam uma ameaça nos pacientes devido a este grupo de bactérias, estando assim expostos a infeções graves e muitas vezes mortais, como a pneumonia e a septicémia. São geralmente mais difíceis de tratar e podem recidivar e causar morbidade e mortalidade significativas (Christaki et al., 2020). As bactérias deste grupo têm vindo a tornar-se resistentes a um grande número de antibióticos, incluindo os antibióticos de última linha usados no tratamento de bactérias multirresistentes. Entre os patógenos *ESKAPE*, podem destacar-se o *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) e o *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE), sendo causadores de infeções comumente vistas nos hospitais (Ma et al., 2020; Santajit & Indrawattana, 2016a; World Health Organization, 2017).

A resistência antimicrobiana (RAM) ocorre quando as bactérias desenvolvem ou adquirem a capacidade de contornar os mecanismos antimicrobianos exercidos por estes fármacos, representando uma das ameaças mais preocupantes no que diz respeito ao combate de infeções. A explosão da resistência antimicrobiana está relacionada com o

uso excessivo de antibióticos, o consumo e dosagem inadequada e a baixa adesão às diretrizes de tratamento por parte do paciente (Christaki et al., 2020; Khan et al., 2018; Ma et al., 2020).

Para além disso, a prescrição excessiva de antibióticos sem considerar os seus efeitos secundários é uma ameaça a saúde pública (Santajit & Indrawattana, 2016b). Mesmo que se trate de uma doença cuja causa seja uma bactéria e que possa ser tratada por uma associação de antibióticos de baixa dosagem, são muitas vezes usadas combinações de alta dosagem, para superar a RAM, tornando assim as infeções seguintes mais difíceis ou mesmo impossíveis de tratar, aumentando também o risco de propagação de doenças infecciosas graves e de morte (Mancuso et al., 2021; Santajit & Indrawattana, 2016a).

Para enfrentar a ameaça da RAM, em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de bactérias patogénicas prioritárias, resistentes a antibióticos, para ajudar na pesquisa e no desenvolvimento de novas formas de tratamento e na investigação de fármacos eficazes no combate contra as mesmas. A lista é dividida em três categorias de acordo com a urgência da necessidade de novos antibióticos: prioridade crítica, alta e média (World Health Organization, 2017). A primeira categoria, de prioridade crítica, inclui bactérias multirresistentes como a *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, que podem causar infeções graves e muitas vezes mortais. Estas bactérias tornaram-se resistentes aos mais potentes antibióticos disponíveis no mercado para o tratamento de bactérias multirresistentes, incluindo carbapenemases e cefalosporinas de terceira geração (World Health Organization, 2017). As categorias de alta e média prioridade abrangem ainda outras bactérias multirresistentes, que causam doenças de maior prevalência, como é o caso de *E. faecium* e de *S. aureus* (World Health Organization, 2017).

Além da RAM, os biofilmes bacterianos devem igualmente ser tidos em conta quando se fala de IACS, devido à sua capacidade de resistir a diversos antimicrobianos. Os biofilmes bacterianos são estruturas microbianas nas quais as bactérias se encontram protegidas do sistema imunitário do hospedeiro, bem como de outras agressões externas, contribuindo assim, para a persistência de infeções em ambientes nosocomiais (Costa et al., 2019). Os biofilmes estão descritos como sendo comunidades microbianas imóveis, que colonizam e crescem em diversas superfícies abióticas e bióticas tais como dispositivos médicos, suturas e pontos cirúrgicos, cateteres e implantes dentários,

causando infecções que só podem ser tratadas pela sua eliminação e cujo tratamento é difícil (Costa et al., 2019; Divakar et al., 2019).

1.1 Bactérias *ESKAPE*

As infecções causadas por este grupo de microrganismos resultam em altas taxas de morbidade e mortalidade, altos custos de saúde, de diagnóstico e de tratamento difíceis (Denissen et al., 2022; Ma et al., 2020).

As bactérias *ESKAPE* são um grupo de bactérias multirresistentes onde se podem encontrar quer bactérias Gram-positivas, quer Gram-negativas (Mancuso et al., 2021). Este conjunto de bactérias tem vindo a tornar-se a causa global recorrente de infecções hospitalares, pertencendo à lista de microrganismos patogénicos prioritários da OMS, devido ao seu impacto na saúde humana, por serem resistentes a vários antibióticos e causar doenças infecciosas graves (Garcia et al., 2022; Mancuso et al., 2021; Mukhopadhyay et al., 2020).

1.1.1. *Enterococcus faecium*

Enterococos são um grupo de bactérias cocos gram-positivos de grande relevância para a saúde humana. São organismos comensais do trato gastrointestinal humano e em muitos animais, incluindo animais para consumo humano e de companhia, que facilmente contaminam os alimentos e o meio ambiente, entrando assim na cadeia alimentar (Torres et al., 2018). Além disso, é um importante patógeno oportunista, especialmente as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, causando uma grande variedade de infecções. Este microrganismo não só contém mecanismos intrínsecos de resistência a vários agentes antimicrobianos, como também tem a capacidade de adquirir novos mecanismos de RAM e por isso é o quarto patógeno nosocomial causador de infecções mais prevalente em todo o mundo (Torres et al., 2018). São espécies resilientes e versáteis capazes de sobreviver em condições adversas, tornando-os aptos a sobreviver em ambiente de cuidados de saúde (García-Solache & Rice, 2019). São uma das principais causas de IACS em todo o mundo, em particular infecções do trato urinário (ITU), tecidos moles, endocardite, queimaduras e bacteriemia associadas a dispositivos. A multirresistência é comum, o que prolonga o tempo de internamento, aumenta o custo do tratamento e aumenta o risco de falha

terapêutica e conseqüentemente a morte (García-Solache & Rice, 2019; Gorrie et al., 2019; D. Oliveira et al., 2020; Patil et al., 2021).

Tratar uma infecção por enterococos é um desafio devido à sua capacidade de formação de biofilme, pois este impede a penetração dos antibióticos através da sua matriz, contribuindo para o aumento da tolerância aos mesmos (García-Solache & Rice, 2019).

1.1.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva esférica (coco) e pode ser responsável por infecção aguda da pele e das suas estruturas, bacteriemia, pneumonia, infecção osteoarticular, endocardite, entre outras patologias (Mancuso et al., 2021). Muito encontrada na microbiota da pele humana, normalmente é patogênica em indivíduos imunocomprometidos (Santos et al., 2007).

Por ser uma bactéria oportunista patogênica, pode causar infecções ao invadir regiões que normalmente não habita, como hematomas e feridas. *S. aureus* é capaz de causar infecções associadas a implantes médicos, principalmente devido à sua capacidade de formar biofilmes, o que representa um desafio no tratamento com antibióticos, devido à sua elevada resistência aos mesmos. Esta bactéria é ainda um importante agente etiológico de infecções da corrente sanguínea, como a septicemia (Mancuso et al., 2021; Patil et al., 2021).

S. aureus, com destaque para MRSA, está associado a um número crescente de infecções, relacionadas com os cuidados de saúde, particularmente observadas na endocardite infecciosa e nas infecções relacionadas com próteses (Bhatia et al., 2021; D. Oliveira et al., 2020; Patil et al., 2021).

1.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae é um bacilo Gram-negativo que pertence à família das Enterobacteriaceae (Mancuso et al., 2021). Esta bactéria é encontrada de forma ubíqua na superfície da mucosa de animais ou em locais do meio ambiente como a água, o solo, etc. Em humanos, *K. pneumoniae* concentra-se no trato gastrointestinal e em alguns casos na nasofaringe ou em tecidos, por onde a bactéria possa entrar na circulação sanguínea e,

assim, causar sépsis no hospedeiro (Clegg & Murphy, 2016; Wang et al., 2020). Por apresentar uma grande variedade de mecanismos de RAM é uma das principais causas de IACS (Luo et al., 2020).

Este patógeno causa infecções graves, incluindo infecções do trato urinário (ITU), abscesso hepático, pneumonia, septicemia, infecções de feridas cirúrgicas, meningite e endocardite (Wang et al., 2020). Muitas vezes, ITU associadas a cateteres urinários são causadas por *K.pneumoniae* devido à sua capacidade de formar biofilmes, já que estes aumentam a resistência bacteriana à eliminação e/ou morte pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Clegg & Murphy, 2016).

As infecções por *K. pneumoniae* são responsáveis por altas taxas de mortalidade e hospitalização prolongada, principalmente para utentes imunocomprometidos, diabéticos, insuficientes renais, entre outros (Bhatia et al., 2021; Clegg & Murphy, 2016; D. Oliveira et al., 2020; Patil et al., 2021).

1.1.4. *Acinetobacter baumannii*

A.baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, estritamente aeróbio, não fermentadora, catalase-positiva e oxidase-negativa (Mancuso et al., 2021). É considerado uma ameaça global no cenário da saúde, principalmente devido à sua tendência para adquirir mecanismos de resistência a múltiplos fármacos (Harding et al., 2018).

Mais frequentemente manifesta-se causando pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremia ou infecções da corrente sanguínea, e menos regularmente causa infecção do local cirúrgico, meningite, infecções intra-abdominais e infecções na pele e tecidos moles (Bhatia et al., 2021; Harding et al., 2018; D. Oliveira et al., 2020; Tiwari et al., 2015). Quando há a presença de *A. baumannii* em infecções subcutâneas e de tecidos moles, este forma biofilmes robustos, tanto dentro da ferida como em curativos oclusivos. *A. baumannii* tanto forma comunidades de biofilme na maioria das superfícies abióticas, como em equipamentos associados à assistência à saúde (Harding et al., 2018).

1.1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, que possui uma membrana externa pouco permeável e com múltiplos sistemas de transporte, que lhe conferem resistência inata a muitos antibióticos (Mancuso et al., 2021). É a causa de uma ampla gama de IACS

agudas e crônicas, como infecções do trato respiratório e urinário, septicemia, pneumonia associada à ventilação, infecção respiratória crônica, infecções da pele e tecidos moles, e endocardite (Patil et al., 2021). Tem uma alta incidência de infecção em vítimas de queimaduras e também em pacientes com fibrose cística, devido à sua capacidade de formar biofilmes e células persistentes nos pulmões (Bhatia et al., 2021; D. Oliveira et al., 2020; Patil et al., 2021). Neste contexto, *P. aeruginosa* é a terceira bactéria Gram-negativa mais comum, causando infecções nosocomiais da corrente sanguínea (Mancuso et al., 2021).

1.1.6. *Enterobacter* spp.

Enterobacter cloacae, é um membro deste gênero bacteriano e é considerado um importante patógeno nosocomial, responsável por várias infecções, incluindo pneumonia, infecções gastrointestinais, infecções de pele e tecidos moles, ITU, bacteriemia e endocardite (Bhatia et al., 2021; García-Solache & Rice, 2019; D. Oliveira et al., 2020; Patil et al., 2021).

Enterobacter spp. inclui bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Está associado a uma variedade de habitats ambientais e comensais naturais da microbiota intestinal humana e animal (García-Solache & Rice, 2019; Mancuso et al., 2021).

Possuem um flagelo que para além de facilitar a mobilidade, também é necessário para a formação de biofilme, exportação de proteínas e na adesão da bactéria às superfícies (García-Solache & Rice, 2019).

1.2 Biofilmes bacterianos

Biofilme é uma estrutura complexa que pode ser composta por diferentes colônias microbianas ou um único tipo de células num grupo, com o propósito de aderir a superfícies para sobreviver em condições ambientais adversas. Esta estrutura é constituída por uma camada de substâncias poliméricas extracelulares, à qual microrganismos como fungos e/ou bactérias estão ligados de forma séssil (Divakar et al., 2019; Rather et al., 2021; Sahoo et al., 2021). No caso específico dos biofilmes bacterianos, encontram-se comunidades de bactérias cuja fisiologia está alterada no sentido de uma maior tolerância a antimicrobianos (Sahoo et al., 2021). Os biofilmes são assim comunidades microbianas imóveis, que colonizam e crescem em superfícies abióticas ou bióticas tais como dispositivos médicos, suturas e pontos cirúrgicos, feridas, cateteres e implantes dentários, causando infeções que só podem ser tratadas pela sua eliminação e que levam a tratamentos difíceis devido à dificuldade que os antimicrobianos têm em atuar dentro do biofilme (Divakar et al., 2019).

O processo de formação do biofilme é complexo e composto por várias etapas como se pode observar na Figura 1. Esta formação inicia-se com a adesão das bactérias à superfície, como se pode observar na etapa 1, seguida de uma fixação irreversível das células, envolvendo a transição de bactérias da forma planctónica para a forma séssil, produtora de biofilme, etapa 2. Após a colonização inicial, ocorre modificação na expressão de genes e de proteínas, e de seguida a fase de crescimento exponencial, havendo também produção de exopolissacáridos e canais de água, facilitando o aporte de nutrientes, que levam à maturação do biofilme, tornando-se assim uma comunidade estável observada na etapa 3. Na última etapa, etapa 4, inicia-se a dispersão das células da superfície, que repetidamente, reiniciam a formação de biofilmes em novas superfícies. Todo o processo de formação é influenciado por condições externas, como por exemplo: a temperatura, pH, forças gravitacionais e a natureza das superfícies habitadas (Divakar et al., 2019; Rather et al., 2021).

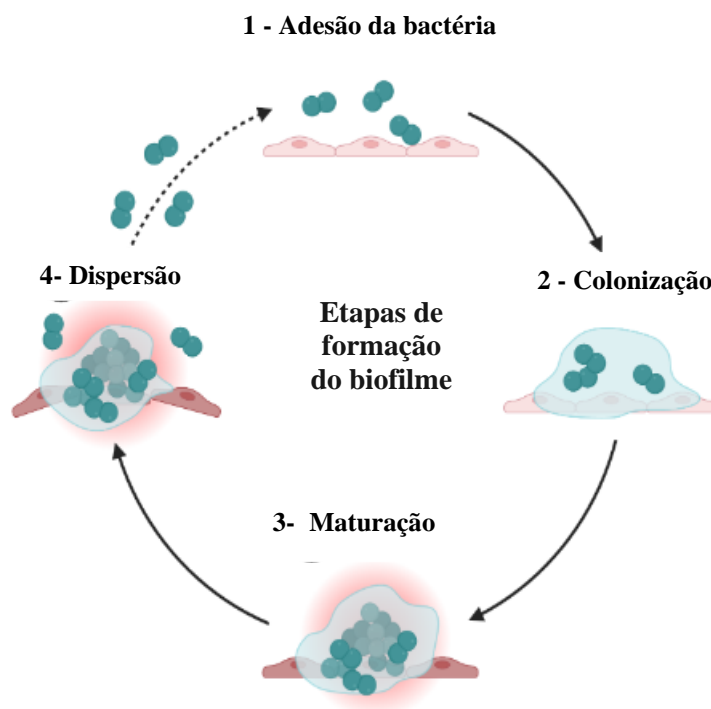


Figura 1 - Esquema ilustrativo do processo de formação de um biofilme microbiano: (1) – adesão das células bacterianas a uma superfície; (2) – colonização; (3) – maturação do biofilme; (4) – dispersão celular (biorender.com)

1.3 Produtos Naturais

Historicamente, os produtos naturais têm sido usados extensivamente há milhares de anos em muitas regiões do mundo. Os produtos naturais à base de plantas medicinais foram a origem de variadas preparações medicinais, já que os seus extratos ou partes detêm diversas propriedades como as atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena (Azab et al., 2016; Ekiert & Szopa, 2022; Harvey et al., 2015; Pazyar et al., 2013; Rao et al., 2019) Os produtos naturais e as suas atividades biológicas são atualmente um assunto de grande interesse na indústria farmacêutica, devido aos seus efeitos terapêuticos promissores (Ekiert & Szopa, 2022; Rao et al., 2019).

1.3.1. Plantas medicinais

Desde a antiguidade que se sabe que as plantas têm um elevado potencial como agentes antimicrobianos e, por isso, têm sido utilizadas com os mais diferentes propósitos. A atividade antibacteriana de diferentes plantas tem sido explorada, havendo um grande interesse em descobrir produtos vegetais, que podem efetivamente controlar a formação de biofilmes, assim como proceder à sua eliminação (Rather et al., 2021; Samreen et al., 2021). Vários extratos, óleos essenciais (OE) e nanoformulações à base de plantas medicinais têm vindo a ser extensivamente estudados, para combater os problemas relacionados com os biofilmes (Azab et al., 2016; Rather et al., 2021).

As plantas medicinais apresentam uma ampla aplicação, sendo utilizadas na prevenção e tratamento de diversas doenças, apresentando-se assim como uma alternativa ou tratamento complementar de infeções causadas por bactérias multirresistentes emergentes e reemergentes. As plantas medicinais podem, desta forma, dar uma contribuição significativa aos serviços de saúde, nomeadamente na prevenção e gestão de doenças transmissíveis, causadas por bactérias resistentes a antibióticos (Samreen et al., 2021).

Os produtos naturais derivados de plantas medicinais, como extratos e OE, têm sido usados desde o início da história da humanidade para diferentes propósitos e no tratamento de algumas doenças como infeções (Galovičová et al., 2021; Lagha et al., 2019; Unglaube et al., 2021; Wińska et al., 2019). Devido à tendência atual do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, torna-se urgente encontrar alternativas eficazes e seguras. Os OE, tendo em conta a variedade de atividades biológicas que apresentam, incluindo antimicrobiana, antioxidante, antibiofilme e antisséptico, apresentam um grande potencial como uma alternativa natural aos antibióticos, para combater uma variedade de microrganismos (Kowalczyk et al., 2020).

No entanto, os resultados dos OE requerem mais pesquisas para clarificar os mecanismos subjacentes à sua atividade biológica, com o objetivo de futuramente obter novos antissépticos naturais (Borugã et al., 2014).

Atualmente um exemplo de OE que é utilizado como desinfetante é o OE de tomilho (Kowalczyk et al., 2020), assim como a *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa*, *Cinnamomum zeylanicum*, que são igualmente utilizados como antissépticos individualmente e em misturas devido às suas propriedades antimicrobianas (Bailey et al., 2021; Borugã et al., 2014). Os benefícios do uso de OE como desinfetantes alternativos incluem, no seu estado puro ou em misturas, potencial

para aplicação em superfícies que podem não ser efetivamente alcançadas por desinfetantes químicos tradicionais (Bailey et al., 2021).

1.3.2 *Origanum vulgare*

O *Origanum vulgare*, usualmente designado por orégão, representado na Figura 2, é uma erva que pertence à família das plantas com flores Lamiaceae. É uma das espécies aromáticas mais renomadas, com um forte histórico tradicional como especiaria e planta medicinal. É uma planta nativa da Europa, do norte do continente africano e da maior parte da Ásia, mas o foco da sua diversidade está situado na região do Mediterrâneo, predominantemente na Turquia (Lombrea et al., 2020).

O OE de orégãos é um líquido extraído das suas folhas e flores e possui uma excelente atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, contendo ainda propriedades antioxidantes e sendo muito utilizado na área farmacológica (Unglaube et al., 2021). Possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana devido ao seu alto teor de compostos fenólicos (Tiwari et al., 2015; Y. Ma et al., 2022).

A eficácia do OE de orégãos contra uma ampla gama de bactérias patogénicas tem sido bastante estudada, representando uma alternativa eficiente como agente antimicrobiano contra estirpes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Os OE são um conjunto de compostos que aumentam a permeabilidade da membrana celular e causam expansão do conteúdo celular, o que resulta na perda do mesmo (Lombrea et al., 2020).

As propriedades desinfetantes e antibacterianas do OE de orégãos foram atestadas pela primeira vez, na Grécia antiga, onde era frequentemente utilizado para tratar contaminações bacterianas da pele e de feridas (Lombrea et al., 2020).



Figura 2 - *O. vulgare* (fonte: <https://jb.utad.pt/>)

1.3.3 *Thymus vulgaris*

O *Thymus vulgaris*, conhecido normalmente por tomilho, representada na Figura 3, é uma planta com flor, da família Lamiaceae e que é originária do sul da Europa (Wińska et al., 2019; Galovičová et al., 2021). Durante séculos o tomilho foi usado na medicina popular, pelos seus efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios, e, devido a essas características, o OE de *T. vulgaris* é eficaz contra bactérias, fungos e vírus (Galovičová et al., 2021).

A propriedade biológica mais importante do OE de tomilho é a atividade antibacteriana. Esta atividade está relacionada com o combate bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de apresentar atividade antibiofilme, tendo a capacidade de inibir o crescimento destes. O OE de tomilho pode ser assim considerado um produto com propriedades antissépticas (Bailey et al., 2021; Galovičová et al., 2021; Wińska et al., 2019).



Figura 3 - *T. vulgaris* (fonte: <https://jb.utad.pt/>)

1.3.4 Água Termal

Desde sempre que as propriedades medicinais das águas termais (AT) são conhecidas. Hipócrates já relatava a importância dos poderes da água na terapia, observando a variedade de sabores e origens das AT (Cribier, 2020). Ao longo da história dos estabelecimentos termais, as fontes termais têm sido extensivamente exploradas para banhos, tendo em conta as suas propriedades medicinais (Cribier, 2020). Segundo o Ministério da Saúde, a AT é uma água mineral natural (AMN), utilizada num estabelecimento termal, para uso terapêutico no domínio do termalismo (Nguyen, 2020). O Decreto-Lei nº 90/90 de 16 de março de 1990 (Decreto-Lei n.º 90/90 de 16 de Março, 1990), da legislação portuguesa, descreve a AMN como sendo ‘água bacteriologicamente própria, de circulação profunda, com particularidades físico-químicas estáveis na origem, dentro da gama de flutuações naturais, de que resultam propriedades terapêuticas ou simplesmente, efeitos favoráveis à saúde’ (Decreto-Lei n.º 90/90 de 16 de Março, 1990; L. Oliveira et al., 2009).

A AMN difere de outras águas designadas ao consumo humano pela sua natureza, pelo seu teor de minerais, oligoelementos ou outros constituintes e também pela sua pureza original. Todas as características devem ser preservadas intactas, devido à origem subterrânea desta água, que foi preservada de qualquer risco de poluição (Nguyen, 2020).

Vão também exibir mineralizações totais ou determinadas características específicas, de diferentes valores de pH, sulfuração, sílica e CO₂. A qualidade e temperatura da água estão diretamente relacionadas com a morfologia do solo, do qual emergem (L. Oliveira et al., 2009). Como relatado no Manual de Boas Práticas dos estabelecimentos termais (L. Oliveira et al., 2009), as águas minerais naturais distinguem-se das águas “normais” de uma dada região pela sua especificidade físico-química. Alguns dos aspetos que as diferenciam são a mineralização e/ou a temperatura.

No que toca a temperatura estão incluídas as seguintes classificações:

- Hipotermais (se surgem a < 25 °C);
- Mesotermais (se surgem a > 25 °C e ≤ a 35 °C);
- Termiais (se surgem > a 35 °C e ≤ a 40 °C);
- Hipertermiais (se surgem > a 40 °C).

Quanto à mineralização das AMN é proposta a seguinte classificação:

- Hipossalinas: mineralização total < a 200 mg/L;
- Fracamente mineralizadas: mineralização total entre 200 e 1000 mg/L;
- Mesossalinas: mineralização total entre 1000 e 2000 mg/L;
- Hipersalinas: mineralização total > a 2000 mg/L.

A classificação da AMN pode ter por base a análise de diferentes propriedades e foi avaliada consoante o nível geológico, hidrogeológico, físico, químico, microbiológico, farmacológico, fisiológico e clínico (Direção Geral de Energia e Geologia, 2023; Gonçalves, 2016; Nguyen, 2020; L. Oliveira et al., 2009).

Com base na composição química da água, o projeto hidrogenoma (Direção Geral de Energia e Geologia, 2023), propõe as seguintes classes, para as AMN portuguesas:

- Sulfúreas, as que contêm formas reduzidas de enxofre;
- Gasocarbónicas, caracterizadas por terem mais de 500 mg/L de CO₂ livre;
- Bicarbonatadas, cujo ião dominante é o HCO₃⁻;
- Cloretadas, cujo ião dominante é o cloreto;
- Sulfatadas, cujo ião dominante é o sulfato.

Pela sua diversidade geológica, Portugal é um país rico em AMN. Grande parte destas encontram-se localizadas na zona norte do país e são na grande maioria de composição sulfúrea, como se pode observar na Figura 4.

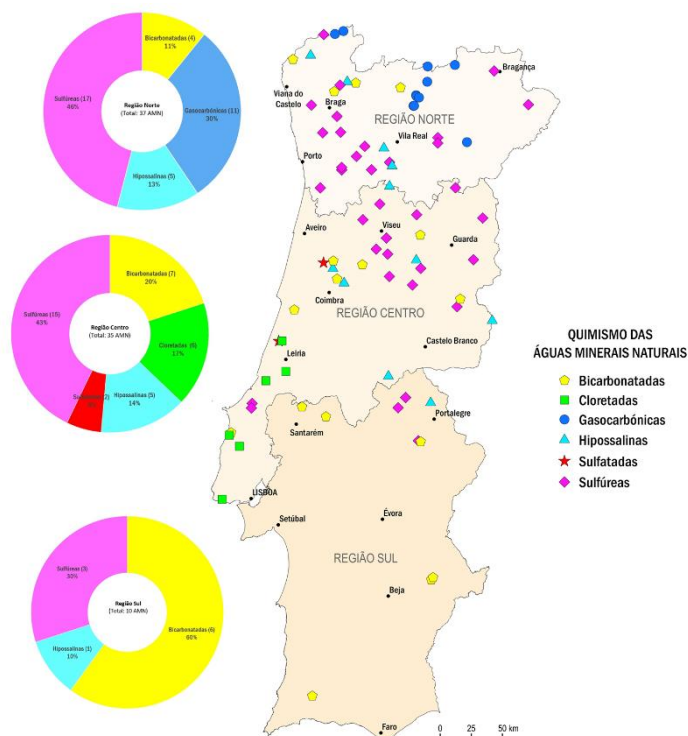


Figura 4 - AMN em Portugal Continental (fonte: Direção-Geral de Energia e Geologia)

Aquae Flaviae, a atual cidade de Chaves, nasceu junto ao rio Tâmega e detém umas das termas mais frequentadas em Portugal. A AMN de Chaves é uma água gasocarbónica, bicarbonatada, hipertermal e rica em minerais. Esta água brota a 76°C e tem um pH de 6,80 (a 20 °C), reunindo as características ideais para estimular funções metabólicas e orgânicas, em parte devido à sua mineralização (Chaves, 2023a). A utilização destas águas com finalidade curativa tem sido experienciada em combinação com várias terapias como fisioterapia, terapia de reabilitação, tratamento de doenças e programas de promoção da saúde. Os resultados benéficos devem-se às propriedades analgésicas, antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias das AMN (An et al., 2019; Viegas et al., 2019).

Os efeitos químicos resultam de minerais, fármacos, iões, oxigénio, lama e ervas, adicionados à água pura, desencadeiam reações químicas na pele, que melhoram a integridade e a imunidade da mesma (An et al., 2019)

Tendo em conta apenas a sua mineralização e a respetiva composição físico- química, e não tendo em consideração as técnicas termais e complementares disponíveis em cada estabelecimento termal, as AMN podem deter indicações terapêuticas para patologias do aparelho digestivo (gastrointestinais e hepatovesiculares), doenças metabólicas-endócrinas (diabetes, hiperuricemia), doenças do aparelho nefro-urinário (litíase úrica), do sistema respiratório (rinite, sinusite, laringite, doença pulmonar obstrutiva crónica) e doenças ginecológicas (L. Oliveira et al., 2009).

As técnicas termais complementares dizem respeito ao método de administração da AMN, podendo ser um método de administração interna quando ocorre ingestão, injeção ou a administração de AMN por via colo-retal, ou ainda, técnicas de administração externa, aproveitando assim os fatores hidromecânicos e hidrotérmicos comuns à hidroterapia, como por exemplo: banhos, duches, vapores, massagens, pelóides, técnicas respiratórias, entre outras (An et al., 2019; L. Oliveira et al., 2009).

As AT, como todas as águas da terra (águas superficiais, subterrâneas, oceânicas, etc) são ricas em microrganismos essenciais e muito úteis para os seres humanos e os ecossistemas, e as suas propriedades provêm também da sua especificidade (Viegas et al., 2019).

A AT de Chaves é reconhecida pelas suas características únicas, como se pode observar na Tabela 1. É indicada para o tratamento de diversas patologias músculo-esqueléticas degenerativas (coluna, anca e joelhos), inflamatórias (arterite reumatóide, arterite gotosa, arterite psoriática, espondilite, fibromialgia, tendinites e epicondilites) e recuperação pós-traumática de fraturas e luxações. É também indicada para patologias do sistema gastro-intestinal (gastrite, duodenite, discinesia hepato-biliar, síndrome do cólon irritável e obstipação), bem como para patologias das vias respiratórias (rinite, sinusite, faringite, laringite, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crónica e asma) (Chaves, 2023b, 2023a).

Tabela 1 - Caracterização físico-química da AT de Chaves (Fonte <https://www.termasdechaves.com/as-aguas-termais>)

AT de Chaves - Caracterização físico-química	
Temperatura	76 °C
pH (a 20 °C)	6,8
Condutividade elétrica (a 20 °C)	2320 μScm^{-1}
Alcalinidade (em mL.L ⁻¹ de HCl 0,1M)	288,9
Resíduos secos (a 180 °C)	1744 mg.L ⁻¹
Dureza Total (em p.p 105 de CaCO ₃)	7,4
Dióxido de carbono (média anual)	600 mg.L ⁻¹
Fluoreto	8,3 mg.L ⁻¹
Mineralização total	2625 mg.L ⁻¹
Hidrogenocarbonato	1762 mg.L ⁻¹
Sódio	623 mg.L ⁻¹

2. Objetivos

Tendo em conta a escassez de estudos envolvendo a AT de Chaves e a sua possível aplicação como desinfetante de superfícies abióticas aliada a OE de *T. vulgaris* e de *O. vulgare*, e sendo ambos os produtos naturais reconhecidos pelas suas atividades antibacteriana e antibiofilme, é também de elevado interesse e inovador realizar o presente estudo, cujo objetivo geral é:

- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme dos OE de *T. vulgaris* e de *O. vulgare* e da AT de Chaves individualmente e em combinação contra as bactérias do grupo *ESKAPE*;

E os objetivos específicos :

- Identificar a mistura e respetiva concentração mais promissora na eliminação de bactérias do grupo *ESKAPE*;
- Avaliar a capacidade de inibição e redução de biofilmes de bactérias do grupo *ESKAPE* pela mistura de OE e AT de Chaves selecionada anteriormente;
- Reconhecer se a solução em estudo poderá ser uma alternativa de desinfecção e limpeza de superfícies contaminadas.

3. Material e Métodos

3.1 Óleos essenciais

O OE de *T. vulgaris* e o OE de *O. vulgare* foram adquiridos à empresa Assemis®. O OE de *T. vulgaris* foi obtido a partir das flores da planta, e o *O. vulgare* foi obtido a partir das flores e folhas.



Figura 5 – OE de *T.vulgaris*



Figura 6 – OE de *O. Vulgare*

3.2 Microrganismos e condições de crescimento

Para este estudo foram utilizadas seis espécies bacterianas relacionadas com IACS, nomeadamente *E. faecium* (isolado clínico), *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* (isolado clínico), *A. baumannii* (isolado clínico), *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. cloacae* (isolado clínico).

Para o cultivo destes microrganismos foram utilizados os meios de cultura líquidos Tryptic Soy Broth (TSB) e Brain Heart Infusion (BHI). Em BHI foram semeadas as bactérias *E. faecium*, *A. baumannii*, *E. cloacae* e em TSB as bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

Todos os microrganismos foram semeados no respetivo meio líquido a 37 °C em aerobiose, com agitação durante 24 horas (Alibi et al., 2020a; Stepanović et al., 2000).

3.3 Preparação das amostras para análise

Tendo em conta a conhecida atividade antimicrobiana dos OE em estudo e da AT de Chaves, foram preparadas diferentes amostras para análise, incluindo misturas com os OE e com a AT. Assim, foram realizados ensaios a partir das seguintes amostras:

- 1- AT de Chaves a 100% (v.v⁻¹);
- 2- OE de *T. vulgaris* a 10 mg.mL⁻¹ preparado em meio de cultura;
- 3- OE de *O. vulgare* a 10 mg.mL⁻¹ preparado em meio de cultura;
- 4- OE *T. vulgaris* 10 mg.mL⁻¹ preparado em AT de Chaves;
- 5- OE *O. vulgare* 10 mg.mL⁻¹ preparado em AT de Chaves;

As amostras contendo OE foram preparadas inicialmente a 250 mg.mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% (v.v⁻¹), onde foi pesado 5 g de OE e adicionado 5 mL de DMSO, sendo em seguida preparadas as amostras com as concentrações finais usadas nos ensaios.

3.4 Controlos

Em todos os ensaios foram realizados controlos negativos (apenas meio de cultura e bactéria), controlos positivos (gentamicina e bactéria) e controlos de esterilidade das amostras e dos meios. Todos os controlos foram executados em triplicado.

O antibiótico gentamicina foi utilizado como controlo positivo deste estudo pois está descrito como sendo um antibacteriano de largo espectro que tem atividade sobre as bactérias usadas neste trabalho (Hayward et al., 2018; Kumar et al., 2008; Raza et al., 2023).

Tabela 2 - Controlos realizados na avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de OE e de AT, isoladamente e em associação.

Controlos Negativos	Controlos Positivos	Controlos de esterilidade das amostras	Controlos de esterilidade dos meios
BHI + <i>E. faecium</i>	Gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + <i>E. faecium</i>	AT	BHI TSB
BHI + <i>A. baumannii</i>	Gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + <i>A. baumannii</i>	OE <i>T. vulgaris</i> + BHI	
BHI + <i>E. cloacae</i>	Gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + <i>E. cloacae</i>	OE <i>T. vulgaris</i> + TSB	
TSB + <i>P. aeruginosa</i>	Gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + <i>P. aeruginosa</i>	OE <i>O. vulgare</i> + BHI	
TSB + <i>S. aureus</i>	Gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + <i>S. aureus</i>	OE <i>O. vulgare</i> + TSB	
TSB + <i>K. pneumoniae</i>	Gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + <i>K. pneumoniae</i>	OE <i>T. vulgaris</i> + AT	
		OE <i>O. vulgare</i> + AT	

3.5 Avaliação da atividade antibacteriana

A capacidade antibacteriana dos OE e da AT, isoladamente e em associação, de cada uma das cinco amostras em análise, para todas as bactérias, foi realizada de acordo com (Soković et al., 2010)), com algumas modificações e foi determinada através do método de microdiluição e medição da DO_{620nm} inicial e final. Para isso, em microplacas estéreis de 96 poços, de fundo achatado e com tampa, foram distribuídos 200 μL da amostra a testar (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os OE e 100% (v.v⁻¹) para a AT) nos poços da linha A. Nos restantes poços foram adicionados 100 μL de meio de cultura líquido, TSB ou BHI, de acordo com a espécie bacteriana. A partir dos poços da linha A foram feitas diluições sucessivas de 1:2, obtendo assim um intervalo de concentrações entre 10 e 0.078 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os óleos essenciais, e entre 100 e 0.78% (v.v⁻¹) para a AT. Por fim, foram adicionados 10 μL de bactéria, padronizados a $1.5 \times 10^8 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, a todos os poços. Aos controlos positivos foram adicionados 100 μL de gentamicina a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10 μL de bactéria. Os controlos negativos foram preparados adicionando 10 μL de microrganismo a 100 μL de meio de cultura líquido (TSB ou BHI). As microplacas foram fechadas, seladas com parafilme, e incubadas a 37 °C durante 24 horas, com agitação (150 rpm). Após incubação, foram medidas as DO_{620nm} finais para determinar se ocorreu ou não crescimento bacteriano. Todas as análises foram realizadas em triplicado (Soković et al., 2010a).

3.6 Avaliação da atividade antibiofilme

Para a avaliação da atividade antibiofilme das misturas em estudo, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, que se trata de um método rápido e confiável, que permite quantificar células viáveis em suspensões de células procarióticas. Permite, assim, determinar a ação antibiofilme exercida pelas misturas a avaliar, pois tem a capacidade de distinguir, dentro de uma população bacteriana, as células intactas (vivas) e as células danificadas (mortas). É um método baseado na quantificação e análise simultânea de diversos parâmetros físicos das partículas dispersas num fluxo e irradiadas por uma fonte de luz, numa suspensão celular, permitindo determinar uma grande quantidade de características de cada célula como o tamanho, complexidade, forma, densidade, fluorescência, através da dispersão da luz incidente e da emissão de fluorescência, num curto espaço de tempo. O BD Cell Viability Kit (BD™ Biosciences) permite determinar a viabilidade celular, disponibilizando uma solução de laranja de tiazol (TO – *Thiazole Orange*) que cora todas as células, e uma solução de iodeto de propídio (PI – *Propidium Iodide*) para corar apenas as células mortas. As células vivas têm membranas completas e são impermeáveis a corantes como o PI, que se liga a células com membranas comprometidas. No que toca ao TO é um corante permeável e entra em todas as células, vivas, mortas ou danificadas. Assim, a combinação desses dois corantes fornece um rápido e confiável método para distinguir células procarióticas vivas e mortas (BD, 2015; Silva, 2021; Stepanović et al., 2000).

3.6.1 Inibição do biofilme

A capacidade de inibição da formação de biofilme de bactérias do grupo *ESKAPE* por parte das amostras em estudo, foi determinada por citometria de fluxo. Para tal, a adição de amostra nas microplacas foi feita antes da incubação das mesmas, ou seja, no momento anterior ao início da formação de biofilme. Numa primeira fase, foi preparada uma suspensão de bactéria em 20 mL de meio de cultura líquido (TSB ou BHI), a qual foi incubada a 37 °C *overnight*. Após incubação, a DO_{620nm} das suspensões foi ajustada a 2 ± 0,02 com meio de cultura líquido (TSB ou BHI). Em microplacas estéreis de 96 poços, de fundo achatado e com tampa, foram distribuídos 196 µL de amostra em estudo (misturas de OE e AT) e, de seguida, adicionados 4 µL de suspensão de microrganismo

(concentração final de aproximadamente 5×10^6 UFC.mL⁻¹). Aos controlos positivos foram adicionados 196 μ L de gentamicina a 10 μ g.mL⁻¹ e 4 μ L de suspensão bacteriana. Os controlos negativos foram preparados adicionando a mesma quantidade de bactéria a 196 μ L de meio de cultura líquido (TSB ou BHI). As microplacas foram fechadas, seladas com parafilme e incubadas a 37 °C durante 24 horas com agitação (150 rpm). Após incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com NaCl a 0,9% (m.v⁻¹) estéril, de modo a remover todas as células não aderentes. De seguida, em cada poço, foram adicionados 200 μ L de Tween 20 a 0.01 % (v.v⁻¹) e raspado durante 1 min com o objetivo de ressuspender todas as células aderidas. O conteúdo de cada poço foi transferido na totalidade para o tubo correspondente de Eppendorf de 1,5 mL e foram adicionados 5 μ L de TO e 5 μ L de PI ao conteúdo de cada tubo. De seguida, estes foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos no escuro. Após incubação, o conteúdo de cada tubo foi analisado por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, BD™Biosciences). De modo a obter resultados uniformes e de fácil comparação, foram adquiridos 10 μ L do conteúdo total de cada tubo, previamente homogeneizado. Todas as análises foram realizadas em triplicado (BD, 2015; Silva, 2021)

3.6.2. Redução do biofilme

Tal como para a inibição de biofilme, o poder de redução da formação de biofilme de bactérias do grupo *ESKAPE* por parte das amostras em estudo foi determinada por citometria de fluxo. Para tal, a adição de amostra nas microplacas foi feita após incubação destas, ou seja, após formação de biofilme. Neste sentido, foram adicionados, em microplacas estéreis de 96 poços, de fundo achatado e com tampa, 196 μ L de meio de cultura líquido (TSB ou BHI) de acordo com a bactéria e, de seguida, 4 μ L de suspensão de bactéria a uma DO_{620nm} de $2 \pm 0,02$. Os controlos foram preparados de acordo com a avaliação da capacidade de inibição de biofilme. Após incubação a 37 °C durante 24 horas com agitação (150 rpm), para formação de biofilme, o conteúdo de cada poço foi removido e os poços lavados duas vezes com NaCl a 0,9% (m.v⁻¹) estéril para remoção de células não aderidas. De seguida, foram adicionados 200 μ L da amostra em estudo e as placas foram novamente incubadas a 37 °C durante 24 horas com agitação (150 rpm). A análise por citometria de fluxo foi realizada de acordo com o descrito anteriormente

para a inibição do biofilme. Todas as análises foram realizadas em triplicado (Silva, 2021).

4. Resultados

Nas tabelas e gráficos de seguida apresentados podem ser observados os resultados obtidos relativos à atividade antibacteriana dos OE de *T. vulgaris*, de *O. vulgare* e da AT de Chaves, isoladamente e em associação, contra bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão, determinada pelo método de microdiluição e avaliação do crescimento bacteriano pela leitura final de DO_{620nm} .

No que diz respeito à aplicação de OE de *T. vulgaris* sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão, verificou-se que, na maioria dos casos, a concentração deste óleo com melhor atividade antibacteriana foi a de 10 mg.mL^{-1} , com exceção para *A. baumannii*, para o qual a concentração de 5 mg.mL^{-1} demonstrou ser mais eficaz (Tabela 3). Assim, constatou-se que para *E. faecium*, a aplicação de OE de *T. vulgaris* a uma concentração de 10 mg.mL^{-1} resultou na eliminação de 100% das células bacterianas. Já para *E. cloacae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, esta mesma concentração de OE resultou numa sobrevivência das bactérias em 34,5%, 4,51%, 6,43% e 41,2%, respetivamente. Relativamente a *A. baumannii*, a concentração de 5 mg.mL^{-1} de OE de tomilho foi responsável pela morte de aproximadamente 98.5% das células bacterianas em suspensão. Por outro lado, observou-se que este OE, em determinadas concentrações, potenciou o crescimento de *E. faecium* e *S. aureus* (Figura 7). De um modo geral, a ação do controlo positivo, a gentamicina a $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi semelhante à do OE, com exceção de *E. faecium*, sobre a qual o OE teve melhor efeito, e *P. aeruginosa*, onde a gentamicina surtiu maior atividade antibacteriana.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do OE de *T. vulgaris*, isoladamente, sobre bactérias do grupo *ESKAPE*

Espécies bacterianas	OE de <i>T. vulgaris</i> (mg.mL ⁻¹)								Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078	10
<i>E. faecium</i>	0,00	16,3	26,4	35,7	48,3	48,8	52,5	113	13,6
<i>A. baumannii</i>	5,56	1,51	30,1	43,8	49,3	44,6	45,4	86,3	12,0
<i>E. cloacae</i>	34,5	45,3	40,6	41,5	48,9	50,8	40,1	92,7	23,2
<i>S. aureus</i>	4,51	128	129	121	117	70,3	53,2	111	9,36
<i>K. pneumoniae</i>	6,43	36,6	34,8	37,2	46,3	63,4	75,3	88,5	6,44
<i>P. aeruginosa</i>	41,2	61,9	55,9	48,5	53,6	54,7	62,0	76,2	5,39

Legenda: CN – controlo negativo (controlo de crescimento); CP – controlo positivo (gentamicina)

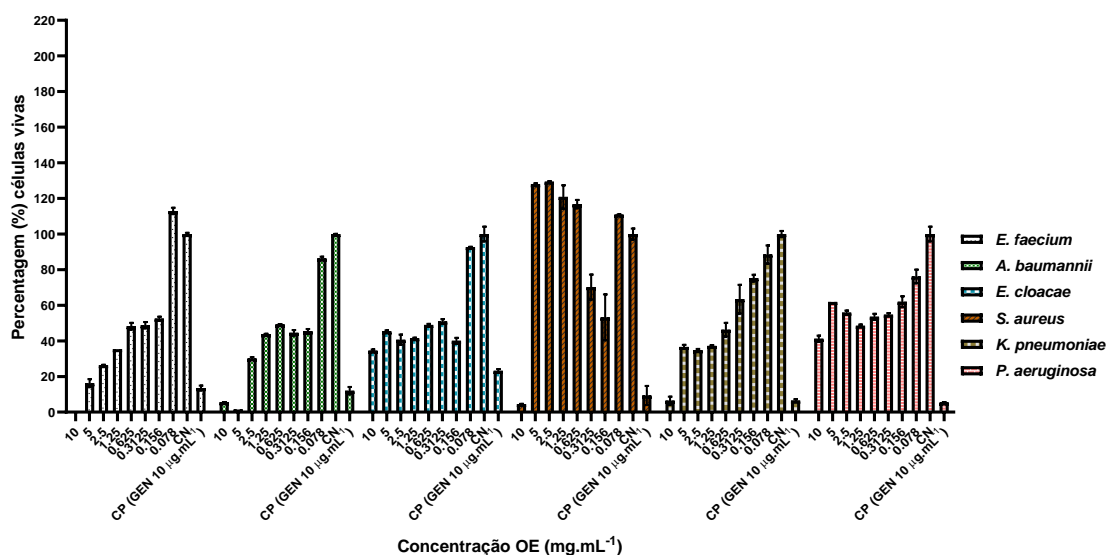


Figura 7 - Atividade antibacteriana do OE de *T. vulgaris* em bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão

Quando aplicado o OE de *O. vulgare* sobre as bactérias em estudo, observou-se que, mais uma vez, a concentração de 10 mg.mL⁻¹ revelou a maior atividade antimicrobiana contra a maioria das espécies bacterianas, nomeadamente *E. faecium*, *A. baumannii*, *E. cloacae* e *P. aeruginosa* (Tabela 4). Usando a amostra de OE nessa concentração, houve uma inibição de 100% para as três primeiras espécies e de 8,19% para a última (Figura 8). No que diz respeito a *S. aureus* e *K. pneumoniae*, as concentrações de OE de 1,25 mg.mL⁻¹ e 0,3125 mg.mL⁻¹, respetivamente, mostraram os melhores resultados na eliminação de células bacterianas dessas espécies, com a percentagem de células vivas a rondar os 2,78% e 1,20%, de acordo com a ordem indicada. Contrariamente, observou-se um aumento na percentagem de células vivas para *S. aureus* ao aplicar uma concentração de OE de 0.156 mg.mL⁻¹ e (206%) e 0.078 mg.mL⁻¹ (179%), e para *P. aeruginosa* quando usadas 0.078 mg.mL⁻¹ (123%). Globalmente, a ação antibacteriana da gentamicina a 10 µg.mL⁻¹ foi inferior ou semelhante à do OE.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare*, isoladamente, sobre bactérias do grupo *ESKAPE*

	OE de <i>O. vulgare</i> (mg.mL ⁻¹)								Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078	10
Espécies bacterianas	% de células vivas em relação ao CN								
<i>E. faecium</i>	0,00	7,34	3,00	0,78	1,11	0,00	12,8	69,9	19,1
<i>A. baumannii</i>	0,00	3,21	2,03	1,48	1,48	1,48	0,734	59,8	20,6
<i>E. cloacae</i>	0,00	2,95	2,05	2,45	3,59	34,4	35,0	78,3	19,4
<i>S. aureus</i>	3,412	8,53	4,13	2,78	9,53	80,9	206	179	17,3
<i>K. pneumoniae</i>	9,52	3,36	2,11	1,54	1,20	1,31	23,2	62,1	7,41
<i>P. aeruginosa</i>	8,19	27,0	38,4	45,4	56,7	70,3	79,8	124	6,62

Legenda: CN – controlo negativo (controlo de crescimento); CP – controlo positivo (gentamicina)

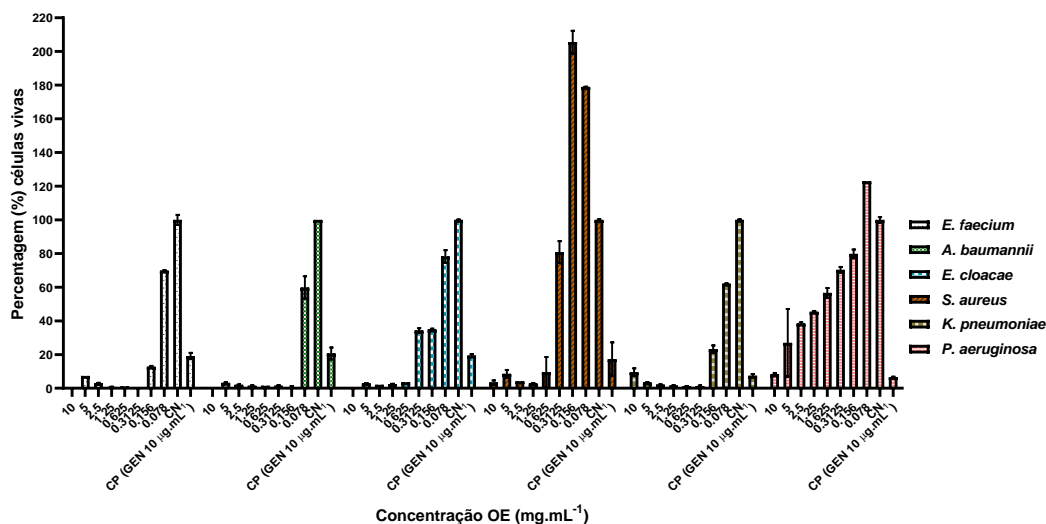


Figura 8 - Atividade antibacteriana do OE de *O. vulgare* sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão

A atividade antimicrobiana da AT de Chaves, a diferentes concentrações, foi igualmente testada sobre as bactérias acima referidas (Tabela 5). Neste caso, observou-se que a AT de Chaves quando aplicada não diluída resultou numa diminuição da percentagem de células vivas de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* para 45,3%, 11,4% e 12,4%, respetivamente. Já para *E. faecium*, a concentração de AT que levou a uma maior redução do número de células vivas foi a de 3,125 mg.mL⁻¹ (60,8%), e para *S. aureus* a de 50 mg.mL⁻¹ (53,7%). Tal como observado para os OE, também a AT de Chaves, em algumas das concentrações a que foi usada, resultou no crescimento de algumas das espécies bacterianas estudadas (Figura 9). Neste caso, a gentamicina a 10 µg.mL⁻¹, usada neste estudo como controlo positivo, levou a níveis de morte celular sempre superiores aos causados pela AT de Chaves.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana da AT de Chaves, isoladamente, sobre bactérias do grupo *ESKAPE*

Espécies bacterianas	AT de Chaves (v.v ⁻¹)								Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	10
<i>E. faecium</i>	69,8	92,1	113	81,8	85,5	60,8	68,4	94,9	12,4
<i>A. baumannii</i>	45,3	88,4	99,0	84,2	71,9	78,9	69,3	110	13,7
<i>E. cloacae</i>	71,5	141	161	144	131	112	134	96,3	26,3
<i>S. aureus</i>	60,9	53,7	89,5	66,3	73,3	63,1	60,1	97,5	9,55
<i>K. pneumoniae</i>	11,4	52,5	51,3	57,8	73,4	67,3	61,7	116	6,14
<i>P. aeruginosa</i>	12,4	44,6	76,7	79,2	88,5	85,1	87,4	98,1	5,34

Legenda: CN – controlo negativo (controlo de crescimento); CP – controlo positivo (gentamicina)

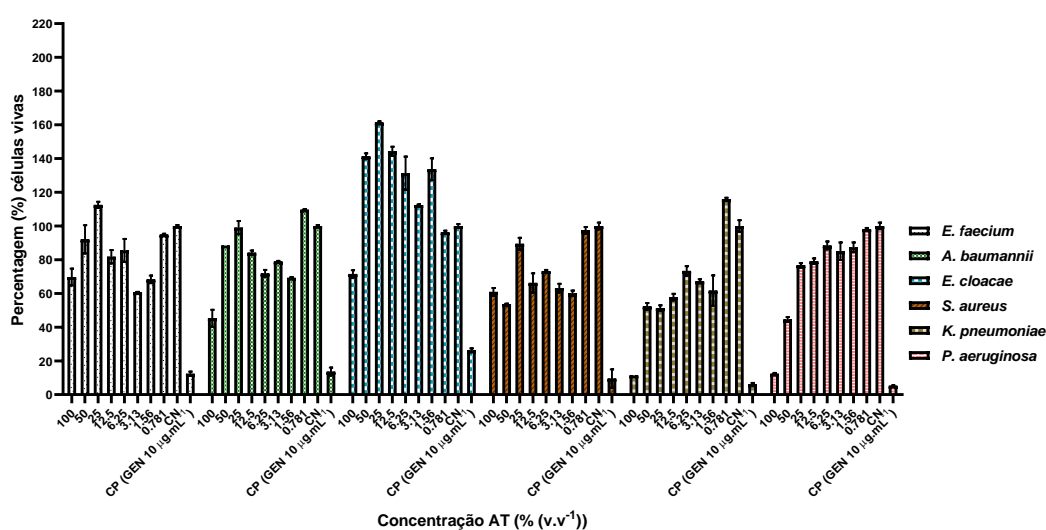


Figura 9 - Atividade antibacteriana da AT de Chaves sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão

Após serem testados os OE e a AT de Chaves isoladamente sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão, procedeu-se à avaliação das misturas de OE de *T. vulgaris* ou *O. vulgare* com AT de Chaves sobre esses mesmos microrganismos (Tabela 6). No que diz respeito ao uso de OE de *T. vulgaris* em combinação com a AT de Chaves, verificou-se

que no caso de *E. faecium* e *A. baumannii*, a concentração de OE que levou à maior redução da percentagem de células vivas foi a de 5 mg.mL⁻¹, resultando em reduções de 100% e 96%, respetivamente (Figura 10). Por outro lado, a concentração de OE de 10 mg.mL⁻¹ foi a que surtiu maior efeito antibacteriano sobre as restantes espécies, levando à obtenção de percentagens de células vivas de 24,2% para *E. cloacae*, 1,02% para *S. aureus*, 3,62% para *K. pneumoniae*, e 6,53% para *P. aeruginosa*. De uma forma global, a mistura de OE de *T. vulgaris* com AT de Chaves apresentou uma maior ação antibacteriana sobre as bactérias em estudo, do que o controlo positivo, a gentamicina a 10 µg.mL⁻¹.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana do OE de *T. vulgaris* em associação com a AT de Chaves sobre bactérias do grupo *ESKAPE*

	OE de <i>T. vulgaris</i> + AT de Chaves (mg.mL ⁻¹)								Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078	10
Espécies bacterianas	% de células vivas em relação ao CN								
<i>E. faecium</i>	4,14	0,00	0,00	23,1	25,2	49,4	59,7	131	12,7
<i>A. baumannii</i>	17,7	3,99	4,39	9,45	43,7	84,1	58,6	101	37,9
<i>E. cloacae</i>	24,2	39,0	68,2	93,03	70,2	51,4	55,4	90,9	88,2
<i>S. aureus</i>	1,02	7,35	70,4	148	153	136	147,5	98,9	16,6
<i>K. pneumoniae</i>	3,62	8,32	27,2	38,8	76,2	65,7	63,3	91,6	7,48
<i>P. aeruginosa</i>	6,53	17,1	36,9	67,2	68,1	53,9	55,2	89,4	5,64

Legenda: CN – controlo negativo (controlo de crescimento); CP – controlo positivo (gentamicina)

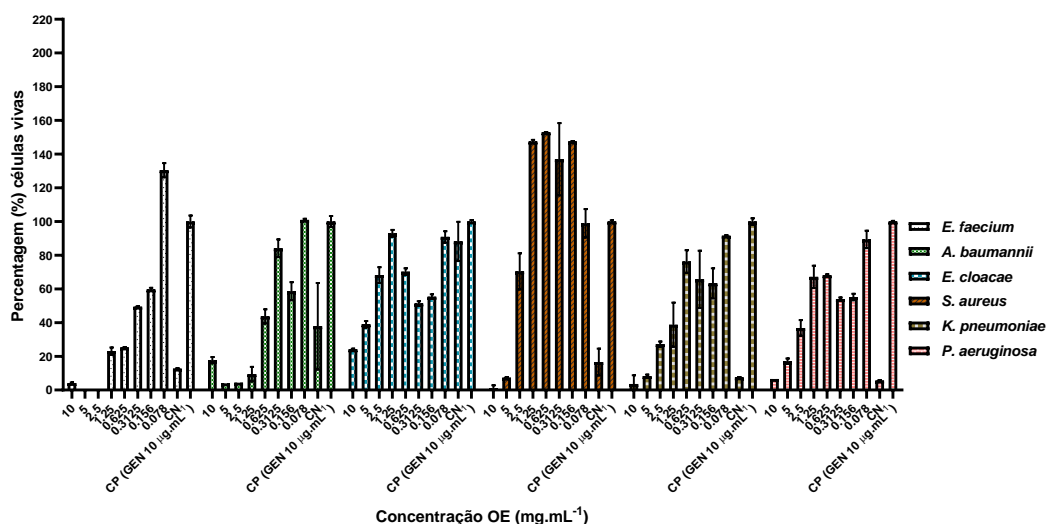


Figura 10 - Atividade antibacteriana do OE de *T. vulgaris* em associação com AT de Chaves sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão

Relativamente ao uso da mistura de OE de *O. vulgare* em associação com a AT de Chaves em bactérias *ESKAPE*, os resultados obtidos mostram que o OE a uma concentração de 10 mg.mL⁻¹ levou à maior diminuição do número de células vivas em cerca de 97,7% e 93,6% para *S. aureus* e *K. pneumoniae*, respetivamente (Tabela 7). Já para as espécies *E. faecium* e *E. cloacae*, a concentração que levou a melhores resultados na redução do número de células vivas foi a de 0,625 mg.mL⁻¹, resultando na recuperação de 22,3% de células vivas para *E. faecium*, e de 26,2% para *E. cloacae*. A concentração que teve maior efeito antibacteriano sobre *A. baumannii* foi a de 1,25 mg.mL⁻¹, e sobre *P. aeruginosa* foi a de 5 mg.mL⁻¹, que resultaram na recuperação de células vivas em cerca de 15,2% e 10,9%, respetivamente (Figura 11). Mais uma vez, a mistura de OE com AT de Chaves surtiu numa maior eliminação de células bacterianas quando comparada com a gentamicina a 10 μg.mL⁻¹.

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* em associação com a AT de Chaves sobre bactérias do grupo *ESKAPE*

Espécies bacterianas	OE de <i>O. vulgare</i> + AT de Chaves (mg.mL ⁻¹)								Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078	10
<i>E. faecium</i>	4,14	0,00	0,00	23,1	25,2	49,4	59,7	131	12,7
<i>A. baumannii</i>	17,7	3,99	4,39	9,45	43,7	84,1	58,6	101	37,9
<i>E. cloacae</i>	24,2	39,0	68,2	93,03	70,2	51,4	55,4	90,9	88,2
<i>S. aureus</i>	1,02	7,35	70,4	148	153	136	147,5	98,9	16,6
<i>K. pneumoniae</i>	3,62	8,32	27,2	38,8	76,2	65,7	63,3	91,6	7,48
<i>P. aeruginosa</i>	6,53	17,1	36,9	67,2	68,1	53,9	55,2	89,4	5,64

Legenda: CN – controlo negativo (controlo de crescimento); CP – controlo positivo (gentamicina)

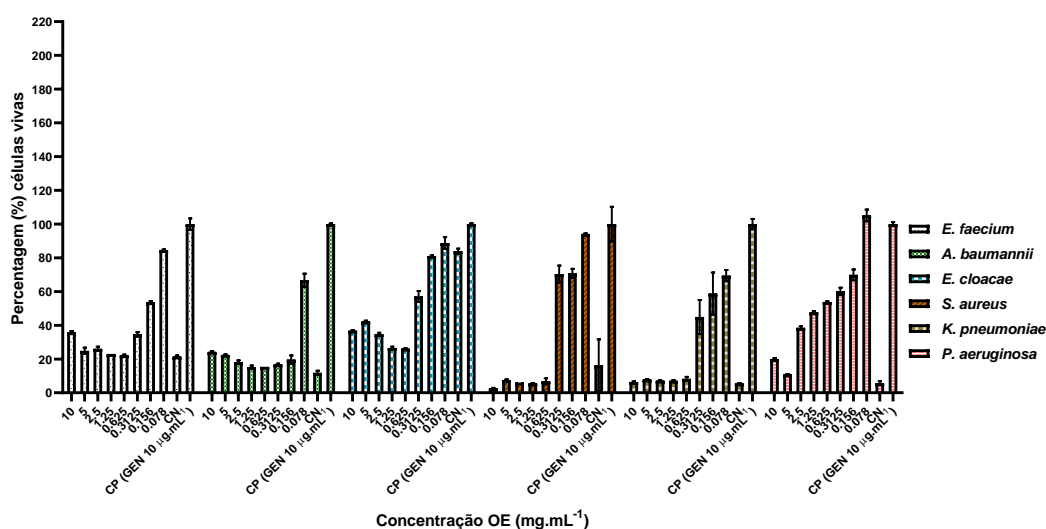


Figura 11 - Atividade antibacteriana do OE de *O. vulgare* em associação com AT de Chaves sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão

Depois de avaliada a atividade antibacteriana dos OE de *T. vulgaris* e *O. vulgare* em associação com a AT de Chaves sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão, a atividade antibiofilme destas mesmas misturas foi caracterizada, nomeadamente no que diz respeito à sua capacidade de inibição e redução do crescimento de biofilmes formados pelas espécies bacterianas em estudo. Neste caso, foi selecionada a concentração de 5 mg.mL⁻¹ de OE para realizar os ensaios, considerando que, no global, os resultados obtidos anteriormente sugerem que esta foi a concentração que levou a melhores resultados de atividade antibacteriana.

Partindo da análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo, verificou-se que aplicando a mistura de OE de *T. vulgaris* com AT de Chaves em biofilmes das bactérias em estudo ocorreu uma inibição da formação dos mesmos em mais de 99,0% para todas as espécies testadas, com exceção de *P. aeruginosa*, cuja capacidade de formação não sofreu alterações (Tabela 8, Figura 12). No que diz respeito ao OE de *O. vulgare* em combinação com a AT de Chaves, esta mistura foi capaz de inibir a formação do biofilme de *K. pneumoniae* em cerca de 46,3%, sendo que para as restantes espécies essa inibição foi sempre superior a 90,0% (Tabela 8, Figura 13). Curiosamente, o controlo positivo usado nestes ensaios, a gentamicina a 10 µg.mL⁻¹, não teve qualquer efeito sobre a formação dos biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, ao passo que o OE de *T. vulgaris* praticamente inibiu por completo a formação de biofilme de *S. aureus*, e o OE de *O. vulgare* teve este mesmo efeito sobre os biofilmes de ambas as espécies.

Tabela 8 - Inibição da formação de biofilme de bactérias do grupo *ESKAPE* pelo OE de *T. vulgaris* ou *O. vulgare* em associação com a AT de Chaves

Espécies bacterianas	OE de <i>T. vulgaris</i> + AT de Chaves (mg.mL ⁻¹)	Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)	OE de <i>O. vulgare</i> + AT de Chaves (mg.mL ⁻¹)	Gentamicina (CP) (µg.mL ⁻¹)
	5	10	5	10
% de inibição da formação de biofilme em relação ao CN				
<i>E. faecium</i>	99,4	94,9	92,8	86,8
<i>A. baumannii</i>	99,6	90,0	99,1	98,1
<i>E. cloacae</i>	99,1	80,8	99,4	99,6
<i>S. aureus</i>	99,8	0,00	99,7	0,00
<i>K. pneumoniae</i>	99,9	72,6	46,3	81,0
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	96,4	0,00

Legenda: CN – controlo negativo (controlo de crescimento); CP – controlo positivo (gentamicina)

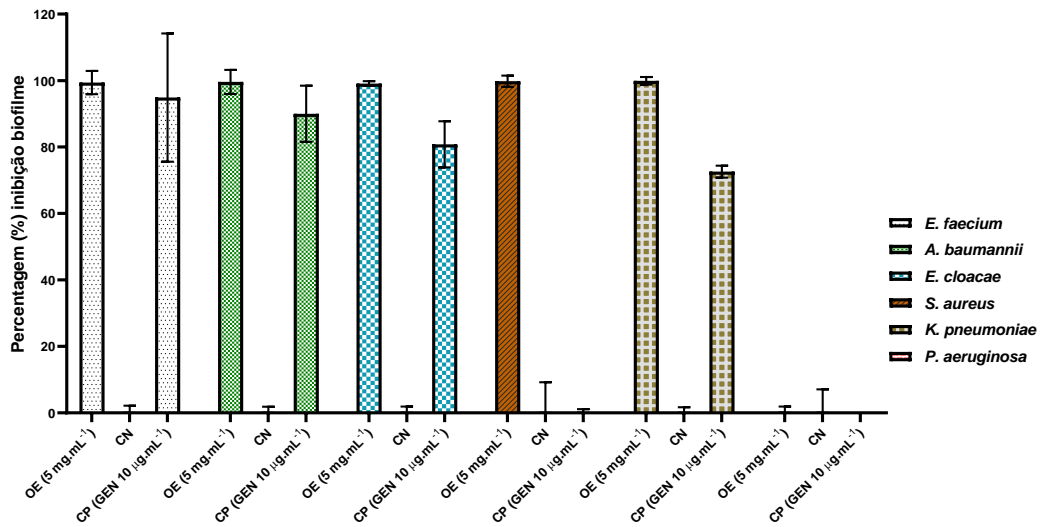


Figura 12 - Inibição da formação de biofilmes de bactérias do grupo *ESKAPE* pela ação antibiofilme do OE de *T. vulgaris* em associação com AT de Chaves. Legenda: CN – controle de crescimento; CP – controle positivo

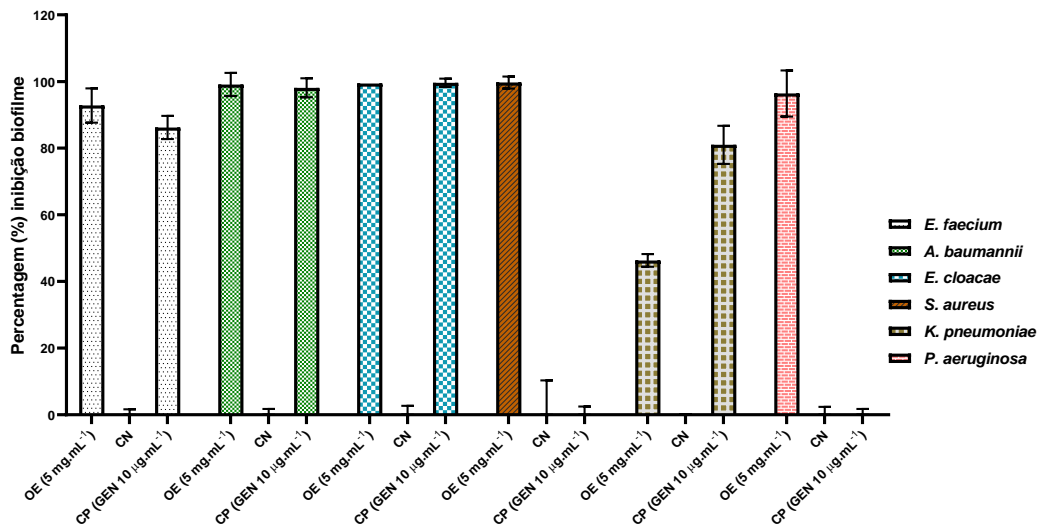


Figura 13 - Inibição da formação de biofilmes de bactérias do grupo *ESKAPE* pela ação antibiofilme do OE de *O. vulgare* em associação com AT de Chaves. Legenda: CN – controle de crescimento; CP – controle positivo

Quando analisados os resultados obtidos para a capacidade de redução de biofilme das bactérias do grupo dos OE em conjugação com AT de Chaves, observou-se que, no caso da mistura contendo OE de *T. vulgaris*, esta não teve qualquer efeito antibiofilme sobre *K. pneumoniae*, conseguindo, no entanto, reduzir os biofilmes das restantes espécies bacterianas em mais de 82,0% (Tabela 9, Figura 14). Já no que diz respeito ao

OE de *O. vulgare* combinado com a AT de Chaves, esta mistura levou à redução do biofilme de *E. faecium* em 91,9%, de *A. baumannii* em 87,5%, de *E. cloacae* em 84,2%, de *S. aureus* em 88,3%, de *K. pneumoniae* em 72,6% e de *P. aeruginosa* em 50,8% (Tabela 9, Figura 15). Na globalidade, ambos os OE tiveram melhores resultados no que diz respeito à sua atividade antibiofilme quando comparados com a gentamicina a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 9 - Redução da formação de biofilme de bactérias do grupo *ESKAPE* pelo OE de *T. vulgaris* ou *O. vulgare* em associação com a AT de Chaves

Espécies bacterianas	OE de <i>T. vulgaris</i> + AT de Chaves (mg.mL^{-1})	Gentamicina (CP) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	OE de <i>O. vulgare</i> + AT de Chaves (mg.mL^{-1})	Gentamicina (CP) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
	5	10	5	10
<i>E. faecium</i>	87,6	79,8	91,9	92,4
<i>A. baumannii</i>	85,0	47,9	87,5	60,8
<i>E. cloacae</i>	87,5	77,9	84,2	81,7
<i>S. aureus</i>	91,8	88,9	88,3	69,5
<i>K. pneumoniae</i>	0,00	1,20	72,6	42,3
<i>P. aeruginosa</i>	82,4	49,1	50,8	37,2

Legenda: CN – controle negativo (controle de crescimento); CP – controle positivo (gentamicina)

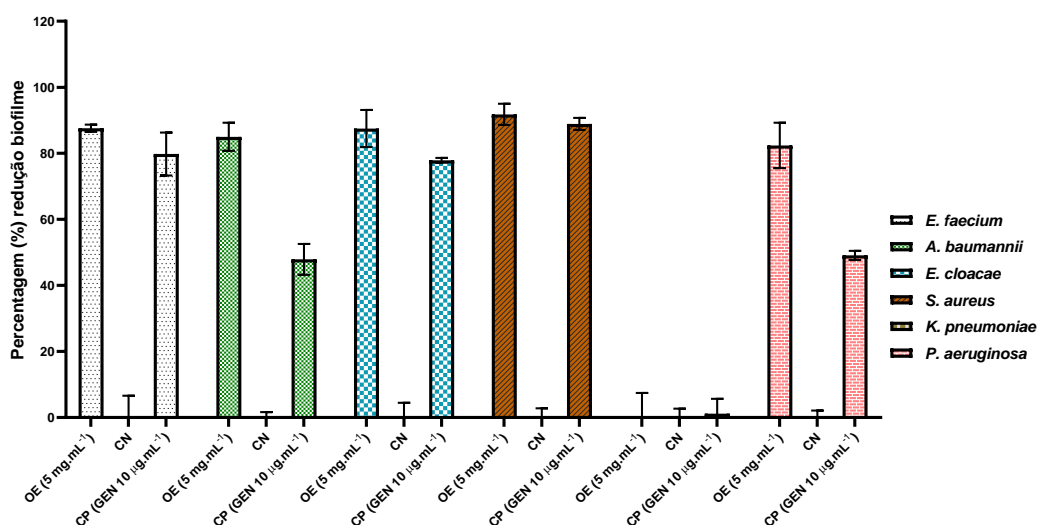


Figura 14 - Redução de biofilmes de bactérias do grupo *ESKAPE* pela ação antibiofilme do OE de *T. vulgaris* em associação com AT de Chaves. Legenda: CN – controle de crescimento; CP – controle positivo.

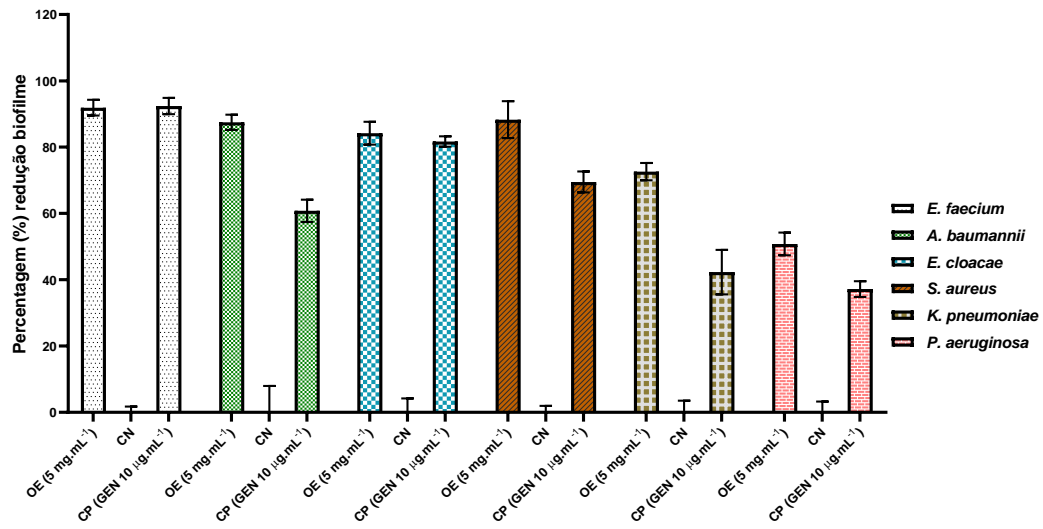


Figura 15 - Redução de biofilmes de bactérias do grupo *ESKAPE* pela ação antibiofilme do OE de *O. vulgare* em associação com AT de Chaves. Legenda: CN – controlo de crescimento; CP – controlo positivo.

5. Discussão

O presente trabalho foi conduzido de forma a avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme dos OE de *T. vulgaris* e de *O. vulgare* e da AT de Chaves, isoladamente e em associação, em bactérias multirresistentes do grupo *ESKAPE*, com o objetivo de desenvolver uma nova solução desinfetante de superfícies abióticas com um perfil ecologicamente mais favorável e sustentável, usando para isso recursos endógenos do norte de Portugal.

As IACS representam um importante problema de saúde pública e têm implicações significativas na morbidade e mortalidade dos pacientes hospitalizados (Gidey et al., 2023). A prevenção e controlo destas infeções envolvem práticas rigorosas de higiene, a utilização apropriada de dispositivos médicos e a administração criteriosa de antibióticos. Muitas vezes, as IACS são causadas por bactérias do grupo *ESKAPE* que, tal como descrito anteriormente, são um grupo de patógenos bacterianos clinicamente relevantes que têm a capacidade de escapar aos efeitos de antibióticos e outras intervenções terapêuticas, tornando-se assim um desafio significativo no campo da saúde (Weber et al., 2020).

Os OE são compostos naturais complexos extraídos de plantas com uma ampla gama de aplicações e propriedades terapêuticas. Apresentam na sua composição uma variedade de compostos químicos, incluindo terpenos, fenóis, ésteres e aldeídos, que lhes conferem propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica, calmante, entre outras (Sadgrove et al., 2021). As AT são elementos naturais complexos, constituídas por um amplo espectro de características físico-químicas, e que são amplamente reconhecidas pelas suas propriedades terapêuticas, nomeadamente propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, etc (A. Oliveira et al., 2020; Vaz et al., 2022; Viegas et al., 2019).

No presente estudo, a atividade antibacteriana dos OE de *T. vulgaris* e de *O. vulgare* e da AT de Chaves, isoladamente e em associação, foi caracterizada através da avaliação do crescimento das espécies bacterianas testadas com recurso à medição da DO₆₂₀ após a aplicação das amostras em estudo. Os resultados obtidos com a aplicação de OE de *T. vulgaris* sobre bactérias do grupo *ESKAPE* em suspensão revelam uma variação na eficácia antibacteriana em relação às diferentes espécies bacterianas e concentrações de OE. De forma geral, a concentração de OE de *T. vulgaris* mais eficaz na inibição do crescimento das bactérias estudadas foi de 10 mg.mL⁻¹, com exceção da *A. baumannii*,

para a qual a concentração de 5 mg.mL⁻¹ demonstrou ser mais eficaz. Para *E. faecium*, a aplicação de 10 mg.mL⁻¹ de OE resultou na eliminação de 100% das células bacterianas, indicando uma ação bactericida completa. Em relação a *E. cloacae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, a concentração de 10 mg.mL⁻¹ de OE apresentou níveis variados de eficácia, com sobrevivência de 34,5%, 4,51%, 6,43% e 41,2%, respectivamente, o que sugere uma ação parcialmente bacteriostática ou bactericida sobre algumas destas espécies. A concentração de 5 mg.mL⁻¹ de OE de *T. vulgaris* foi responsável pela morte de aproximadamente 98,5% das células bacterianas de *A. baumannii* em suspensão, indicando uma elevada atividade antibacteriana deste OE. Interessante salientar que, em determinadas concentrações, o OE de *T. vulgaris* potenciou o crescimento de *E. faecium* e *S. aureus*, o que pode ser devido a efeitos complexos, como a influência sobre o metabolismo bacteriano ou a uma resposta adaptativa das bactérias ao OE. Estes resultados surgem em concordância com alguma da literatura existente. Num estudo realizado por Ebani *et al.* (Ebani *et al.*, 2023), verificou-se que a concentração mínima inibitória (MIC) de OE de *T. vulgaris* sobre *P. aeruginosa* (> 10% (v.v⁻¹) foi bastante superior às obtidas para *S. aureus* e *K. pneumoniae* (0.312% e 1.25% (v.v⁻¹), respectivamente, o que revela uma maior resistência de *P. aeruginosa* a este OE. Noutro estudo (Rinaldi *et al.*, 2020), o OE de *T. vulgaris* foi aplicado sobre *A. baumannii*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, tendo sido obtidas MIC inferiores a 0,03% (v.v⁻¹), o que indica uma elevada atividade antibacteriana do OE relativamente a estas espécies bacterianas. *S. aureus*, *E. cloacae* e *P. aeruginosa* quanto a sua sensibilidade em relação ao OE de *T. vulgaris*, observando-se uma MIC de 1 µg.mL⁻¹ para as duas primeiras espécies, e de 0,5 µg.mL⁻¹ para a terceira (Soković *et al.*, 2010b), o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Relativamente aos resultados obtidos para o OE de *O. vulgare*, estes indicam que mais uma vez, a concentração de 10 mg.mL⁻¹ de OE revelou a maior atividade antibacteriana contra a maioria das espécies bacterianas estudadas. Notavelmente, a aplicação de OE a 10 mg.mL⁻¹ resultou na inibição de 100% do crescimento para *E. faecium*, *A. baumannii* e *E. cloacae*. Para *S. aureus* e *K. pneumoniae*, as concentrações de OE de 1,25 mg.mL⁻¹ e 0,3125 mg.mL⁻¹, respectivamente, mostraram os melhores resultados na eliminação de células bacterianas. No que diz respeito a *P. aeruginosa*, a concentração de 10 mg.mL⁻¹ reduziu a sobrevivência das bactérias para 8,19%, indicando uma eficácia elevada do OE. No entanto, concentrações mais baixas de OE (0,078 mg.mL⁻¹) resultaram num aumento do número de células vivas, o que mais uma vez, se pode dever a uma resposta adaptativa

das bactérias ao OE ou a alterações no metabolismo bacteriano. Os efeitos do OE de *O. vulgare* sobre *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* encontram-se em linha com resultados publicados anteriormente, nos quais se observou que a MIC obtida para *S. aureus* (0,078 (v.v⁻¹)) foi ligeiramente inferior à obtida para *K. pneumoniae* (0,156 (v.v⁻¹)) e bastante menor à obtida para *P. aeruginosa* (0,625 (v.v⁻¹), em média) (Ebani et al., 2023). Noutro estudo, foi verificado, através do método de difusão em disco, que o OE de *O. vulgare* exerceu uma boa atividade antibacteriana sobre as espécies *S. aureus* (7.5–8.66 mm) e *K. pneumoniae* (6–11 mm), demonstrando menor eficácia sobre *P. aeruginosa* ((3.33–5.66 mm) (Rathore et al., 2023). A eficácia deste OE essencial foi igualmente testada sobre *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, verificando-se MIC de 0,059% e 0,015% (v.v⁻¹), respetivamente (Vasconcelos et al., 2019), o que sugere, tal como o presente trabalho, uma maior ação antibacteriana do OE de *O. vulgare* sobre *A. baumannii* em relação a *K. pneumoniae*. Contrariamente ao descrito neste trabalho, no qual o OE em análise revelou uma maior atividade antibacteriana sobre *E. cloacae* relativamente a *S. aureus*, um estudo desenvolvido por Soković *et al* (Soković et al., 2010b) mostra uma MIC para *E. cloacae* de 0,5 µg.mL⁻¹ e para *S. aureus* de 0,25 µg.mL⁻¹, demonstrando uma maior suscetibilidade de *S. aureus* ao OE de *O. vulgare* do que *E. cloacae*. Este facto pode dever-se à variabilidade de composição química entre os dois OE de *O. vulgare* testados, nomeadamente no que diz respeito ao seu conteúdo de compostos voláteis, bastante associados à atividade antibacteriana dos OE (Khan et al., 2019).

Os resultados relativos à avaliação da atividade antibacteriana da AT de Chaves demonstraram que quando esta amostra foi aplicada sem diluição às bactérias em estudo, ocorreu uma diminuição na percentagem de células vivas para *A. baumannii* (45,3%), *K. pneumoniae* (11,4%) e *P. aeruginosa* (12,4%). No caso de *E. faecium*, a concentração de AT que resultou numa maior morte de células bacterianas foi de 3,125 mg.mL⁻¹, com uma eficácia de 60,8%, e de *S. aureus* a de 50 mg.mL⁻¹ que resultou numa redução de 53,7% das células vivas. Tal como o que foi observado para os OE, também a aplicação de AT de Chaves levou ao crescimento de algumas espécies bacterianas, nomeadamente de *E. faecium*, *A. baumannii* e *E. cloacae*. A atividade bacteriana das AT tem sido pouco investigada, no entanto, um estudo mostrou o potencial efeito antibacteriano de diferentes AT relativamente a *S. aureus*, estando aquele relacionado com a composição físico-química de cada uma das AT (A. Oliveira et al., 2020).

Para além de testados os OE e da AT de Chaves isoladamente, foram igualmente testadas as amostras de OE de *T. vulgaris* e de *O. vulgare* combinadas, individualmente,

com AT de Chaves relativamente à sua capacidade antibacteriana. No caso da mistura de OE de *T. vulgaris* com AT de Chaves, observou-se uma elevada eficácia sobre *E. faecium* e *A. baumannii*, com a concentração de 5 mg.mL⁻¹ de OE, resultando em reduções de 100% e 96%, respetivamente, na sobrevivência bacteriana, o que indica uma possível ação sinérgica entre o OE e a AT. No entanto, para as restantes espécies bacterianas em estudo a concentração de 10 mg.mL⁻¹ de OE de *T. vulgaris* foi a mais eficaz na redução da percentagem de células vivas, o que sugere que a combinação de OE de *T. vulgaris* em diferentes concentrações com AT de Chaves pode levar a diferentes resultados consoante a espécie de bactéria em questão.

No que diz respeito à mistura de OE de *O. vulgare* com AT de Chaves, esta combinação mostrou-se particularmente eficaz em *S. aureus* e *K. pneumoniae*, com concentrações de 10 mg.mL⁻¹ a resultar em reduções de cerca de 97,7% e 93,6% nas células vivas, respetivamente. Contudo, a resposta à mistura variou entre as restantes espécies. Por exemplo, para *E. faecium* e *E. cloacae* a concentração de 0,625 mg.mL⁻¹ foi a que resultou numa maior morte celular, levando a percentagens de 22,3% e 26,2% de recuperação de células vivas, respetivamente. Já para *A. baumannii* e *P. aeruginosa* as concentrações de OE que geraram melhores resultados de atividade antibacteriana foram as de 1,25 mg.mL⁻¹ e 5 mg.mL⁻¹ levando a recuperações de células vivas de cerca de 15,2% e 10,9%, respetivamente.

Os resultados obtidos enfatizam que as combinações de OE de *T. vulgaris* e *O. vulgare* com AT de Chaves potenciam, de um modo geral, os efeitos antibacterianos dos OE sobre as espécies bacterianas estudadas. No entanto, a eficácia das misturas varia dependendo da espécie bacteriana e da concentração utilizada. Desta forma, e partindo da análise dos dados obtidos, a concentração de 5 mg.mL⁻¹ de OE foi selecionada para prosseguir com os estudos, tendo conta que, de um modo geral, foi a concentração que gerou melhores resultados de atividade antimicrobiana. O método de citometria de fluxo foi escolhido pelo facto de ser um método sensível, rápido e confiável que permite quantificar células viáveis em suspensões de células procarióticas. Através da contagem de células tem a capacidade de distinguir, recorrendo ao uso de corantes fluorescentes específicos, as células vivas e as células mortas (BD, 2015b; Michelutti et al., 2020).

As misturas de OE de *T. vulgaris* e de OE de *O. vulgare* associadas à AT de Chaves foram desta forma investigadas no que diz respeito à sua capacidade de inibir a formação e reduzir o crescimento de biofilme produzido pelas bactérias do grupo *ESKAPE*. Os resultados obtidos através de citometria de fluxo revelaram que a mistura de OE de *T.*

vulgaris com AT de Chaves foi altamente eficaz na inibição da formação de biofilmes para todas as espécies bacterianas testadas (inibição superior a 99,0%), exceto para *P. aeruginosa*, cujo biofilme não sofreu alterações. No caso da mistura de OE de *O. vulgare* com AT de Chaves, houve uma inibição substancial da formação de biofilme (mais de 90%) em todas as espécies testadas, com exceção de *K. pneumoniae*, cuja inibição foi de cerca de 46,3%. No que concerne à redução do crescimento de biofilmes bacterianos, observou-se que o OE de *T. vulgaris* apresentou uma boa atividade antibiofilme, com mais de 82,0% de redução, sobre a maioria das bactérias em estudo, menos para *K. pneumoniae*, cujo biofilme cresceu de forma inalterada. Também a aplicação OE de *O. vulgaris* levou a bons resultados de redução dos biofilmes em estudo, nomeadamente no que diz respeito às bactérias *E. faecium*, *A. baumannii*, *E. cloacae* e *S. aureus*, com níveis de redução superiores a 84,0%. Os biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, por sua vez, mostraram maior resistência à ação deste OE, apresentando reduções de 72,6% e 50,8%, respetivamente. A menor suscetibilidade de algumas espécies às misturas testadas pode dever-se ao facto de as células bacterianas no estado de biofilme serem, de um modo geral, mais resistentes aos antimicrobianos que as células em suspensão (Høiby et al., 2010). Por outro lado, a eficácia dos OE sobre biofilmes bacterianos encontra-se bastante descrita na literatura. Por exemplo, num estudo realizado por Vázquez-Sánchez *et al* (Vázquez-Sánchez et al., 2015), verificou-se que o OE de *T. vulgaris* foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *S. aureus* em 4.3 log CFU.cm⁻² em biofilmes com 48 horas de crescimento. Noutro estudo, verificou-se que a aplicação do OE de *T. vulgaris* levou à diminuição em cerca de vinte vezes do número de células de *P. aeruginosa* aderidas a uma superfície aquando da formação do biofilme, e quando usado uma concentração de 0,5% (v.v⁻¹) (Al-Shuneigat et al., 2014). Os biofilmes de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. aureus* foram sujeitos ao tratamento com OE de *T. vulgaris*, verificando-se, em todos eles, uma inibição da sua formação superior a 80% (Alibi et al., 2020b). Também o OE de *O. vulgare* tem sido usado no controlo de biofilmes bacterianos. Schillaci *et al* (Schillaci et al., 2013) mostraram que este OE, a uma concentração de 200 mg.mL⁻¹, levou à redução em 53,2% do biofilme com 72 horas de crescimento de *P. aeruginosa*. Biofilmes de *S. aureus*, crescidos durante 48 horas, foram submetidos a um tratamento com OE de *O. vulgare* a 0,192 mg.mL⁻¹ que resultou numa percentagem de redução de 71% (Merghni et al., 2022). Estes estudos corroboram assim os resultados obtidos no presente, onde se demonstrou que ambas as soluções de OE de *T.*

vulgaris e de *O. vulgare* em associação com AT de Chaves podem ser usadas no desenvolvimento de um produto desinfetante de superfícies abióticas.

6. Conclusão

A procura por soluções naturais que tenham atividade biocida contra biofilmes bacterianos tornou-se um imperativo nos tempos modernos, à medida que as IACS, principalmente aquelas provocadas por bactérias do grupo *ESKAPE*, se elevam como um enorme desafio à saúde global. Diante desta ameaça emergente, os OE e a AT surgem como recursos naturais valiosos, principalmente devido à sua abundância e propriedades intrínsecas. Os OE e a AT representam assim uma alternativa sustentável e ecologicamente responsável quando comparados com os compostos químicos normalmente usados na desinfecção de superfícies abióticas hospitalares, nomeadamente o etanol, o hipoclorito de sódio, os compostos de amónio quaternário, entre outros. Ao optar por recursos naturais e endógenos, a sociedade pode adotar métodos que reduzam a pegada de carbono e tenham um impacto ambiental mínimo, alinhando-se às metas globais de sustentabilidade.

A AT, em particular a de Chaves, é um recurso que, embora menos pesquisado que os OE, revelou propriedades antibacterianas e antibiofilme consideráveis. Este facto amplia a perspetiva de aplicação deste produto, mostrando que seu potencial ainda está para ser plenamente explorado. Notavelmente, quando combinada com os OE de *T. vulgaris* e *O. vulgare*, a AT potenciou sua capacidade antibacteriana e antibiofilme, principalmente contra bactérias do grupo *ESKAPE*. Estes resultados sugerem que há uma interação produtiva entre estes produtos, abrindo portas para combinações de aplicação inovadoras. No entanto, e apesar das animadoras conclusões, é essencial aprofundar o conhecimento dos mecanismos de ação destes compostos e da sua interação conjunta. Além disso, é de suma importância avaliar meticulosamente os seus potenciais efeitos adversos e perfis toxicológicos. Antes de introduzi-los em ambientes clínicos ou em produtos comerciais, é vital que sejam rigorosamente testados. Estudos futuros podem assim direcionar os seus esforços para a introdução destas amostras na formulação efetiva de soluções desinfetantes ou até de agentes terapêuticos inovadores.

Em suma, os dados recolhidos neste estudo destacam o imenso potencial antibacteriano e antibiofilme dos OE de *T. vulgaris* e *O. vulgare*, bem como da AT de Chaves. Quer seja atuando de forma isolada ou em combinação, estes produtos naturais apresentam-se como ferramentas poderosas contra bactérias do grupo *ESKAPE*,

pavimentando o caminho para pesquisas futuras e possíveis aplicações no combate às IACS.

Referências Bibliográficas

- Alibi, S., Ben Selma, W., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., Navas, J., & Ben Mansour, H. (2020a). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, 68(2), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.01.001>
- Alibi, S., Ben Selma, W., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., Navas, J., & Ben Mansour, H. (2020b). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, 68(2), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.01.001>
- Al-Shuneigat, J., Al-Sarayreh, S., Al-Sarairah, Y., Al-Qudah, M., Al-Tarawneh, I., & Albataineh, E. (2014). Effects of wild *Thymus vulgaris* essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 13(9), 62–66. <https://doi.org/10.9790/0853-13936266>
- An, J., Lee, I., & Yi, Y. (2019). The thermal effects of water immersion on health outcomes: An integrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph16071280>
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. N. (2016). Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*, 21(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules21101321>
- Bailey, E. S., Curcic, M., Biros, J., Erdogmuş, H., Bac, N., & Sacco, A. (2021). Essential Oil Disinfectant Efficacy Against SARS-CoV-2 Microbial Surrogates. *Frontiers in Public Health*, 9(December), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.783832>
- BD. (2015a). *BD™ Cell Viability Kit*.
- BD. (2015b). *BD™ Cell Viability Kit*.
- Bhatia, P., Sharma, A., George, A. J., Anvitha, D., Kumar, P., Dwivedi, V. P., & Chandra, N. S. (2021). Antibacterial activity of medicinal plants against ESKAPE: An update. *Heliyon*, 7(2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06310>

- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7 . 3(3), 56–60.
- Chaves, T. (2023a). *Termas de Chaves - As Águas Termais*. Termas & Spa de Chaves. <https://www.termasdechaves.com/as-aguas-termais>
- Chaves, T. (2023b). *Termas de Chaves - Indicações Terapêuticas*. Termas & Spa de Chaves. <https://www.termasdechaves.com/indicacoes-terapeuticas>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, Table 1, 435–457. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch18>
- Costa, D. M., Johani, K., Melo, D. S., Lopes, L. K. O., Lopes Lima, L. K. O., Tipple, A. F. V., Hu, H., & Vickery, K. (2019). Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Letters in Applied Microbiology*, 68(4), 269–276. <https://doi.org/10.1111/lam.13127>
- Cribier, B. (2020). Thermal water and hydrotherapy... *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 147(1), 1S1-1S4. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(20\)30029-6](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(20)30029-6)
- Cristino, J., Correia, M., Carvoeiro, M. das N., Costa, C., Silva, E. G. da, & Silva, M. G. (2007). Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde. *Direção Geral da Saúde*, 1–20. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/programa-nacional-de-prevencao-e-controlo-da-infeccao-associada-aos-cuidados-de-saude-pdf.aspx>
- Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244(June), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>

- Direção Geral de Energia e Geologia. (2023). *O projeto HIDROGENOMA - O Microbismo das Águas Minerais Naturais*.
<https://hidrogenoma.dgeg.gov.pt/pagina/hidrogenoma>
- Divakar, S., Lama, M., & Asad U., K. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 76.
- Du, Q., Zhang, D., Hu, W., Li, X., Xia, Q., Wen, T., & Jia, H. (2021). Nosocomial infection of COVID-19: A new challenge for healthcare professionals (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(4), 1–10.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4864>
- Ebani, V. V., Pieracci, Y., Cagnoli, G., Bertelloni, F., Munafò, C., Nardoni, S., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2023). In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and Their Mixture against Clinical Isolates Responsible for Canine Otitis Externa. *Veterinary Sciences*, 10(1), 1–12.
<https://doi.org/10.3390/vetsci10010030>
- Ekiert, H. M., & Szopa, A. (2022). Biological Activities of Natural Products. *Molecules*, 27(5). <https://doi.org/10.3390/molecules27051519>
- Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Štefániková, J., Ďúranová, H., Kowalczewski, P. Ł., Čmíková, N., & Kačániová, M. (2021). *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants*, 10(9), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/plants10091959>
- Garcia, J., Rodrigues, F., Castro, F., Aires, A., Marques, G., & Saavedra, M. J. (2022). Antimicrobial, Antibiofilm, and Antioxidant Properties of *Boletus edulis* and *Neoboletus luridiformis* Against Multidrug-Resistant ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Nutrition*, 8(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.773346>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 1–28.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Gidey, K., Gidey, M. T., Hailu, B. Y., Gebreamlak, Z. B., & Niriayo, Y. L. (2023). Clinical and economic burden of healthcare-associated infections: A prospective

- cohort study. *PLoS ONE*, 18(2 February), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282141>
- Gonçalves, L. (2016). *Caracterização e Exploração do sistema hidromineral sulfúreo das Caldas de Carlão*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Gorrie, C., Higgs, C., Carter, G., Stinear, T. P., & Howden, B. (2019). Genomics of vancomycin-resistant enterococcus faecium. *Microbial Genomics*, 5(7), 1–8.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000283>
- Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 16(2), 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111–129. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>
- Hayward, R., Harding, J., Molloy, R., Land, L., Longcroft-Neal, K., Moore, D., & Ross, J. D. C. (2018). Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(2), 223–238.
<https://doi.org/10.1111/bcp.13439>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Khan, M., T. Khan, S., Khan, M., Mousa, A. A., Mahmood, A., & Alkathlan, H. Z. (2019). Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express*, 9(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0893-3>
- Khan, M., Tang, H., Lyles, J., Pineau, R., Mashwani, Z. ur R., & Quave, C. L. (2018). Antibacterial properties of medicinal plants from Pakistan against multidrug-resistant ESKAPE pathogens. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00815>
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and Thyme Essential Oil - New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, 25, 4125–4142.

- Kumar, C. G., Himabindu, M., & Jetty, A. (2008). Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: A critical appraisal. *informa healthcare*, 28(3), 173–212. <https://doi.org/10.1080/07388550802262197>
- Lagha, R., Abdallah, F. Ben, AL-Sarhan, B. O., & Al-Sodany, Y. (2019). Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules*, 24(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
- Lombrea, A., Antal, D., Ardelean, F., Avram, S., Pavel, I. Z., Vlaia, L., Mut, A. M., Diaconeasa, Z., Dehelean, C. A., Soica, C., & Danciu, C. (2020). A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *origanum vulgare* l. Essential oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms21249653>
- Luo, K., Tang, J., Qu, Y., Yang, X., Zhang, L., Chen, Z., Kuang, L., Su, M., & Mu, D. (2020). Nosocomial infection by *Klebsiella pneumoniae* among neonates: a molecular epidemiological study. *Journal of Hospital Infection*, 108, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.11.028>
- Ma, Y., Liu, P., Ye, K., He, Y., Chen, S., Yuan, A., Chen, F., & Yang, W. (2022). Preparation, Characterization, In Vitro Release, and Antibacterial Activity of *Oregano* Essential Oil Chitosan Nanoparticles. *Foods*, 11(23), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods11233756>
- Ma, Y., Wang, C., Li, Y., Li, J., Wan, Q., Chen, J., Tay, F. R., & Niu, L. (2020). Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Advanced Science*, 7(1), 1–43. <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance : The Most Critical Pathogens. *pathogens*, 1–14.
- Merghni, A., Haddaji, N., Bouali, N., Alabbosh, K. F., Adnan, M., Snoussi, M., & Noumi, E. (2022). Comparative Study of Antibacterial, Antibiofilm, Antiswarming and Antiquorum Sensing Activities of *Origanum vulgare* Essential Oil and Terpinene-4-ol against Pathogenic Bacteria. *Life*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/life12101616>
- Michelutti, L., Bulfoni, M., & Nencioni, E. (2020). A novel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry. *Journal of*

- Microbiological Methods*, 170(November 2019), 105834.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105834>
- Decreto-Lei n.º 90/90 de 16 de Março, Diário da República n.º 63/1990, Série I de 1990-03-16. 14 (1990). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/90-1990-333160>
- Mukhopadhyay, S., Bharath Prasad, A. S., Mehta, C. H., & Nayak, U. Y. (2020). Antimicrobial peptide polymers: no escape to ESKAPE pathogens—a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(9), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02907-1>
- Nguyen, C. (2020). Thermal water: Minerality and other components. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 147(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(20\)30031-4](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(20)30031-4)
- Oliveira, A., Vaz, C., Silva, A., Ferreira, S., Correia, S., Ferreira, R., Breitenfeld, L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, R., Pereira, C., Cruz, M., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2020). Chemical signature and antimicrobial activity of Central Portuguese Natural Mineral Waters against selected skin pathogens. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(7), 2039–2057. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00473-6>
- Oliveira, D., Forde, B., Kidd, T., Harris, P., Beatson, S., Paterson, D., & Walker, M. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 1–49.
- Oliveira, L., Teixeira, F., Carvalho, J., Monteiro, C., Cantista, P., Silva, A., Coutinho, C., Silva, M., & Barbosa, J. (2009). Manual de Boas Práticas dos Estabelecimentos Termais. Em *Associação das Termas de Portugal* (Vol. 1, Número 1). <http://portaleducacao.guarulhos.sp.gov.br/portal/php/gerarArquivo.php?txtID=485>
- Patil, A., Banerji, R., Kanojiya, P., Koratkar, S., & Saroj, S. (2021). Bacteriophages for ESKAPE: role in pathogenicity and measures of control. *Taylor & Francis Group*, 19(7), 845–865. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1858800>
- Pazyar, N., Yaghoobi, R., Bagherani, N., & Kazerouni, A. (2013). A review of applications of tea tree oil in dermatology. *International Journal of Dermatology*, 52(7), 784–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05654.x>

- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *11*(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Rao, T., Tan, Z., Peng, J., Guo, Y., Chen, Y., Zhou, H., & Ouyang, D. (2019). The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacological Research*, *146*(87), 104283. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104283>
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Rathore, S., Mukhia, S., Kumar, R., & Kumar, R. (2023). Essential oil composition and antimicrobial potential of aromatic plants grown in the mid-hill conditions of the Western Himalayas. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31875-3>
- Raza, A., Zehra, M., Ramzan, M., Siddiqui, A. J., Akbar, A., Ahmed, A., & Musharraf, S. G. (2023). Untargeted metabolomics analysis of gentamicin-induced tolerant colonies of *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *185*(March), 106436. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106436>
- Rinaldi, F., Oliva, A., Sabatino, M., Imbriano, A., Hanieh, P. N., Garzoli, S., Mastroianni, C. M., De Angelis, M., Miele, M. C., Arnaut, M., Di Timoteo, F., Marianecchi, C., Ragno, R., & Carafa, M. (2020). Antimicrobial essential oil formulation: Chitosan coated nanoemulsions for nose to brain delivery. *Pharmaceutics*, *12*(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070678>
- Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F., Leuner, O., Melnikovova, I., & Fernandez-Cusimamani, E. (2021). Pharmacology of Natural Volatiles and Essential Oils in Food, Therapy, and Disease Prophylaxis. *Frontiers in Pharmacology*, *12*(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.740302>
- Sahoo, A., Swain, S. S., Behera, A., Sahoo, G., Mahapatra, P. K., & Panda, S. K. (2021). Antimicrobial Peptides Derived From Insects Offer a Novel Therapeutic Option to Combat Biofilm: A Review. *Frontiers in Microbiology*, *12*(June), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661195>

- Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016a). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016b). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Santos, A. L., Santos, D. O., De Freitas, C. C., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). Staphylococcus aureus: Visiting a strain of clinical importance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6), 413–423. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>
- Schillaci, D., Napoli, E. M., Cusimano, M. G., Vitale, M., & Ruberto, G. (2013). Origanum vulgare subsp. hirtum essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of Food Protection*, 76(10), 1747–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-001>
- Silva, A. (2021). *Estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme da água termal e da Matricaria recutita microrganismos orais.*
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010a). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010b). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.

Journal of Microbiological Methods, 40(2), 175–179.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)

- Tiwari, V., Roy, R., & Tiwari, M. (2015). Antimicrobial active herbal compounds against *Acinetobacter baumannii* and other pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00618>
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0032-2018>
- Unglaube, F., Lammers, A., Kreyenschulte, C. R., Lalk, M., & Mejía, E. (2021). Preparation, Characterization and Antimicrobial Properties of Nanosized Silver-Containing Carbon/Silica Composites from Rice Husk Waste. *ChemistryOpen*, 10(12), 1244–1250. <https://doi.org/10.1002/open.202100239>
- Vasconcelos, N. G., Croda, J., Silva, K. E., Motta, M. L. L., Maciel, W. G., Limiere, L. C., & Simionatto, S. (2019). *Origanum vulgare* L. Essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, 1–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0502-2018>
- Vaz, C., Oliveira, A., Silva, A., Cortes, L., Correia, S., Ferreira, R., Breitenfeld, L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, R., Pereira, C., Cruz, M., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2022). Protective role of Portuguese natural mineral waters on skin aging: in vitro evaluation of anti-senescence and anti-oxidant properties. *International Journal of Biometeorology*, 66(10), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02345-8>
- Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L., & Rodríguez-Herrera, J. J. (2015). Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Science and Technology International*, 21(8), 559–570. <https://doi.org/10.1177/1082013214553996>
- Viegas, J., Esteves, A. F., Cardoso, E. M., Arosa, F. A., Vitale, M., & Taborda-Barata, L. (2019). Biological effects of thermal water-associated hydrogen sulfide on human airways and associated immune cells: Implications for respiratory diseases. *Frontiers in Public Health*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00128>

- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella Pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Weber, K. L., Lesassier, D. S., Kappell, A. D., Schulte, K. Q., Westfall, N., Albright, N. C., Godbold, G. D., Palsikar, V., Acevedo, C. A., Ternus, K. L., & Hewitt, F. C. (2020). Simulating transmission of ESKAPE pathogens plus *C. difficile* in relevant clinical scenarios. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05121-4>
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents - myth or real alternative? *Molecules*, 24(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>