

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL CAMPUS
REALEZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E
PRODUÇÃO ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL**

ADRIANO FAVERO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE ÓLEO ESSENCIAL DE
Melaleuca alternifolia EM ASSOCIAÇÃO
SINÉRGICA COM CIPROFLOXACINO**

REALEZA- PR ABRIL/2023

ADRIANO FAVERO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Melaleuca alternifolia* E ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA
CIPROFLOXACINO

Dissertação
apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM
SAÚDE, BEM-ESTAR
E PRODUÇÃO
ANIMAL
SUSTENTÁVEL NA
FRONTEIRA SUL,
nível Mestrado, da
UFFS- Universidade
Federal da Fronteira
Sul- Para
ná, como requisito
para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa
Freitas

REALEZA- PR ABRIL/2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Faveor, Adriano
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* E ASSOCIAÇÃO
SINÉRGICA CIPROFLOXACINO / Adriano Faveor. -- 2023.
77 f.

Orientador: Doutor Fagner Luiz da Costa Freitas

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde,
Bem-Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira
Sul, Realeza, PR, 2023.

1. Microbiologia, Biotecnologia, Saúde,
Antimicrobianos. I. Freitas, Fagner Luiz da Costa,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

ADRIANO FAVERO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* E ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA CIPROFLOXACINO

Dissertação apresentada ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL, nível Mestrado, da UFFS- Universidade Federal da Fronteira Sul- Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 17/04/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

Orientador- UFFS

Documento assinado digitalmente
gov.br PATRICIA ROMAGNOLLI
Data: 12/06/2023 11:53:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof.^a Dr.^a Patricia Romagnolli – UFFS
Avaliador**



**Prof. Dr. Alexandre Carvalho de Moura – UFFS
Avaliador**

Dedico este trabalho a minha mãe que nos deixou durante essa jornada, sua lembrança sempre será o farol iluminando o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade, a chance e a força para continuar lutando.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais, Marino e Nica, por todo o amor, apoio, dedicação e carinho que sempre despenderam comigo. O seu incessante incentivo a meu crescimento pessoal, profissional e acadêmico. Em especial a minha mãe que nos deixou a pouco tempo, apesar desse período difícil que passamos com sua saúde debilitada nunca deixou de acreditar e agradecer. Espero honrar todo crédito que ela sempre me deu. Te amarei amarei eternamente mãe.

A minha esposa, Betania, que sempre apoiou minhas loucuras e incentivou o meu desenvolvimento acadêmico, mesmo que isso muitas vezes tenha custado o pouco tempo que passamos juntos. Aos meus filhotes de quatro patas Thor, Pilsen e Dudu que me animavam nos momentos de stress e tristeza

Aos meus muitos amigos, que tornaram todo esse árduo caminho mais tolerável e estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos meu orientador, Fagner Luiz, que me ajudou da melhor forma possível, acreditou no trabalho que desenvolvemos e foi bastante compreensivo com o período familiar difícil que atravessei.

A UFFS que proveu insumos e laboratórios para desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao programa e seus professores pelo aprendizado.

RESUMO

A descoberta e disponibilização de novos antimicrobianos vem diminuindo muito ao longo dos anos, somado a resistência aos antibióticos de uso clínico que é reconhecida pela OMS como a maior ameaça no tratamento de infecções. Devido a isso, tem se feito necessário buscar novas estratégias para sanar esses problemas de saúde pública. As plantas possuem metabólitos secundários que são o maior alvo da ciência nesse quesito por agirem como sistema de defesa da planta podendo ser extraídos na forma de óleos essenciais e muitas vezes possuidores de capacidade antimicrobiana. Juntamente com a descoberta de novos compostos com capacidade antimicrobiana, buscam-se novas táticas de tratamento das infecções e o uso combinado de antimicrobianos de uso clínico conjuntamente a fitoterápicos em busca de um efeito sinérgico tem se mostrado muito promissor. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) e pesquisar a possibilidade de o mesmo ter um efeito sinérgico com o ciprofloxacino em cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922, NP 0022, LB 25922 e uma cepa de Isolado Clínico) e de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, NP 0038, NP 0023 e B4). A avaliação do potencial antibiótico foi realizada pelo teste de disco-difusão que demonstrou que as cepas testadas são sensíveis ao TTO e ao ciprofloxacino (CIP). As cepas foram submetidas ao teste de CIM, pelo teste de diluição em microplacas que tem como propósito conhecer a concentração/porcentagem necessária para inibir o crescimento, as concentrações inibitórias mínimas encontradas ficaram entre 0,10-0,50% (937-4500 µg/mL) para o TTO e 0,001-0,012% (10-120 µg/mL) para o CIP. Após conhecidas as concentrações inibitórias, foi realizado o ensaio de checkerboard que associa os dois compostos em concentrações subinibitórias. O teste demonstrou um forte efeito sinérgico entre todas as associações avaliadas, após realizar os cálculos do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), verificou-se que poder-se-ia diminuir entre 3,3 a 40 vezes a concentração do TTO e 2,3 e 8,3 vezes a concentração do CIP para surtir o mesmo efeito antibacteriano. Estudos complementares tanto in vitro quanto in vivo devem ser realizados a fim de elucidar os mecanismos de ação dos compostos utilizados nessa pesquisa.

Palavras-Chave: Sinergismo; Antibacteriano; Checkerboard; Tea Tree; Resistência.

ABSTRACT

The discovery and availability of new antimicrobials has been decreasing a lot over the years, in addition to resistance to antibiotics for clinical use, which is recognized by the WHO as the greatest threat in the treatment of infections. Because of this, it has become necessary to seek new strategies to remedy these public health problems. Plants have secondary metabolites that are the biggest target of science in this regard because they act as the plant's defense system and can be extracted in the form of essential oils and often possess antimicrobial capacity. Along with the discovery of new compounds with antimicrobial capacity, new tactics for the treatment of infections are sought and the combined use of antimicrobials for clinical use together with herbal medicines in search of a synergistic effect has shown to be very promising. The objective of this work was to evaluate the antibacterial activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (TTO) and to investigate the possibility of it's having a synergistic effect with ciprofloxacin on bacterial strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922, NP 0022, LB 25922 and a strain of Clinical Isolate) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, NP 0038, NP 0023 and B4). The evaluation of the antibiotic potential was performed by the disc-diffusion test, which demonstrated that the strains tested are sensitive to TTO and ciprofloxacin (CIP). The strains were submitted to the MIC test, through the dilution test in microplates, which has the purpose of knowing the concentration/percentage necessary to inhibit growth, the minimum inhibitory concentrations found were between 0.10-0.50% (937-4500 µg /mL) for TTO and 0.001- 0.012% (10-120 µg/mL) for CIP. After the inhibitory concentrations were known, the checkerboard assay was performed, which associates the two compounds at subinhibitory concentrations. The test showed a strong synergistic effect between all the evaluated associations, after performing the calculations of the fractional inhibitory concentration index (IFIC), it was verified that between 3,3 and 40 times the TTO concentration and 2,3 and 8,3 times the concentration of CIP to have the same antibacterial effect. Complementary studies both in vitro and in vivo must be carried out in order to elucidate the mechanisms of action of the compounds used in this research.

Keywords: Synergism; Anti-bacterial; Checkerboard; Tea Tree; Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos de resistência a antibióticos e locais-alvo de produtos naturais.....	26
Figura 2- Desenho esquemático do ensaio de checkerboard.....	46
Figura 3- Teste de Disco-Difusão	50
Figura 4 Ensaio de CIM em microplaca de 96 poços	52
Figura 5- Ensaio de Checkerboard	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de IFIC correspondentes a diferentes interações	47
Tabela 2- Composição Química do TTO	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Resultado dos halos de Inibição do teste de Disco-Difusão do TTO..	49
Quadro 2- Resultado dos halos de Inibição do teste de Disco-Difusão do CIP...	51
Quadro 3- CIM do TTO (em concentração e porcentagem).....	53
Quadro 4- CIM do CIP (em concentração e porcentagem).....	54
Quadro 5- Resultado do Ensaio de Checkerboard.....	58
Quadro 6- Resultados CIF/ICIF.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATB- Antibiótico

ATCC- American Type
Culture Collection ATP-
Adenosina Trifosfato

BHI- Brain Heart Infusion

CBM/ MBC- Concentração Bactericida Mínima/ Minimum Bactericidal
Concentration CIM/ MIC- Concentração Inibitória Mínima/ Minimum
Inhibitory Concentration

CLSI- Clinical Laboratory
Standarts Institute CIF-

Concentração Inibitória

Fracionada CIP-

Ciprofloxacino

CMH- Caldo

Mueller-Hinton

DNA- Ácido

Desoxirribonuclei

co Eq- Equação

ICIF/ FICI- Índice de Concentração Inibitória Fracionada/
Fractional Inhibitory Concentration Index

ISO- Organização Internacional de Padronização/ International
Organization for Standardization

MDR- Multirresistente a drogas

/Multidrug-resistant MRSA-

Staphylococcus aureus resistente a
metecilina OMS/ WHO- Organização

Mundial da Saúde

OE- Óleo Essencial

TTO- Tea Tree Oil/ Óleo

Essencial de Melaleuca UFC-

Unidade Formadora de Colonia

UFFS- Universidade Federal da Fronteira Sul

VRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

VISA- *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a metecilina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Fitoterapia	13
1.2. Óleos Essenciais	14
1.3. Infecções	17
1.3.1. Microrganismos de Interesse	17
1.3.2. Antimicrobianos e Resistência Microbiana	20
1.3.3. Mecanismos de Resistência	22
1.4. Atividade Antimicrobiana	27
1.4.1. Pesquisas com Atividade Antimicrobiana	28
1.5. <i>Melaleuca alternifolia</i> (Tea Tree)	31
1.5.1. Química do TTO	33
1.5.2. Potencial Antimicrobiano do TTO	35
1.6. Busca por Novos Fármacos e Terapias Combinadas	37
2. OBJETIVO GERAL	40
2.1. Objetivos Específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Ensaio Antimicrobianos	41
3.1.1. Culturas e Microrganismos	41
3.1.2. Obtenção do TTO e Densidade Relativa a 20°C	41
3.1.3. Padronização do Inoculo	42
3.1.4. Determinação da Susceptibilidade a Antimicrobianos (Disco-Difusão)	43
3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	44
3.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	44
3.2.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM)	45
3.3. Checkerboard	45
3.4. Concentração Inibitória Fracionada (CIF)/ Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Análise Química e Densidade Relativa do TTO a 20°C	48
4.2. Disco-Difusão	49
4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
4.4. Concentração Bactericida Mínima (CBM)	54
4.5. Ensaio de Checkerboard	55
4.6. Concentração Inibitória Fracionada (CIF)/ Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)	59
5. CONCLUSÃO	61
6. REFERENCIAS	62

1- INTRODUÇÃO

1.1- Fitoterapia

A medicina popular tem utilizado da fitofarmacologia empiricamente desde os tempos mais remotos para tratar e curar doenças. Filtrados, macerados, infusões, sucos e extratos de plantas são utilizadas desde a antiguidade, mas somente nas últimas décadas as propriedades medicinais dessas plantas estão sendo provadas cientificamente (COUTINHO et al., 2008).

Uma grande parcela de pessoas no mundo utiliza das propriedades terapêuticas oriundas das plantas medicinais como único recurso terapêutico (JAMSHIDI-KIA et al., 2018). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, aproximadamente, 60% da população mundial depende da fitoterapia para tratar enfermidades e esse número passa dos 80% quando falamos de países pobres e/ou em desenvolvimento (KHAN & AHMAD, 2019).

Os vegetais têm um considerável arsenal de moléculas bioativas como terpenos, alcaloides, glicosídeos, cianogênios, fenóis e proteínas que fornecem uma diversidade química que gera diferentes efeitos na defesa e resistência de plantas a agentes bióticos e abióticos (KLIEBENSTEIN, 2012). Devido a isso, o interesse tem ganhado força considerando que estes metabolitos tem potencial para gerar compostos biologicamente ativos ou servir de molde para síntese de novos fármacos (GIBBONS, 2005).

Atualmente, aproximadamente, 11% dos medicamentos de uso rotineiro tem insumos provenientes de plantas, além de diversos outros fármacos que tiveram seu desenvolvimento a partir de fontes naturais (TOMIOKA et al., 2019).

O Brasil possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta que representa, aproximadamente, um terço da diversidade genética da flora do mundo. Estima-se que 15 a 17% desse promissor

potencial farmacológico foi estudado por pesquisadores (YUNES et al., 2001; PINTO et al., 2002). Devido a isso, a ciência tem buscado evidências clínicas e laboratoriais da eficácia das plantas medicinais usadas tradicionalmente na medicina (PINTO et al., 2002).

O maior alvo de interesse da ciência são os metabólitos secundários que, com sua ampla e variável composição química, são produzidos como defesa das plantas contra herbívoros, insetos e microrganismos patogênicos (RESCHEKE et al., 2007). Além dos metabólitos secundários, diversas proteínas de defesa vegetal têm sido relatadas por apresentarem atividades biológicas com potencial aplicação na saúde e agricultura, sendo, alvo de grande interesse em biotecnologia (UCHÔA et al., 2009). Dentre essas proteínas, os inibidores de proteases recebem especial atenção, pois são moléculas ativas contra fitopatógenos e patógenos de importância médica e veterinária (UCHÔA et al., 2009).

A padronização e avaliação da aplicação de compostos ativos derivados de plantas está ajudando no surgimento de uma nova era do sistema de saúde para tratar doenças humanas. A retomada do conhecimento tradicional e das plantas medicinais pode desempenhar um papel fundamental na exploração e descoberta de recursos naturais das plantas. (JAMSHIDI-KIA et al., 2018). As características antimicrobianas de substâncias originadas de plantas têm sido confirmadas por meio de várias pesquisas em todo o mundo que avaliam suas propriedades químico-farmacológicas (LIRA et al., 2020).

1.2- Óleos Essenciais (OEs)

Visando mitigar dois grandes problemas de saúde pública que são a escassez de novos compostos antimicrobianos e a resistência aos antimicrobianos utilizados na clínica médica e veterinária, diversas pesquisas tem buscado substâncias mais eficazes e menos tóxicas. Uma alternativa são os óleos essenciais (OEs) extraídos de diversas plantas por meio de

diferentes técnicas podendo encontrar (CARDOSO, 2022).

Os OEs são compostos químicos aromáticos voláteis encontrados no metabolismo secundário das plantas, sendo extraídos de semente, frutos, flores, folhas, brotos, cascas e raízes (JU et al., 2019). Devido à grande quantidade e diversidade de seus princípios ativos eles podem desempenhar um importante papel para a saúde humana e animal (POPOVIC et al., 2016), possuindo uma mistura complexa de diferentes compostos moleculares (JU et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

Dentre os variados compostos dos OEs estão os pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, eles são hidrofóbicos e o seu sítio de ação é a membrana celular da célula microbiana. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica causando desarranjo na função e na estrutura da membrana e penetram a célula bacteriana, exercendo atividade inibitória no citoplasma celular, provocando lise e liberação do ATP intracelular, sendo assim, responsáveis pela ação antimicrobiana (WALSH et al., 2013). Dentre as diversas atividades biológicas que os óleos essenciais podem possuir, como antiviral, inseticida, anti-inflamatória e muitas outras, destaca-se a antimicrobiana (GUSTAFSONE et al., 1998).

Outro grupo muito importante é o dos terpenos que são produtos de metabólitos secundários de origem natural que encontrados em uma diversidade de plantas e são os principais componentes dos OEs, desempenham diversas funções, entre elas mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos (VIEIRA, 2018). Além disso, desempenha uma variedade de ações biológicas como: anticonvulsivante, anti-inflamatória, sedativa, antinociceptiva e antimicrobiana (ALVIANO et al., 2005).

Nos ensaios com substâncias de origem vegetal, principalmente, em se tratando de óleos essenciais, as propriedades físicas são muito importantes. A viscosidade, solubilidade em água, volatilidade e complexidade devem ser consideradas. Para melhorar a confiabilidade e a qualidade dos testes, o mais correto é utilização de solventes, agentes emulsificadores ou detergentes para contribuir com a dispersão dos

mesmos. Porém, os mesmos devem ser previamente testados para evitar que possuam algum tipo de interação com o a substância testada ou o mesmo possuir atividade antimicrobiana (NASCIMENTO, 2007). Para obtenção de resultados confiáveis, todos os testes devem possuir controles positivos e negativos (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003; NASCIMENTO, 2007).

Diversos fatores podem influenciar diretamente a atividade antimicrobiana dos OEs. A temperatura, por exemplo, tem efeito a ser considerado na atividade antimicrobiana dos OEs, pois os microrganismos têm diferentes temperaturas ótimas de crescimento, fazendo com que alterações grandes acima ou abaixo podem reduzir a atividade do microrganismo (MOLEYAR & NARASIMHAM, 1992).

Normalmente, a sensibilidade de bactérias aos OEs aumenta com a diminuição do pH. A combinação entre diminuição de pH e utilização de OEs parece interagir sinergicamente aumentando a capacidade inibitória nas bactérias. Isso se dá devido ao fato que em pHs mais baixos, os OEs não se decompõem tão facilmente e tem seus efeitos hidrofóbicos aumentados, facilitando sua interação com as membranas bacterianas (RIVAS et al., 2010).

A quantidade de O₂ também tem um efeito sobre a atividade antimicrobiana dos OEs, pois causa uma série de reações químicas com os componentes ativos dos OEs. Como exemplos: o timol, em condições aeróbicas, tem atividade antimicrobiana aumentada; óleo essencial de melaleuca tem sua atividade antimicrobiana aumentada em anaerobiose (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Geralmente, quanto maior o tempo de exposição aos OEs maior a atividade antimicrobiana. Porém, muitas vezes pode haver uma atividade máxima, ou seja, um ponto que a atividade não aumenta mais ao longo do tempo, assim como em todos os compostos com propriedades antimicrobianas. Os OEs podem ser divididos em 2 tipos conforme sua ação em relação ao tempo: ação lenta e ação rápida. Alguns metabólitos

como cinamaldeído, geraniol e carvanol são considerados de ação rápida pois podem inativar *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* sp. em apenas 5 minutos enquanto os compostos de ação lenta geralmente levam de 30 a 60 minutos para começar a demonstrar atividade antimicrobiana (FRIEDMAN et al.; 2004, JU et al., 2022).

1.3- Infecções

1.3.1-Microrganismos de Interesse

Dentre as zoonoses de interesse crescente, tanto para a saúde humana, quanto para a animal, destacam-se as contaminações por *Escherichia coli*. Este agente pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bastonete curto, com metabolismo anaeróbico facultativo, Gram-negativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, a maioria é móvel, devido a existência de flagelos peritríqueos. A temperatura ótima de crescimento é por volta dos 37 °C e é responsável por significativa incidência de processos mórbidos em seres humanos e animais (BARNES et al. 2003; SAVIOLLI, 2010).

A *E. coli* faz parte do grupo de coliformes fecais, sendo considerada o mais característico indicador de contaminação fecal e eventual presença de bactérias patogênicas (OLIVEIRA et al., 2004). Vários fatores contribuem para sua disseminação no meio ambiente pois é excretada nas fezes, podendo sobreviver nas partículas fecais, água e poeira até por meses (SAVIOLLI, 2010) . O ambiente normal da *A. E. coli* é o trato intestinal, sendo um dos principais constituintes do mesmo em homens e animais. Presume-se que a maioria dos seus sorotipos seja isento de fatores de virulência, mas algumas cepas, durante o processo evolutivo, adquiriram genes que lhe conferem capacidade de ocasionar doenças, ocasionando essa grande variabilidade patogênica (CHERNAKI-LEFFER et

al., 2002).

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos importantes na etiologia de infecções hospitalares; são isoladas a partir do intestino grosso humano, quando assim, geralmente são inofensivas à nossa saúde (RODRÍGUEZ- MARTÍNEZ et al., 2011). Quando migram para outras regiões do corpo podem causar problemas, como por exemplo quando no trato urinário inferior são responsáveis por entre 70% a 85% das infecções comunitárias ou hospitalares detectadas, independente de região ou características físicas (PIRES et al., 2007). Podem ser agrupadas de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, em patótipos que estão frequentemente associados à doença e lesões em homens e animais (BARNES et al., 2003).

A multirresistência em *Escherichia coli* tornou-se uma questão preocupante para a saúde pública por ser cada vez mais observada em humanos e animais. Normalmente, a *E. coli* é intrinsecamente suscetível a quase todos os agentes antimicrobianos usados na clínica humana e veterinária, mas esta espécie bacteriana tem uma grande capacidade de acumular genes de resistência, principalmente por meio de transferência horizontal de genes. Uma das principais preocupações é a transmissão de *E. coli* virulenta e/ou resistente entre animais e humanos por variadas vias como contato direto, contato com excreções ou através da cadeia alimentar humana quanto na veterinária (POIREL et al., 2018). Os principais antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por *Escherichia coli* são gentamicina, cefalosporina, ciprofloxacino, cefalotina, nitrofurantoína.

Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos imóveis, pertencentes à família *Micrococaceae*, não formadores de esporos, podem se apresentarem isolados, aos pares, tétrades, em cadeias curtas, mas, majoritariamente apresentam-se agrupados em cachos irregulares. São aeróbios e anaeróbios facultativos, com maior crescimento sob condições aeróbicas, quando então produzem a catalase. Estes micro-

organismos podem se desenvolver entre 15 e 45 °C. Crescem em meio simples sem inibidores (KONEMAN et al., 2008).

O *Staphylococcus aureus* possuem um destaque pelo envolvimento na etiologia de uma ampla diversidade de manifestações clínicas. Cerca de 50% a 87% das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm como agente responsável *Staphylococcus aureus*, sendo que em 16% a 43% dos casos os pacientes evoluem para o óbito em função do amplo espectro de resistência deste micro-organismo (METAN, et al., 2005).

Este micro-organismo é um dos patógenos mais isolados tanto comunitariamente quanto em infecções hospitalares e representa um grande problema para os sistemas de saúde pública devido à facilidade de adquirir resistência aos antimicrobianos utilizados na clínica médica. É responsável por uma grande variedade de infecções, atingindo desde tecidos superficiais até os mais profundos onde penetram através do rompimento das barreiras naturais, sendo assim associados a infecções de pele, tecidos moles e infecções urinárias, a infecções graves como pneumonia, osteomielite, síndrome do choque tóxico e sepse que podem ser fatais. Com isso, destaca-se por sua patogenicidade e alta frequência, causando doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em sadios. O tratamento atualmente é feito com meticilina/oxacilina, porém há um grande desafio devido à emergência de cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina*) expressando multirresistência.(OTTO, 2010; ADHIKARI et al., 2012).

As MRSA tipicamente tinham circulação limitada e em ambientes hospitalares, mas nos últimos anos as infecções causadas por MRSA associadas ou adquiridas na comunidade (CA-MRSA) têm sido relatadas com preocupante regularidade em todo o mundo. As formas de infecções hospitalar e comunitária possuem algumas distintas características fenotípicas e genotípicas conferindo diferente perfil de sensibilidade para diferentes antimicrobianos, fazendo-se assim, necessário muita vigilância

dos profissionais da saúde na distinção entre as formas de infecções, evitando uma terapia empírica incorreta e sem sucesso (GELATTI et al,2009).

1.3.2-Antimicrobianos e a Resistência Microbiana

As doenças infecciosas são uma das principais causa de morbidade e mortalidade nos seres humanos e animais, principalmente em regiões tropicais. Nos países em desenvolvimento, o tratamento com antimicrobianos clínicos é prejudicado não só pelos microrganismos resistentes, mas um sistema de saúde ineficaz e a baixa renda da população prejudicam o acesso aos fármacos adequados para o tratamento (KUETE et al., 2011).

Desde o descobrimento da penicilina por Alexander Fleming em 1923, até a evolução nas formulações e utilização de antibióticos, os mesmos têm sido uma revolução para a medicina como um todo. Os antimicrobianos são fármacos de origem sintética, semissintética ou natural que tem como objetivo inibir/impedir o crescimento ou eliminar microrganismos (FURTADO et al., 2019). A sua utilização na clínica, além de tratar infecções bacterianas, aumentou a chance de sucesso de outros tratamentos e intervenções, como cirurgias, transplantes e quimioterapias alterando diretamente o curso natural do mundo (MUNITA et al., 2015).

Desde a descoberta dos antimicrobianos o seu uso indiscriminado, principalmente na prática médica humana, veterinária e industrial colabora para a situação atual de disseminação de resistência e pressão seletiva de microrganismos. A melhor maneira de estender a eficácia dos medicamentos existentes ainda não foi bem compreendida. Devido a isso, houve um aumento na incidência de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos nas últimas décadas, principalmente em ambientes hospitalares (ASCIOGLU et al., 2014). Esse problema surgiu quase que simultaneamente as primeiras gerações de

antimicrobianos. Isso, a princípio, não pareceu tão relevante visto que era facilmente resolvido com a introdução de novos agentes ou alterações estruturais nas drogas de escolha (MATIAS et al., 2010).

Segundo a OMS, a resistência é um dos mais graves problemas atuais da saúde pública mundial. A resistência a antibióticos é definida como a capacidade de uma cepa fúngica ou bacteriana se multiplicar na presença de antimicrobianos a qual originalmente deveria ser sensível em concentrações prejudiciais aos mesmos (DE ANDRADE et al., 2016; FUENTEFRÍA et al., 2018).

A resistência aos antimicrobianos pode ser uma consequência natural resultante de mutações do agente infeccioso ao antimicrobiano utilizado. Esses antibióticos forçam uma “pressão seletiva” eliminando as cepas sensíveis e selecionando as resistentes aos antibióticos outras cepas são inerentemente resistentes a um antibiótico devido a estrutura ou metabolismo (BYARUGABA, 2004; DE ANDRADE et al., 2016).

O aumento na quantidade de antimicrobianos e sua ação cada vez mais potente, aliado ao seu uso descontrolado e a capacidade do microrganismo adquirir e transmitir genes de resistência, como a capacidade dos seres humanos transmitir os microrganismos têm feito uma seleção de cepas cada vez mais resistentes (MATIAS et al., 2010). O potencial de alterações na estrutura genética dos microrganismos, juntamente as fracassadas intervenções humanas têm atuado em sinergia para o surgimento de cepas dotadas de resistência aos antimicrobianos ou para sua maior virulência (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Esse fenômeno ocorre de maneira tão rápida que alguns microrganismos de importância clínica perdem a sensibilidade a antimicrobianos em 5 anos (STEFANOVIC et al., 2012).

O problema de resistência microbiana é tão grande que no ano de 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma lista de microrganismos que necessitam de atenção prioritária. Foram citados nesta diversos microrganismos, dentre eles: o *Staphylococcus aureus* resistente à

meticilina (MRSA), resistente à vancomicina (VRSA), ou com resistência intermediária à vancomicina (VISA), *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, entre outros (WHO, 2017).

Essas Infecções causadas por microrganismos resistentes ou multirresistentes têm sido um grande problema para saúde pública no mundo inteiro, devido a maior morbidade, mortalidade e custos de tratamento (TANG et al., 2016).

1.3.3-Mecanismos de Resistência

Os elementos relacionados à resistência aos antimicrobianos são genéticos e consistem em mecanismos como: inativação enzimática, bloqueio ou proteção do sítio alvo e alterações relacionadas a permeabilidade da membrana. (CARDOSO, 2022). Essa, pode ser resultado de uma transferência de material genético entre microrganismos ou por mutação genética. A transferência de resistência ocorre quando um microrganismo recebe material genético de outro e passa a expressar suas características. Já a mutação é um fenômeno espontâneo, resultado de uma replicação errada do DNA (substituição, adição ou deleção de par(es) de base(s)) levando a uma mudança na composição dos aminoácidos (TAVARES, 2000).

Com a introdução da penicilina na clínica médica nos anos 40, o prognóstico dos pacientes com infecções bacterianas melhorou diminuindo muito a mortalidade e aumentando a qualidade de vida dos pacientes devido ao tratamento mais curto. Porém, com a disseminação das cepas resistentes esse antibiótico teve seu uso diminuído dando espaço as penicilinas semissintéticas (meticilina e oxacilina), mas logo surgiram os *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) (ANDRADE, 2008). A resistência a meticilina está ligada a produção de uma proteína de parede celular chamada de PBP (proteína ligadora de penicilina). Geralmente, os beta-lactâmicos se ligam a essa proteína impedindo a

formação de parede celular e resultando na lise bacteriana. As MRSA produzem uma PBP modificada (PBPa2), codificada pelo gene *mec A*, funcional para a célula bacteriana e com pouca afinidade pelo antibiótico, permitindo a sobrevivência do microrganismo mesmo em altas concentrações do antimicrobiano (DE SOUSA et al., 2005; REMONATTO et al., 2007).

Na década de 80, as fluoroquinolonas foram introduzidas ao uso clínico contra cepas gram-negativas. Mas devido a seu amplo espectro de ação, fácil penetração nos procaríotos e baixa toxicidade, essa classe de antibióticos passou a ser usado também contra pneumococos e estafilococos. Inicialmente, também foram usados para conter o avanço de cepas multirresistentes, porém, logo após o início de seu uso clínico para esse fim, observou-se um alto nível de resistência contra essas cepas (BLANDEAU, 1999). Os mecanismos mais importantes de resistência as fluoroquinolonas são proteínas de efluxo, transporte ativo da droga para fora da célula e alteração no sítio de ação desses antibióticos pela DNA girase através de mutações no gene *GyrA* (LOWY, 2003).

As MRSA são resistentes a todos os beta-lactâmicos (penicilinas, carbapenêmicos e cefalosporinas). Os antibióticos mais antigos usados contra essas cepas são o ciprofloxacino e a clindamicina, porém, hoje menos de 5% dessas cepas são sensíveis a esses antimicrobianos. Sendo necessário o uso de antibióticos mais potentes como a Linezolida, teicoplanina e vancomicina e essa última já possui cepas resistentes em diversos ambientes hospitalares (MAHBOUBI & BIDGOLI, 2009).

Os microrganismos podem expressar resistência intrínseca, ou seja, mecanismos de resistência naturais de um gênero ou espécie, ou podem expressar resistência adquirida, que se originam a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outros microrganismos, sendo por conjugação de plasmídeos ou transposons, por transdução via bacteriófago ou transformação devido ao ambiente (DE ANDRADE et.al., 2016).

A resistência intrínseca é um mecanismo de resistência natural de um gênero ou espécie. Parte da herança genética dos microrganismos, das características naturais e fenotípicas. Esse mecanismo apresenta baixo risco a terapêutica, visto que é previsível, basta conhecer o agente etiológico e os mecanismos de ação dos antimicrobianos a serem aplicados clinicamente. A resistência adquirida ocorre em uma espécie anteriormente sensível que passa a ser resistente ao antimicrobianos por mutações nos próprios genes ou por aquisição de genes de resistência de outros microrganismos por conjugação de plasmídeos ou transposons, por transdução via bacteriófago ou transformação devido ao ambiente. (GOLD & MOELLERING, 1996; DE ANDRADE et al., 2016).

Os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência antimicrobiana é muito variável entre as espécies. A resistência é causada por alguns fatores básicos como a inativação do antimicrobiano, realizada diretamente na molécula bioativa por alterações químicas geralmente promovidas por enzimas; por modificação do alvo, que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; por mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química; por transmissão do alvo, onde os microrganismos se tornam insensíveis a antimicrobianos porque são capazes de transmitir a inativação de uma determinada enzima, ou seja, os antibióticos com mecanismos de ação que envolvem inibição enzimática tornam-se inativos por não terem o alvo para atuar; e por aquisição de vias metabólicas alternativas àquelas inibidas pela droga VAN HOEK et al., 2011).

As transferências de genes são associadas a fenômenos como transferência horizontal de genes e mutações (DAVIES & DAVIES, 2010). A transferência horizontal de genes pode ocorrer por meio de mecanismos, como conjugação, transformação e transdução (MUNIESA et al., 2013).

A conjugação refere-se a um processo que transcorre entre células bacterianas, da mesma ou de diferentes espécies, que, ao entrarem em

contato direto, trocam pequenas porções de material genético, como plasmídeos e elementos conjugativos integrativos (BERGLUND, 2015). A transformação ocorre quando DNA “nu” é liberado na lise de um organismo e englobado no material genético por outro. Neste processo, o DNA é absorvido pelas bactérias receptoras e incorporado no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga ou transposição (VAN HOEK et al., 2011). A transdução envolve bacteriófagos que desempenham um papel na disseminação do DNA entre as bactérias. Estes fazem isso por um processo onde o DNA bacteriano, em vez do DNA do fago, é empacotado na cabeça do fago e injetado na bactéria receptora (VAN HOEK et al., 2011).

Os microrganismos podem se tornar resistentes a drogas por diferentes formas (**Figura 1**). São exemplos desses mecanismos a alteração da permeabilidade da membrana, pois muitos antimicrobianos penetram nas bactérias por canais proteicos na membrana. Com o passar de gerações, algumas espécies podem deixar de produzir ou diminuir esses canais para evitar a entrada do ATB. Outro mecanismo é a produção de enzimas inativadoras, que promovem alterações estruturais na molécula da droga inativando-a, como as beta-lactamases (HEMAISWARYA et al., 2008). A bomba de efluxo é um mecanismo que pode ocorrer em diversos microrganismos (bactérias, fungos e protozoários), além de algumas células tumorais em mamíferos. São proteínas de membrana capazes de expulsar o fármaco para fora da célula, reduzindo ou acabando com sua concentração intracelular diminuindo sua sensibilidade, pois assim a droga assim não atinge as concentrações intracelulares necessárias para atingir uma ação eficaz (SANGWAN et al. 2008). Mecanismos baseados na alteração do sítio da droga, onde uma mutação cromossômica pode alterar bioquimicamente o receptor impedindo a interação fármaco-receptor, como acontece nas penicilinas. (HEMAISWARYA et al., 2008).

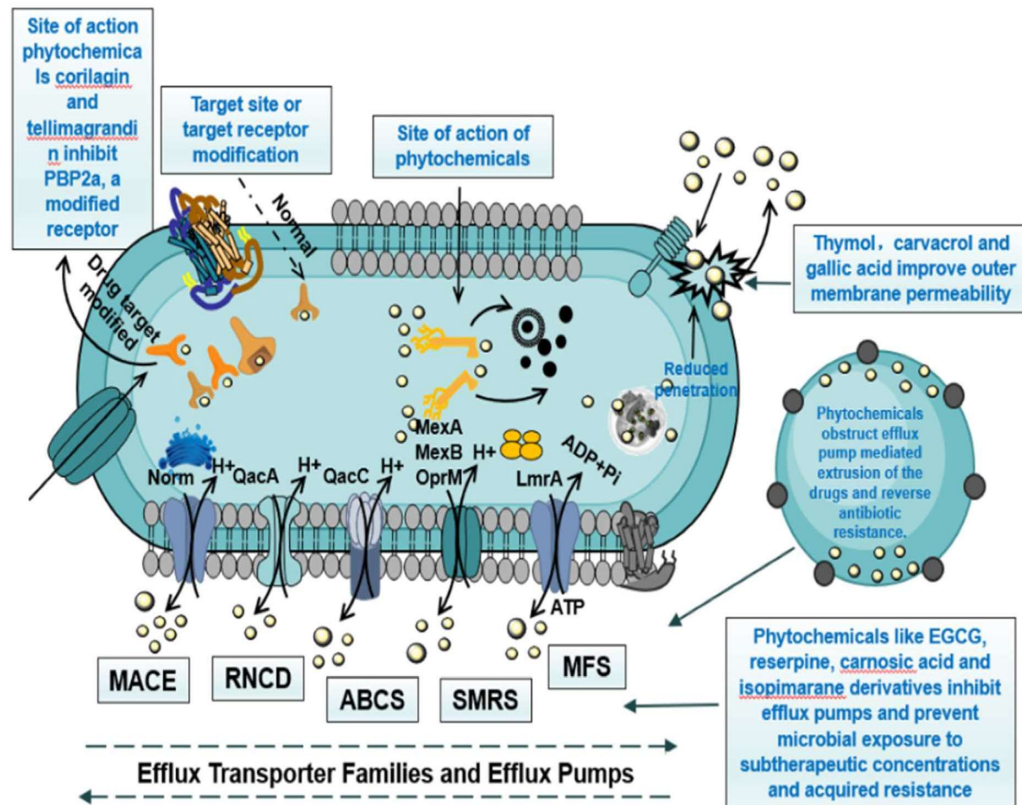


Figura 1-Mecanismos de resistência a antibióticos e locais-alvo de produtos naturais. **MACE:** super-família de extorsão de compostos multi-drogas e aóxicos; **RNCD:** super-família resistência-modulação-divisão celular; **ABCS:** super-família de cassetes de ligação ao ATP; **SMRS:** pequena super-família multirresistente; **MFS:** super-família facilitadora principal. **FONTE:** JU et al., 2022

Vários compostos extraídos de plantas já foram testados e seus mecanismos de combate a resistência elucidados: Timol e Carvol aumentam a permeabilidade da membrana externa bacteriana eugenol e citral inibem a b-lactamase ácido de sálvia inibe bomba de efluxo (ABREU et al., 2012).

1.4- Atividade Antimicrobiana

A descoberta e disponibilização de novos antibióticos vem diminuindo muito ao longo dos anos. A classe das oxazolidinonas foi a primeira a ser lançada após interstício de aproximadamente de 20 anos, que culminou na descoberta da linezolida em 2000 (FOSTER, 2017).

Os mecanismos de resistência têm se mostrado cada vez mais frequentes e em muitos casos, cepas expressando mais de um mecanismo. Devido a cada vez mais reduzida eficácia dos antibióticos usados na clínica e a alta incidência de infecção, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, é cada vez mais necessário buscar novas estratégias e compostos para desempenhar essa ação antimicrobiana com mecanismos alternativos aos antimicrobianos tradicionais ou melhorem a potência e biodisponibilidade dos antimicrobianos já existentes (ENDO et al., 2018; ROLTA et al., 2021). Por isso, as propriedades biológicas dos produtos vegetais têm sido exaustivamente pesquisadas a fim de buscar novos alvos de ação antimicrobiana, além estratégias onde se associam antimicrobianos sintéticos a produtos extraídos de plantas contendo metabólitos com capacidade antimicrobiana (ARYA et al., 2010; MATIAS et al., 2010). O produto natural pode agir tendo como alvo o mecanismo de resistência, atuando como modulador de resistência ou agir sinergicamente com o antimicrobiano (GIBBONS, 2005).

Nos últimos 20 anos, apenas 3 antibióticos foram desenvolvidos, ao mesmo tempo que casos de resistência a antimicrobianos têm aumentado drasticamente. Neste contexto, é importante pesquisar sobre novas forma de obtenção de antimicrobianos e os fitoterápicos têm se mostrado uma alternativa promissora e viável para suprir essa demanda, além de diminuir a pressão seletiva de microrganismos sobre os antimicrobianos existentes.

1.4.1- Pesquisas de atividade antimicrobiana

Existem diversas metodologias laboratoriais para avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de plantas, sendo que esses nem sempre são baseados nos mesmos princípios e não possuem a mesma sensibilidade (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003). Devido a isso, vários fatores podem influenciar no resultado, levando a um decréscimo ou inibição da atividade. Esses fatores são desde a origem da planta, época que foi realizada a coleta, parte destinada a extração, material fresco ou seco, metodologia empregada na extração, cepas utilizadas, cultivo (tempo de incubação, temperatura, oxigênio), meios de cultura, concentrações das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (RÍOS & RECIO, 2005; NASCIMENTO et al., 2007).

As propriedades físicas em ensaios com substâncias vegetais, principalmente os óleos essenciais, são muito importantes. Deve-se considerar se os mesmos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Para melhorar a qualidade e confiabilidade dos procedimentos, o ideal é o uso de solventes, detergentes ou agentes emulsificadores (tween 20, 80- Dimetilsulfoxido e etanol) para facilitar a dispersão dos mesmos. Porém, os mesmos devem ser anteriormente testados para evitar que possuam algum tipo de interação com o a substância testada ou possuir atividade antimicrobiana. Para obtenção de resultados confiáveis, todos os testes devem possuir controles positivos e negativos (NASCIMENTO et al., 2007).

Diversos grupos científicos como o CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) são responsáveis pela padronização dos métodos de avaliação de antimicrobianos. As metodologias que geralmente são aplicadas para avaliar a atividade antimicrobiana dos produtos vegetais são a difusão em disco, microdiluição e bioautografia (NASCIMENTO et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008).

A metodologia de Kirby-Bauer ou disco-difusão (1975), é um teste preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Trata-se de um método físico, onde um meio sólido de cultura desafia um microrganismo contra uma substância biologicamente ativa. O princípio do teste se baseia na difusão em agar de uma dosagem pré-determinada do antimicrobiano contido em discos de papel-filtro ou no disco branco estéril (BARRY, 1985; COLLINS, 1995).

Esse método tem diversas limitações como o fato de somente poder ser aplicado em microrganismos de crescimento rápido e algumas bactérias fastidiosas. Para o teste, um inóculo deve ser preparado com o microrganismo a ser desafiado e ajustado em solução salina em uma densidade ótica correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (equivalente a 0,5 na escala McFarland) para manter a padronização (OSTROSKY et al, 2008).

A leitura desse método é fundamentada na difusão da substância a ser testada, surgindo um halo onde não houve o crescimento do microrganismo, esse denominado halo de inibição. A leitura dos halos de inibição é feita pela medição (em milímetros) com ajuda de um paquímetro digital da circunferência do halo até a margem onde há crescimento do microrganismo, devendo posteriormente ser comparada com valores padronizados nos manuais (RELLER et al., 2009; SCHUMACHER et al., 2018). O resultado do teste se dá de forma qualitativa, classificando o isolado como sensível, intermediário ou resistente e não o poder antimicrobiano das amostras testadas (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003; OSTROSKY, 2008, SCHUMACHER et al., 2018).

Esse teste, apesar de dar um bom indicativo de atividade antimicrobiana, pode apresentar diversas fontes de erros, como a preparação, composição e espessura incorreta do meio de cultura, padronização incorreta do inóculo (densidade incorreta de microrganismos ou excesso de inóculo nas placas), temperatura e tempo de incubação inadequadas, interações indesejadas entre os antimicrobianos e os meios de cultura, contaminação ou medição errada dos halos de (ALVES, 2008).

A utilização de métodos de microdiluição também são excelentes ferramentas para determinar a suscetibilidade dos organismos a antimicrobianos. Servem para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Trata-se de um método quantitativo, pode ser realizado por técnicas de diluição em agar ou caldo. Os agentes antimicrobianos são testados em consecutivas diluições, sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo é considerada a CIM (Concentração Inibitória Mínima) ou MIC (Minimum Inhibitory Concentration). O mesmo vale para medir a capacidade microbicida (causar a morte do microrganismo), sendo medida a CBM (Concentração Bactericida Mínima) ou (Minimum Bactericidal Concentration) (ANDREWS, 2001; ALVES, 2008).

Para a realização desses testes podem ser utilizados tanto amostras de antimicrobianos em potencial, solúveis em água ou lipossolúveis. A avaliação da atividade antimicrobiana é feita em comparação com um agente antimicrobiano já conhecido como controle positivo e o solvente usado para o preparo das amostras pode ser utilizado como controle negativo (OSTROSKY, 2008). A concentração inibitória mínima pode ser avaliada a olho nu pela observação ou não de crescimento microbiano ou através de aparelhos baseados em leitura óptica como espectrofotômetros (ANDREWS, 2001; ALVES, 2008).

Essa metodologia apesar de mais conclusiva, também possui uma série de desvantagens como o fato de ser uma metodologia muito trabalhosa, consumir muito material (no caso da macrodiluição), a coloração dos extratos e óleos podem mascarar resultados, a sensibilidade do organismo, erro no diluente utilizado, a taxa de crescimento microbiano e a dificuldade na detecção de contaminação (BRESOLIN & CECHINEL, 2003; ALVES, 2008; OSTROSKY, 2008). Mas, as vantagens compensam em muito o processo, sendo as principais: Baixo custo, utilização de pouco material (na microdiluição), alta reprodutividade, pouca amostra e resultados bastante conclusivos (OSTROSKY, 2008; ALVES, 2008).

A técnica usada para medir *in vitro* a atividade antimicrobiana combinada de agentes antimicrobianos (sinergismo) se chama checkerboard (MUKHERJEE et al., 2005). Essa técnica basicamente consiste em colunas contendo uma quantidade da droga A, sofrendo microdiluições seriadas ao longo do eixo-X e linhas contendo a droga-B diluídas seriadamente ao longo do eixo-Y, para que todas as concentrações possíveis de ambas as drogas sejam testadas ao mesmo tempo. Para demonstrar efetividade da atividade sinérgica, as concentrações testadas são abaixo do MIC das amostras independentes (LORIAN, 1991).

A técnica de checkerboard também possui desvantagens como o fato de não oferecer detalhes sobre a farmacodinâmica das combinações e os resultados são dados em medidas relativas. Da mesma forma que o MIC, no checkerboard as vantagens também são muitas como o fato de poder ser feita por técnicas de microdiluição (menos material e custos), a interpretação do teste é simples e os cálculos matemáticos são simples de serem feitos) (MUKHERJEE et al., 2005).

A determinação do MIC por checkerboard geralmente é seguida de uma análise adicional, utilizando o índice não paramétrico de FICI ou ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada), ou modelo de resposta de superfície totalmente paramétrico (RSM) (MUKHERJEE et al., 2005). O ICIF é uma fórmula matemática onde os estudos que investigam a eficácia *in vitro* de antimicrobianos e a sua capacidade de sinergia, indiferença ou antagonismo. O ICIF possui muitas vantagens como a facilidade, a simplicidade e a viabilidade dos cálculos, porém, em alguns testes de MIC a escolha do ponto de inibição não é clara e o ICIF não é passível de análises estatísticas (MUKHERJEE et al., 2005).

1.5- *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree)

A espécie arbórea nativa da Austrália, a *Melaleuca alternifolia* é popularmente conhecida como tea tree (HOLLIDAY, 2004). Apesar de

endêmica da Oceania, hoje se espalha por boa parte do globo. Cresce naturalmente ao longo de riachos e áreas pantanosas e geralmente se destaca como espécie dominante do ecossistema. Arbusto alto ou árvore com até 7 metros, da família das mirtáceas (Myrtaceae), possui copa espessa e casca esbranquiçada. As folhas são dispostas alternadamente, às vezes espalhadas ou enroladas. As folhas são lisas, macias, de forma linear, com 10-35 mm de comprimento e 1 mm de largura. As flores ocorrem em massas de espigas brancas ou creme, com 3-5 cm de comprimento durante um curto período, principalmente da primavera ao início do verão.

Os pequenos frutos lenhosos, em forma de taça, com 2-3 mm de diâmetro, estão espalhados ao longo dos ramos. Possuem glândulas proeminentes, sendo assim, ricos em óleo. (HOLLIDAY, 2004)

A melaleuca tem sido usada como fitoterápico pelos mais diferentes povos e para diferentes aplicações ao longo dos séculos (HALCON & MIKUS, 2004). O extrato de melaleuca é usado como antisséptico tópico na Austrália desde o início do século 20 (SAILER, 1998; MARKHAN, 1999), recebendo comprovação científica, nos últimos anos, quanto a sua eficácia e segurança (PUVAČA et al., 2019).

O óleo essencial de melaleuca, também chamado de TTO (Tea Tree Oil) também usado de forma medicinal a quase um século. Aborígenes australianos utilizavam o seu OE para os mais diversos fins medicinais (CARSON et al., 1993). O TTO é comumente usado como antisséptico tópico, mas suas propriedades anti-inflamatórias são bem descritas e possui comprovada ação antimicrobiana contra diversas espécies de bactérias e fungos (SILVA et al., 2003).

Estudos clínicos a base de TTO, demonstraram sua eficácia em infecções superficiais como acne, tinea, herpes labial, candidíase oral, descolonização de MRSA (CARSON, 2006) Apesar de não haver nenhum relato de casos letais de ingestão do TTO, o mesmo não deve ser ingerido em grandes quantidades devido a sua moderada toxicidade (HAMMER et al., 2006).

1.5.1- Química do TTO

As características químicas específicas da família Mirtaceae, torna a *Melaleuca alternifolia* muito útil na destilação dos seus óleos essenciais (CARSON et al.,2006). Esse, geralmente é obtido por destilação no processo de arraste a vapor ou hidrodestilação dos ramos terminais e folhas. Uma vez condensado, o óleo é límpido a amarelo-claro. O rendimento do óleo é geralmente entre 1-2% do peso do material vegetal úmido (CARSON et al. 2006; CASTRO et al., 2005).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é um líquido claro e móvel, sem vestígios de água e com odor distinto (HALCON & MIKUS, 2004). Apresenta uma densidade relativa que varia entre 0,885 a 0,906, possui pouca solubilidade em água e miscível em solventes apolares (GRIFFIN et al., 1999).

A composição química do TTO, apesar de um pouco variável, foi bem definida e é composto principalmente por terpenos, grande parte em monoterpenos cíclicos, sesquiterpenos e seus álcoois associados. Onde metade deles são oxigenados e a outra metade são hidrocarbonetos (BROPHY et al.,1989). Os terpenos são hidrocarbonetos aromáticos voláteis e podem ser considerados polímeros do isoterpeno (SWORDS, 1978).

O TTO contém aproximadamente 97 compostos, sendo os principais constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana são: o terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos, que representam cerca de 90% do óleo (MURTAGH & SMITH, 1996).

Em análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GCMS) do TTO realizada por Nimbarte e Kulkarni (2013), mostrou a presença de 16 componentes majoritários. Os principais compostos foram limoneno, γ -terpineno, α -terpineno, cineol e α - terpinoleno. Uma vez que plantas aromáticas e medicinais produzem uma grande variedade de

terpenos voláteis, hidrocarbonetos e seus derivados e análogos isoprenóides oxigenados correspondentes, o efeito bactericida pode ser atribuído a esses componentes. Apesar de existir uma variação nos diferentes lotes de TTO, nenhuma grande diferença foi, até então, observada na sua bioatividade tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (MAY et al., 2000). Em trabalho realizado por Brophy et al. (1989), foram examinadas por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa-espectrometria de massa, 800 amostras de TTO, sendo relatados aproximadamente 100 compostos e suas faixas de concentração. Os compostos predominantemente encontrados nos óleos testados foram Terpinen-4-ol (40,1%), γ -terpineno (23.0%), α -Terpinene (10.4%) e 1,8-Cineol (5.1%).

O Terpinen-4-ol, linalol e alfa-terpineol são os componentes antibacterianos ativos mais estudados do óleo essencial de melaleuca (HINOUE et al., 1989; CARSON, 1996; MAY et al., 2000). O Terpinen-4-ol, é o componente majoritário do óleo e a principal fonte de atividade antimicrobiana, não devendo o TTO ter valores inferiores a 30%. Geralmente, esses valores estão entre 30-40%. Esses compostos, principalmente o terpinen-4-ol, demonstraram afetar a parede celular bacteriana, demonstrado pela perda de material nuclear de 260 nm, K⁺, tolerância ao sal e a presença de estruturas semelhantes ao mesossomo por microscopia eletrônica após o tratamento *in vitro* de *S. aureus* com TTO. A inibição da respiração dependente de glicose também foi demonstrada (GUSTAFSON, 1998; COX et al., 1998; CARSON et al., 2002).

Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO), o TTO deve conter predominantemente monoterpenos e álcoois relacionados, e sua composição é regulada atualmente pela norma internacional ISO 4730:2017.

1.5.2- Potencial Antimicrobiano do TTO

Apesar de existir diversas atividades biológicas atribuídas a *M. alternifolia*, a atividade antimicrobiana é a que tem recebido maior atenção e estudo. Seu uso mais antigo já relatado é o seu uso por aborígenes australianos que esmagavam as folhas e aplicavam em feridas ou inalavam para tratar tosses e resfriado. Na forma de infusão era utilizada para tratamento de doenças da pele e dor de garganta (SHEMESH & MAYO, 1991).

Estudos de todo o óleo essencial e vários de seus componentes (1,8 cineol, terpinen- 4-ol e α -terpineol) sugerem que o óleo de melaleuca compromete a membrana citoplasmática de *S. aureus*, dando-lhe um efeito bacteriostático e bactericida (CHRISTOPH, 2001; CARSON, 2002)

Os primeiros trabalhos com a *M. alternifolia* na forma de óleo foram desenvolvidos por Penfold e Grant (1926), que comparou o óleo de melaleuca com ácido carbólico ou fenol utilizando o coeficiente Rideal-Walker (RW), chegando ao resultado que o TTO foi 11 vezes mais ativo que o fenol. Também foram testados diversos componentes majoritários do TTO através do coeficiente RW chegando a 13,5 vezes para o terpinen-4-ol, 16 vezes para o terpineol (PENFOLD e GRANT, 1926); 3,5 vezes para o cineol e 8 vezes para o cimene (PENFOLD e GRANT, 1923); e 13 vezes para o linalol (PENFOLD e GRANT, 1926). Trabalhos mais recentes demonstram uma visível atividade antimicrobiana de amplo espectro que inclui antibacteriana (Gram-positivas e Gram-negativas), antifúngica, antiprotozoárias e antivirais. Diversos trabalhos in vitro tem corroborado com essas informações, os estudos clínicos são promissores, porém escassos (CARSON & RILEY, 1995; CARSON et al., 2006).

O TTO pode ter atividade bacteriostática em pequenas quantidades, mas em concentrações suficientes, é essencialmente um bactericida (CARSON et al., 2006). Uma grande variedade de bactérias já foi testada quanto a sua susceptibilidade ao TTO, a maioria dessas sendo suscetível a

concentrações iguais ou inferiores ao TTO a 1% (HAMMER et al., 1996).

Como mencionado anteriormente, as *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) devido a sua dificuldade de tratamento, tem sido um dos focos principais dos microbiologistas e desde que foi hipotetizado a eficácia do TTO frente essa cepa resistente, vários grupos começaram a pesquisar sobre essa teoria. Carson (1995a), pesquisou a concentração inibitória mínima do OE em 105 cepas isoladas clinicamente de *S. aureus*, chegando a um MIC de 0,5%. Em trabalhos realizados com MRSA, Carson et al. (1995b), testou 64 isolados clínicos de MRSA provenientes da Austrália e do Reino Unido encontrando o MIC de 0,25% e 0,31% e MBC de 0,5% e 0,65% na Austrália e no Reino Unido, respectivamente. Elsom (1999), em 100 cepas isoladas clinicamente de *S. aureus* MRSA chegou a um MIC de 0,32%.

Pesquisas realizadas com isolados clínicos *P. aeruginosa* chegaram ao MIC entre 1- 5% (BANES-MARSHALL, 2001) e 3% (CARSON & RILEY, 1994). Em 15 cepas de isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes*, chegou ao MIC de 0,12% (CARSON, 1996). Em trabalho realizado por Nimbarte e Kulkarni (2013), onde pesquisaram a atividade antimicrobiana do TTO frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* pelos métodos de MIC e MBC obtendo resultados promissores de inibição com 0,03%-0,15% (MIC) e 0,07-0,3% (MBC).

Hammer Et al. (2012), analisando a possibilidade de o TTO contribuir com a aquisição de resistência, subcultivou em séries de 14-22 vezes cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* com terpinen-4-ol subinibitório, encontrando resultados que indicam que houve quase nenhuma mudança na susceptibilidade antimicrobiana para as referidas cepas. Basicamente, esse estudo demonstrou que o TTO tem pouco impacto no desenvolvimento de resistência a antibióticos e que a exposição ao seu principal componente, o terpinen-4-ol, não altera significativamente a susceptibilidade antimicrobiana. Também estimula o vazamento de íons de potássio celular e inibe a respiração em *E. coli*, evidenciando uma ação letal relacionada ao dano da membrana citoplasmática (COX et al., 1998).

Cox et al. (2000) relataram atividade antimicrobiana para o TTO contra três microrganismos clinicamente significativos: *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, o estudo indica que o TTO inibiu a respiração desses microrganismos, tendo efeito bactericida. Existe a possibilidade de que o TTO iniba diretamente uma enzima respiratória específica ou evento metabólico, ao que tudo indica por uma alteração na estrutura da membrana celular.

Com base na literatura, pode-se concluir que o TTO pode ser utilizado como um potente antimicrobiano natural de amplo espectro, frente aos produtos químicos sintéticos atualmente utilizados (PUVAČA, et al.; 2019).

1.6 – Busca por Novos Fármacos e Terapias Combinadas

Há grande diversidade de micromoléculas especializadas das plantas com grande possibilidade de causar interações entre fitoterápicos e fármacos. Estudos com fitoterápicos com atividade antimicrobiana combinada a fármacos convencionais representam uma possível estratégia para tratamento de infecções possibilitando um aumento da eficácia do agente antimicrobiano (BIAVATTI, 2009).

O surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis na clínica médica tem aumentado muito nas últimas décadas, concomitante com a redução no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Desta forma, a terapia combinada se tornou uma alternativa promissora no combate a esses microrganismos tendo como principais vantagens a menor chance de surgimento de mutações e uma melhor eficácia e espectro de ação (DRAGO, 2007; MITSUGI, 2008).

A interferência na ação de um fármaco, nutriente ou alimento na ação de outro quando administrados concomitantemente, chama-se de interação medicamentosa. Essa interação pode gerar interações tanto sinérgicas quanto antagônicas na ação do fármaco em questão (AIYEGORO, 2011).

Existem diversas formas de interação que são classificadas conforme o mecanismo de ação, podendo ser interações físico-químicas (quando dois ou mais fármacos interagem exclusivamente físico-quimicamente), interações farmacodinâmicas (adição ou antagonismo ao efeito do fármaco) e interação farmacocinética (modifica a absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de outro fármaco) (CORDEIRO et al. 2005).

As interações medicamentosas, quando benéficas, podem tratar doenças concomitantes, reduzir efeitos adversos no paciente, prolongar o efeito da droga, impedir ou diminuir resistência bacteriana, aumentar a adesão ao tratamento, melhorar a eficácia ou diminuição da dose (CORDEIRO, 2005).

Em se tratando de interação com antimicrobianos, as três estratégias mais comuns de terapia de combinação são utilizadas são a combinação entre fármacos para inibir diferentes mecanismos da célula bacteriana, inibição de diferentes alvos da mesma via do metabolismo e a inibição do mesmo alvo de diferentes maneiras. Essa combinação entre fármacos e fitoterápicos, quando sinérgica, aumenta os efeitos do extrato de plantas em comparação com compostos isolados (WOLSKA, 2012). Diversos estudos já demonstraram essa capacidade de plantas interagir sinergicamente com antibióticos e compostos sem atividade antimicrobiana intrínseca sendo capazes de em alguns casos até sensibilizar patógenos que eram resistentes a um determinado antibiótico (AIYEGORO, 2011).

Essa tática de buscar substâncias com potencial antimicrobiano em plantas e avaliar a capacidade das mesmas possuir algum tipo de sinergismo entre os antimicrobianos utilizados na clínica e seus compostos têm se mostrado muito promissora, como podemos observar em diversos trabalhos (HEMAISWARYA et al., 2008; WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009).

O alcaloide chamado reserpina foi isolado da planta *Rauwolfia serpentina* e demonstrou potencializou o efeito do ciprofloxacino, tetraciclina e norfloxacino contra cepas multirresistentes (MDR) com mecanismo de

resistência através da bomba de efluxo demonstrando efeito sinérgico (GIBBONS & UDO, 2000)

O extrato de *Camellia sinensis* atuou sinérgicamente a metilina contra cepas MRSA devido ao fato de o extrato inibir a liberação das betalactamases e a síntese de PBP2 (YAM et al.; 1998). Em trabalho realizado por Hammer et al., (2012), visando observar o desenvolvimento ou não de resistência a antibióticos no uso combinado do óleo essencial de melaleuca com a canamicina. A pesquisa foi realizada utilizando TTO subinibitório em cepas de *S. aureus* e *E. coli*. A regularidade de cepas resistentes a antibióticos foi determinada pela inoculação de bactérias com ou sem o TTO subinibitório em agar contendo duas a 8 vezes o MIC de cada antibiótico (com e sem o TTO). Apesar de a frequência de resistência encontrada ser relativamente pequena, a combinação de canamicina e TTO reduziu em 10 vezes o índice de resistência em *E. coli* quando comparado a canamicina usada isoladamente.

A literatura mostra que alguns óleos essenciais possuem potencial antimicrobiano e sua associação com antimicrobianos de uso comum na clínica médica e veterinária, pode resultar em interações sinérgicas ou antagônicas com o mesmo. Devido a isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO), assim como seu efeito sinérgico/antagônico ao antimicrobiano ciprofloxacino em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

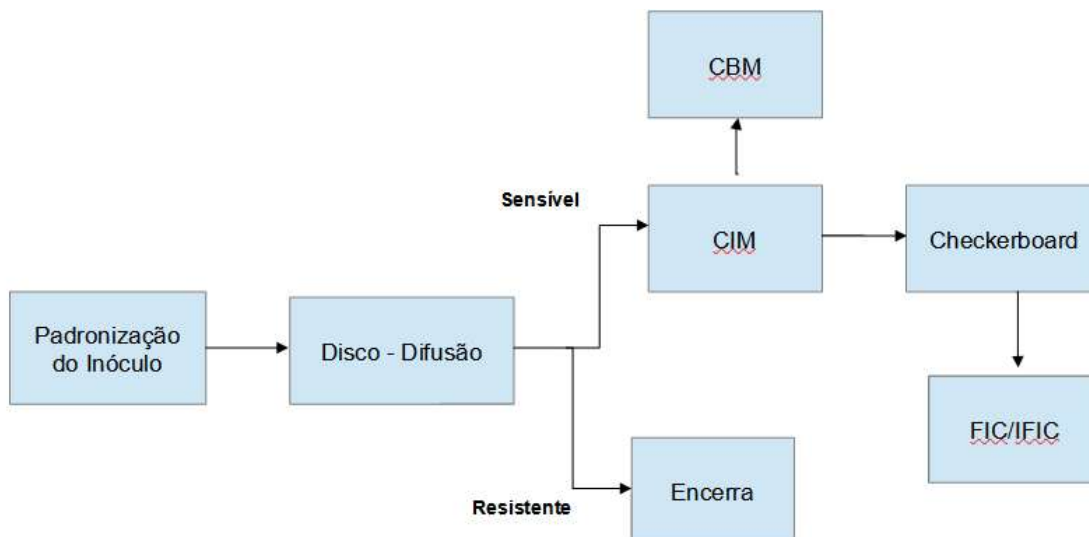
2- OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleo essencial *Melaleuca alternifolia* (tea tree) frente a distintas cepas gram positivas e gram negativas: quatro diferentes cepas *Staphylococcus aureus* e quatro de *Escherichia coli* e investigar seu potencial de provocar interação medicamentosa com o antibiótico da classe das quinolonas, o ciprofloxacino.

2.1- Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de Melaleuca contra as cepas testadas pela técnica de disco-difusão.
- Determinar a concentração inibitória e bactericida mínima (MIC e CBM respectivamente) das substâncias isoladas pela técnica de microdiluição seriada em caldo.
- Investigar presença de sinergismo em diversas concentrações através da associação óleo com antibacteriano pela técnica *Checkerboard*.
- Avaliar a interação entre do óleo e o antimicrobiano através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

3- MATERIAL E MÉTODOS



3.1 – Ensaio Antimicrobianos

3.1.1-Culturas e Microrganismos.

As cepas microbianas que serão utilizadas nos testes são provenientes do laboratório de microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). As cepas padrões utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram de das bactérias *Escherichia coli* NP 0022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* LB 25922, *Staphylococcus aureus* Np 0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* B24, *Staphylococcus aureus* Np 0038 e uma cepa de *Escherichia coli* (isolado clínico).

3.1.2-Obtenção do TTO e Densidade Relativa a 20 °C.

O óleo essencial de Melaleuca (tea tree) utilizado no trabalho foi obtido comercialmente da marca Laszlo. A composição do TTO é regulamentada pela norma internacional ISO-4730, que estabelece os

limites máximos e mínimos para 15 componentes do óleo. Os principais componentes que o TTO deve possuir são Terpinen-4-ol (>30%), α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p- cimenol entre outros.

O cálculo da densidade relativa do TTO foi feita pelas pesagens de 1mL e 10 mL do TTO e divisão pelo volume pesado (Densidade = massa/volume). O teste foi feito em triplicata para cada volume e o resultado se deu pela média simples dos resultados. Conforme metodologia da ISO 279:1998, a densidade foi medida a 20°C.

3.1.3- Padronização do Inóculo

As culturas microbianas estavam previamente estocadas em caldo BHI glicerinado em ultrafreezer a -85°C. Para reativação as culturas passaram por uma etapa de enriquecimento em BHI e depois foram transferidas para caldo Mueller Hinton (CMH) a 36°C/24h. Essa suspensão foi realizada até chegar uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para uma maior confiabilidade, a suspensão de microrganismos foi quantificada em espectrofotômetro pela sua densidade óptica em uma leitura no comprimento de onda de 625nm, onde o valor deve estar entre 0,08 e 0,1 para corresponder a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ou 0,5 na escala McFarland.

Para essa padronização se deve utilizar o caldo BHI (Brain Heart Infusion) como padrão (branco) no espectrofotômetro e a correção da densidade microbiana deve ser realizada com solução fisiológica (NaCl 0,9%).

3.1.4- Determinação da Susceptibilidade a Antimicrobianos (disco-difusão)

Para sua execução do teste de sensibilidade a antimicrobianos, ágar Mueller-Hinton foi vertido em placas de petri estéreis para obter uma camada de meio de cultura de aproximadamente quatro milímetros. Posteriormente, o inóculo (padronizado a 0,5 na escala de McFarland) foi semeado em toda extensão da placa com auxílio de um swab estéril em no máximo de 30 minutos.

Para a realização do teste foram utilizados discos brancos estéreis (obtidos comercialmente) com 6 mm de diâmetro. Os discos brancos estéreis contendo 10 µL do TTO, assim como os discos de controle positivo e negativo foram alocados no meio de cultura utilizando uma pinça estéril, respeitando distância apropriada.

As placas contendo os testes foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 36 °C, por 16 – 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata para garantir a confiabilidade.

A leitura foi realizada com ajuda de um paquímetro digital da marca Vonder e o resultado da medição (em milímetros) indicava se a cepa bacteriana é sensível (halo de inibição maior que 8mm), intermediário (6 – 8 mm) ou resistente (< 6mm) ao óleo essencial.

Para controle positivo foi utilizado discos comerciais de CIPROFLOXACINO (CIP5), o controle negativo foi realizado com discos brancos estéreis contendo 10 µL de água destilada estéril.

Os microrganismos considerados sensíveis ao óleo (halo maior que 8 mm) no teste indicou o potencial antimicrobiano do óleo essencial e o qualificava a realização dos ensaios de concentração inibitória e bactericida mínima.

3.2- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

3.2.1- Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A determinação da CIM foi pelo método de microdiluição em placa de 96 poços preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute com algumas modificações (CLSI, 2020).

Para a realização da técnica foram preparados os inóculos a partir das culturas do crescimento de 24h. Uma alçada de cepas foi suspensa em solução salina a 0,9% (NaCl 0,9%) e o crescimento acompanhado até alcançar a turvação da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Posteriormente, foram preparadas soluções em microtubos (*ependorfs*®) para volume de 1,5 mL de solução contendo 10% do inóculo bacteriano de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e o restante do volume foi completado com meio de cultura BHI (1350 μ L). Subsequentemente, diluições seriadas foram realizadas a partir de 100 μ L da solução estoque do TTO e do CIP, o qual foi dispensado na primeira linha (A) até a última linha (H). Nesta placa será feita a microdiluição seriada das amostras de 1:1 até o penúltimo poço, sendo último poço utilizado para o controle do crescimento microbiano. Esse teste foi realizado utilizando o óleo essencial de melaleuca (TTO) e o antibiótico ciprofloxacino (CIP).

Após preparo das placas, as mesmas foram medidas em um espectrofotômetro de microplacas a 595nm e as absorbâncias foram anotadas. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de crescimento microbiano por 24 horas a 37 °C. A leitura se dá através da turbidez gerada pelo crescimento bacteriano visível e através da leitura em espectrofotômetro em 595nm. A CIM foi representada pela concentração de TTO/CIP utilizada que inibiu o crescimento visível da bactéria (sem turvação) e a diferença de absorbância da primeira para a segunda leitura no espectrofotômetro indica o crescimento. Para uma comprovação da CIM foi utilizado 20 μ L da solução reveladora de

resazurina (azul) como indicador de crescimento. Quando a resazurina não é reduzida a resorufina (rosa) fica constatado o efeito inibitório e quando o corante sofre modificação para a cor rosa, indica uma reação de óxido-redução evidenciando a viabilidade celular. A leitura foi feita até 2h em temperatura ambiente. A mudança de coloração do azul para rosa é evidenciada como crescimento bacteriano (SALVAT et al., 2001; WEYNE et al., 2014). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e a CIM foi obtido através de uma média geométrica. Os resultados do CIM foram compilados e anotados em porcentagem (%) e concentração ($\mu\text{g/mL}$) de TTO/CIP para cada cepa.

3.2.2- Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima foi determinada a partir dos poços onde não foi observado crescimento. Alíquotas com $10\mu\text{L}$ foram semeadas (triplicata) em placas ágar Mueller-Hinton (AMH) com aproximadamente 4 milímetros de altura com auxílio de uma alça de drigalsky. Seguido de incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}/24\text{h}$. Após incubação foram enumeradas as unidades formadoras de colônias. A CBM é definida como a menor concentração dos óleos essenciais e antimicrobianos capazes de inviabilizar 99,99% da população microbiana inicial.

3.3- Checkerboard

A avaliação do potencial sinérgico foi realizada com o óleo essencial de melaleuca e o antimicrobiano ciprofloxacino em que as combinações apresentarem valores de CIM inferiores a $10000\mu\text{g/mL}$ (10 mg/mL) para o TTO e $1000\mu\text{g/mL}$ (1 mg/mL) para o CIP frente aos microrganismos testados. Amostras com CIM acima, não apresentam interesse para uso clínico.

Com base nos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções dos agentes antimicrobianos em concentrações sub inibitórias as quais

variaram de 1/2 a 1/256 da CIM e de 1/2 a 1/4096 da CIM para o antimicrobiano de uso clínico. De cada uma das diluições desses agentes antimicrobianos foram depositados 50 µL na microplaca. O agente antimicrobiano na orientação vertical (1 a 12) e o antimicrobiano na orientação horizontal (A a H) (Figura . Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana padronizada em $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foi dispensada em todos os poços da microplaca (LORIAN, 2005).

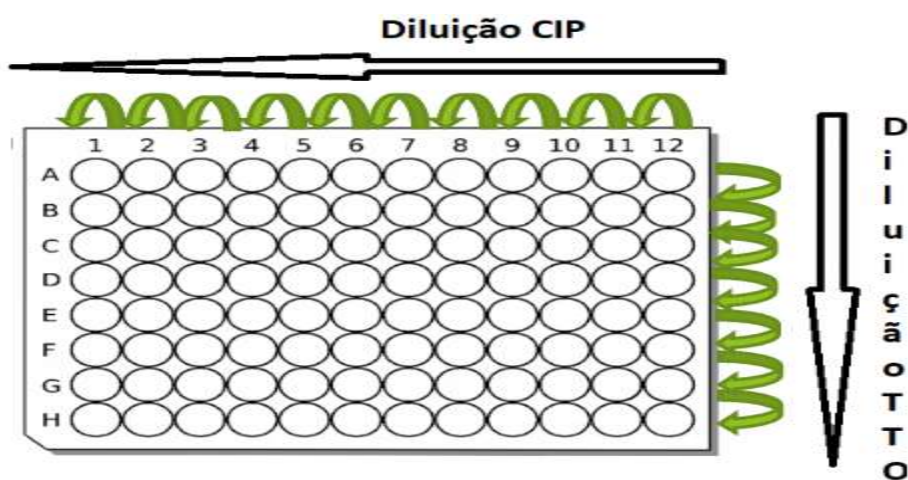


Figura 02- Desenho esquemático das diluições do checkerboard

3.4- Concentração Inibitória Fracionada (CIF) / Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

Os critérios de interpretação para a associação entre os antimicrobianos e os óleos essenciais serão obtidos a partir do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) que pode ser alcançado de acordo com as equações (**Eq1a-Eq1b**) ou (**Eq2**).

$$CIF = \frac{CIM(\text{associação})}{CIM(\text{isolado})} \quad (\text{Eq1a}) \quad ICIF = CIF(TTO) + CIF(CIP) \quad (\text{Eq1b})$$

$$ICIF = \frac{(CIM - TTO \text{ na associação ao CIP})}{(CIM - TTO)} + \frac{(CIM - CIP \text{ na associação ao TTO})}{(CIM - CIP)} \quad (\text{Eq2})$$

A partir dos valores obtidos no ICIF, foi avaliada a classificação seguindo a classificação descrita por Kumar et al., (2012), na **Tabela 01**. Os valores de $CIF \leq 0,5$ são interpretados como sinergismo total, $CIF > 0,5$ até ≤ 1 como indiferentes. O efeito foi antagônico quando > 2 (LEE et al., 2017).

Interação	IFIC
Sinergismo	$CIF \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 \leq CIF \leq 1$
Indiferente	$1 < CIF \leq 2$
Antagonismo	$CIF > 2$

Tabela 01- Valores de IFIC correspondentes a diferentes interações.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Análise Química e Densidade Relativa do TTO a 20 °C.

Considerando que os óleos essenciais são uma mistura complexa de vários compostos orgânicos, o estudo fotoquímico é de extrema importância para elucidar qual/ais as substâncias são responsáveis pelos efeitos e determinar o desenvolvimento de novos constituintes ativos para fármacos.

A análise cromatográfica do TTO, foi efetuada pelo fabricante. Os compostos majoritários encontrados foram: Terpinen-4-ol (41,07%), γ -Terpineno (26,61%) e α -Terpinene (11,72%), conforme consta na **Tabela 02**. Os resultados cromatográficos corroboram com a literatura e com a International Standard Organization (ISO 4730:2017) que regula as faixas de concentração dos principais terpenos TTO e álcoois e éteres relacionados.

Os 3 compostos principais quase somam 80% do total do óleo, não diferindo muito de Zhang et al., (2018) aonde eles somam 70% sendo: Terpinen-4-ol (31,1%), γ -Terpineno (25,3%) e α -Terpinene (12,7%) ou por Brophy et al. (1989) que pesquisou 800 amostras chegando a uma média de: Terpinen-4-ol (40,1%), γ -terpineno (23.0%), α -Terpinene (10.4%).

Tabela 02- Análise cromatográfica e composição química do TTO.

ÓLEO ESSENCIAL DE TEA TREE
 Nome comercial: Tea Tree GT BRasil
 Nomenclatura botânica: *Melaleuca alternifolia*
 Extração: Destilação a vapor das folhas
 Parte da planta: Folhas
 Origem: Brasil

Composição Química			
Pico	TR	Constituinte	%
1	6,748	α -Pineno	3,72
2	8,257	β -Pineno	0,74
3	9,392	α -Felandreno	0,38
4	9,774	α -Terpineno	11,72
5	10,092	p-Cimeno	3,68
6	10,272	Acetato de terpinila	0,50
7	10,348	Mosleno	1,30
8	11,477	γ -Terpineno	26,61
9	12,645	Terpinoleno	3,07
10	16,842	Terpinen-4-ol	41,07
11	25,129	Isoledeno	0,10
12	26,626	α -Gurjuneno	0,80
13	27,112	Cariofileno	0,68
14	27,893	Aromadendreno	2,51
15	28,761	Aloaromadendreno	0,79
16	29,336	Cadineno	0,64
17	30,072	Varidifloreno	0,90
18	31,216	β -Cadineno	0,79

A densidade relativa encontrada após a realização das pesagens de 1 e 10 mL do TTO e a divisão pelo volume pesado ($D=m/v$) e média simples dos valores obtidos foi **0,8989 0,90**. Tal resultado está dentro da faixa (0,885-0,906), já descrita na literatura (GRIFFIN et al., 1999)

4.2- Disco-Difusão (Kirb-Bauer)

Entre os métodos para determinação do grau de sensibilidade a um antimicrobiano o teste de disco-difusão, é muito utilizado, possibilitando a avaliação dos microrganismos frente aos produtos farmacêuticos e fornece evidências de resistência devido à degradação de agentes antimicrobianos por microrganismos (KATZUNG, 2022).

Após ser realizada uma padronização a 0,5 na escala de McFarland, garantindo que todos os inóculos tenham uma quantidade semelhante de microrganismos ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foi realizado o teste de difusão em placa que apesar de não dar um resultado quantitativo mostrou o potencial antimicrobiano do TTO. Apesar de ser um teste qualitativo, os halos de inibição foram medidos e anotados.

Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* tiveram média do halo de inibição superior a 8 mm os qualificando como sensíveis ao TTO. As médias encontradas nas triplicatas foram: *Staphylococcus aureus* NP0038 (13,5 mm), *Staphylococcus aureus* LB25923 (15,3 mm), *Staphylococcus aureus* B4 (10,6 mm) e *Staphylococcus aureus* NP0023 (11,8 mm).

As médias obtidas para *E. coli* foram: *Escherichia coli* NP0022 (8,8 mm), *Escherichia coli* ATCC25922 (12,8 mm), *Escherichia coli* LB25922 (7,8 mm) e *Escherichia coli* ISOLADO CLÍNICO (13,7 mm). As médias com o desvio padrão estão no **Quadro 01**.

CEPA	Média+ Desvio Padrão (mm)	CEPA	Média+ Desvio Padrão (mm)
<i>S. aureus</i> NP0038	13,5±1,29	<i>E. coli</i> NP0022	8,8±0,99
<i>S. aureus</i> LB25923	15,3±1,21	<i>E. coli</i> ATCC25922	12,8±2,63
<i>S. aureus</i> B4	10,6±2,81	<i>E. coli</i> LB25922	7,8± 0,56
<i>S. aureus</i> NP0023	11,8±0,55	<i>E. coli</i> IC	13,7±2,30

QUADRO 01- Resultado dos halos de inibição do teste de disco-difusão do TTO e seu desvio padrão.



Figura 03- Teste de Disco difusao (Sensibilidade) de S.aureus para TTO, OE de Citronela, Amoxicilina e Ciprofloxacino.

Apesar de encontrarmos halos de inibição menores que em *S. aureus*, a grande maioria das placas de disco-difusão de *Escherichia coli* também obtiveram halos superiores a 8 mm sendo consideradas sensíveis e as qualificado para a próxima etapa (**Figura 03**).

A técnica de disco-difusão também foi realizada para o ciprofloxacino para além de termos um controle positivo, compararmos, mesmo que semi-quantitativamente os halos e a possibilidade de estarmos trabalhando com alguma cepa resistência ao ciprofloxacino. As médias encontradas foram significativamente superiores ao TTO: *Staphylococcus aureus* NP0038 (30,4 mm), *Staphylococcus aureus* LB25923 (37,5 mm), *Staphylococcus aureus* B4 (37,1 mm) e *Staphylococcus aureus* NP0023 (34,5 mm).

As médias obtidas para *E. coli* foram: *Escherichia coli* NP0022 (29,8 mm), *Escherichia coli* ATTC25922 (29,3 mm), *Escherichia coli* LB25922 (23,7 mm) e *Escherichia coli* ISOLADO CLÍNICO (19,5 mm). As médias com o desvio padrão estão no **Quadro 02**.

CEPA	Média+ Desvio Padrão (mm)	CEPA	Média+ Desvio Padrão (mm)
<i>S. aureus</i> NP0038	30,4±1,70	<i>E. coli</i> NP0022	29,8±2,02
<i>S. aureus</i> LB25923	37,5±4,68	<i>E. coli</i> ATCC25922	29,3±2,75
<i>S. aureus</i> B4	37,1±8,31	<i>E. coli</i> LB25922	23,7±2,34
<i>S. aureus</i> NP0023	34,5±0,75	<i>E. coli</i> IC	19,5±1,08

QUADRO 02-Halos de inibição do teste de disco-difusão do CIP5 e seu desvio padrão

Esses resultados mostraram que, pelo menos, um dos testes apresentou perfil de sensibilidade para as cepas testadas frente ao TTO. Essa diferença pode ser dada devido a características físico-químicas do meio de cultura, o potencial de dispersão do óleo no meio e a diferença de velocidade de crescimento das cepas testadas. O fato de o TTO agir contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas corrobora com diversos trabalhos que tratam o TTO como um grande agente antimicrobiano de amplo espectro, como será mostrado na sequência.

4.3- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Um método utilizado para determinar a concentração mínima de antimicrobianos é o teste de microdiluição em poços ou microdiluição em caldo (**Figura 04**). A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de parar o crescimento do microrganismo testado, ou seja, a concentração bacteriostática (SANTURIO et al., 2011).

O *S. aureus* é um patógeno cosmopolita, presente tanto em ambientes hospitalares quanto não hospitalares. Esse microrganismo desenvolveu diversas estratégias para resistir a ação de boa parte dos antimicrobianos comerciais (CHUNG et al., 2011). Aproximadamente, 90-95% de *Staphylococcus aureus* em todo mundo são resistentes a penicilina e na maioria dos países asiáticos a resistência a meticilina chega a 70%, a MRSA e o *S. aureus* resistente a meticilina tem deixado a exclusividade do

ambiente hospitalar para também ser transmitida comunitariamente. Esse progresso na resistência aos antibióticos levou a busca de métodos confiáveis para deter essa espécie bacteriana (HEMAISWARYA et al., 2008). O MIC do TTO encontrado para as cepas gram-positivas ficou entre 0,10% e 0,50% nas quatro diferentes cepas de *S. aureus* sendo: *Staphylococcus aureus* NP0038 (0,17%), *Staphylococcus aureus* LB25923 (0,50%), *Staphylococcus aureus* B4 (0,10%) e *Staphylococcus aureus* NP0023 (0,21%).

Para as cepas gram- negativas o MIC do TTO ficou entre 0,25% e 0,50% nas quatro diferentes cepas de *E. coli*, onde as médias obtidas na triplicata foram:

Escherichia coli NP0022 (0,50%),

Escherichia coli ATTC25922 (0,25%),

Escherichia coli LB25922 (0,25%) e

Escherichia coli ISOLADO CLÍNICO (0,29%),

demonstrando que o TTO, mesmo diluído a essas concentrações, tem efeito inibitório para as respectivas

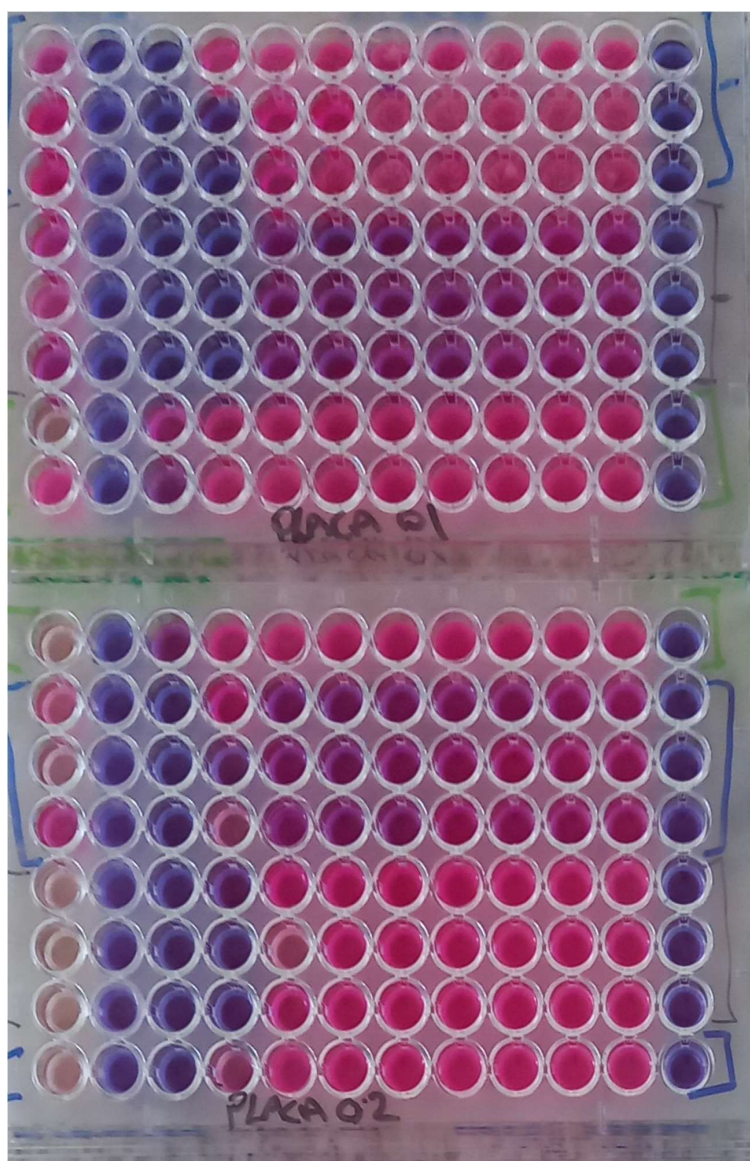


Figura 04- Ensaio de CIM em microplacas de 96 poços.

cepas .

As médias assim como a concentração são encontradas no **Quadro 03**.

CEPA	CIM (%)	CIM(µg/mL)	CEPA	CIM (%)	CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> NP0038	0,17	1500	<i>E. coli</i> NP0022	0,50	4500
<i>S. aureus</i> LB25923	0,50	4500	<i>E. coli</i> ATCC25922	0,25	2250
<i>S. aureus</i> B4	0,10	937	<i>E. coli</i> LB25922	0,25	2250
<i>S. aureus</i> NP0023	0,21	1872	<i>E. coli</i> IC	0,29	2620

QUADRO 03- Média do CIM do TTO e a sua concentração.

Grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas já foram testadas quanto a sua susceptibilidade ao TTO, sendo que a grande maioria foi considerada susceptível em concentrações iguais e inferiores a 1% de TTO, corroborando com os resultados obtidos no MIC do atual trabalho (CARSON et al., 1995a; HAMMER et al., 1996; ELSOM et al., 1999; NIMBARTE & KULKARNI, 2013). As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem diferir quanto a sensibilidade as substâncias ativas devido as suas diferenças na estrutura da célula associada a parede celular ou camadas de contorno celular (MICELI et al., 2011). A extração de substâncias com capacidade antimicrobiana de amplo espectro bacteriano, como foi observado no TTO, é de grande interesse pois o fenômeno de multi- resistência tem se espalhado tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas (KUMAR et al., 2012).

Já está pacificado que o Terpinen-4-ol é o principal componente ativo do TTO para atividade antimicrobiana (HAMMER et al., 2003). Em trabalho comparando a ação antimicrobiana através do MIC do TTO e do Terpinen-4-ol isolado para diversas cepas de bactérias tanto Gram-positivas quanto negativas chegou a um resultado bem semelhante de concentração para inibir o crescimento dos microrganismos (HAMMER et al., 2012).

O fato de o lote utilizado para desenvolvimento da presente pesquisa possuir valores superiores a 40% do Terpinen-4-ol são um bom indício da

sua atividade antimicrobiana, mas é muito difícil atribuir uma atividade biológica a um único composto dentro de uma mistura tão complexa. Podemos considerar que a grande efetividade antimicrobiana se dá pela interação sinérgica de diversos compostos presentes no TTO, mesmo os vestigiais (BRUN et al., 2019). O 1,8-Cineol, por exemplo, mesmo em quantidades traços torna a membrana dos microrganismos mais permeável, facilitando a penetração dos outros componentes direcionados a cadeia respiratória, síntese de produção de estruturas adesivas e expressão de genes envolvidos na formação de biofilme (GUSTAFSON et al., 1998).

O MIC do CIP encontrado para as cepas gram-positivas ficou entre 0,001% e 0,012% nas quatro diferentes cepas de *S. aureus* sendo: *Staphylococcus aureus* NP0038 (0,001%), *Staphylococcus aureus* LB25923 (0,003%), *Staphylococcus aureus* B4 (0,009%) e *Staphylococcus aureus* NP0023 (0,012%).

Para as cepas gram-negativas o MIC do CIP também ficou entre 0,001% e 0,012% nas quatro diferentes cepas de *E. coli*, onde as médias obtidas na triplicata foram: *Escherichia coli* NP0022 (0,003%), *Escherichia coli* ATCC25922 (0,001%), *Escherichia coli* LB25922 (0,002%) e *Escherichia coli* ISOLADO CLÍNICO (0,012%). As médias assim como a concentração correspondente são encontrados no **Quadro 04**.

CEPA	CIM (%)	CIM (µg/mL)	CEPA	CIM (%)	CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> NP0038	0,001	10	<i>E. coli</i> NP0022	0,003	30
<i>S. aureus</i> LB25923	0,003	30	<i>E. coli</i> ATCC25922	0,001	10
<i>S. aureus</i> B4	0,009	90	<i>E. coli</i> LB25922	0,002	20
<i>S. aureus</i> NP0023	0,012	120	<i>E. coli</i> IC	0,012	120

Quadro 04- CIM do CIPROFLOXACINO em percentagem e concentração.

4.4- Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a verificação do CBM, foram realizadas culturas em placas de petri contendo agar Muller-Hinton com material coletado os dois ou três os poços da microplaca onde houve a inibição do crescimento (dependendo do MIC). A placa foi incubada e o CBM é considerado a menor

concentração que inibiu o crescimento de 99% das colônias após nova incubação.

Segundo Carson et al. (2006) o TTO mesmo em concentrações pequenas tem o poder de atuar de forma bacteriostática, mas em grandes concentrações é bactericida. Experimentos in vitro relatam que o TTO atua como agente bactericida na maioria das bactérias de relevância clínica em concentrações entre 1-1,5% (v/v) (BANES-MARSHALL, 2001). As placas para verificação do MIC, de onde foram coletadas as amostras para realizar o MBC iniciaram com uma concentração de 1%. Como resultado do CBM, as placas de *S. aureus* quanto as de *E. coli* houve, mesmo que pequeno, crescimento de UFC indicando que o TTO em baixas concentrações possui propriedades bacteriostáticas ou o seu potencial bactericida é dose dependente.

Em contraponto, o MBC para o CIP foi igual ao MIC para todos as cepas corroborando com a literatura que fala da sua atividade essencialmente bactericida.

4.5- Ensaios de Checkerboard

Existe um interesse clínico na utilização de produtos naturais e agentes antimicrobianos para melhorar o espectro da atividade de um medicamento (KUMAR et al., 2012). Ademais, o uso combinado de fármacos é aconselhado para evitar ou diminuir o desenvolvimento de resistência e melhorar a eficácia no tratamento de infecções, pois os fitoquímicos podem inibir ou matar bactérias mesmo em baixas concentrações minimizando os efeitos potencialmente tóxicos (JU et al., 2022). Mas para efetuar adequadamente essa combinação, é preciso ter um conhecimento profundo das interações entre esses antimicrobianos (JACKSON et al., 2009).

Hammer et al., (2012), pesquisaram o desenvolvimento de resistência da associação do TTO e do Terpinen-4-ol subinibitórios com diversos antibióticos, dentre eles o ciprofloxacino, em *S. aureus* e *S.*

epidermidis demonstrando que ambos têm muito pouco impacto no desenvolvimento de resistência e suscetibilidade antimicrobiana. As duas teorias quanto ao não desenvolvimento de resistência pelo TTO são que o óleo tem diminuindo a taxa geral de mutações (impedindo as mutações) ou diminuindo o índice de sobrevivência da pequena proporção de mutantes resistentes (sem alterar taxa de mutação) (HAMMER et al., 2012).

Existem diversos exemplos na literatura de um segundo agente antimicrobiano ou medicamento não antibiótico prevenindo ou postergando o desenvolvimento de resistência aos antibióticos (KALAN & WRIGH, 2011). Por outro lado, existe uma teoria que a exposição aumentada e crônica de bactérias a concentrações subletais a biocidas, desinfetantes e antissépticos de uso doméstico pode levar a tolerância, que em teoria também poderia levar a tolerância aos antibióticos (FUANGTHONG et al., 2011).

A partir dos resultados obtidos na técnica de microdiluição seriada, o efeito sinérgico entre o TTO e o CIP foram avaliados pelo ensaio de checkerboard (**Figura 5**). O mesmo visou avaliar a interação de dois ou mais compostos através de um cruzamento de todas as concentrações possíveis de cada composto e indicando pela inibição de crescimento (assim como no MIC), qual a menor concentração (ou concentrações) de cada composto testado irá inibir o crescimento do microrganismo testado. Nesse ensaio, o resultado é dado como sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico. O efeito é considerado sinérgico quando a atividade dos compostos combinados é significativamente maior que quando testados individualmente (MITCHELL et al., 2012).

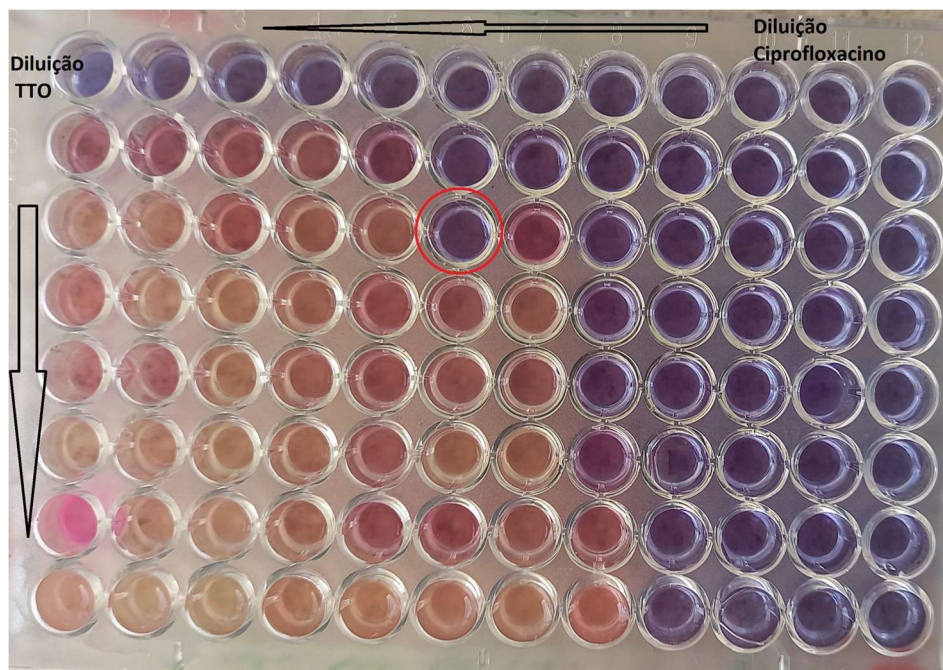


FIGURA 5- Placa com resultado do Ensaio de checkerboard entre CIP e TTO

É um teste quantitativo que aponta qual seria a melhor proporção de cada composto para que iniba o crescimento do microrganismo. Para padronizar o teste, pegamos o maior MIC encontrado para todas as cepas testada e utilizamos o seu sub-MIC (uma diluição a mais que a menor concentração inibitória): 0,25% (2250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o TTO e 0,005% (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o ciprofloxacino. O sub-MIC é usado por ser um valor insuficiente para isoladamente ter efeito inibitório. O intuito desse teste é diminuir a quantidade de antibiótico de uso clínico quando comparado a seu uso isolado

Os valores foram apresentados na forma de média simples dos resultados conseguidos na triplicata. No **Quadro 05**, estão os resultados dos testes de sinergia apresentados em porcentagem e concentração de cada composto para ter o efeito inibitório.

CEPA	TTO %	TTO [] (µg/mL)	CIP %	CIP [] (µg/ mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> NP0038	0,03	270	0,0003	3
<i>Staphylococcus aureus</i> LB25923	0,125	1125	0,0003	3
<i>Staphylococcus aureus</i> B4	0,03	270	0,0002	2
<i>Staphylococcus aureus</i> NP0023	0,06	540	0,0004	4
<i>Escherichia coli</i> NP0022	0,06	540	0,00015	1,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0,03	270	0,0003	3
<i>Escherichia coli</i> LB25922	0,03	270	0,0003	3
<i>Escherichia coli</i> IC	0,125	1125	0,0003	3

Quadro 05- Checkerboard: Melhor associação possível entre o CIP e o TTO para inibir o crescimento bacteriano- Em porcentagem (%) e Concentração ([] - µg/mL).

Quando testado individualmente em cepas de *S. aureus* o TTO precisou de uma concentração entre 0,1-0,5% e o ciprofloxacino entre 0,01-0,12%. Quando associados, o TTO ficou entre 0,03-0,125% e o CIP entre 0,0002-0,0004%.

Ao testar em cepas de *E. coli*, individualmente o TTO precisou de uma concentração entre 0,25-0,5% e o ciprofloxacino entre 0,01-0,12%. Quando associados, o TTO ficou entre 0,03-0,125% e o CIP entre 0,00015-0,0003%. Uma queda significativa em todos os testes, principalmente na dosagem do ciprofloxacino.

Analisando os resultados notamos que quando associados a concentração do ciprofloxacino para inibir o crescimento das cepas foi entre 3,3 e 40 vezes menor e do TTO foi entre 2,3 e 8,3 vezes menor. Olhando os resultados isoladamente, nota-se que existe uma interação positiva entre os compostos quando associados, porém, para nos certificarmos que esse efeito é sinérgico, aditivo ou até indiferente, precisamos aplicar o índice de concentração inibitória (ICIF).

4.6- Concentração Inibitória Fracionada (CIF)/ Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

Em uma perspectiva farmacológica, as substâncias isoladas com ação em apenas um alvo molecular, geralmente, possuem uma ação menos eficiente no tratamento de uma infecção quando em comparação a terapia combinada que atua em mais de um alvo simultaneamente, potencializando seu efeito terapêutico (BIAVATTI, 2009).

O critério utilizado no presente trabalho foi adaptado de Kumar et al. (2012) e Lee et al. (2017) onde os valores do ICIF $\leq 0,5$ são interpretados como sinergismo total, ICIF $> 0,5$ até ≤ 1 como indiferentes. O efeito é considerado antagônico quando >2 .

Após calcular isoladamente o CIF do TTO e o CIF do ciprofloxacino, foi realizado o cálculo o ICIF. Os resultados apresentados reportam que houve efeito sinérgico (IFIC $\leq 0,5$) entre o TTO e o ciprofloxacino em todas as cepas de *S. aureus* e *E. coli* testadas, como demonstrado no **Quadro 06**.

Isoladamente, os cálculos demonstram que quando unidos os compostos precisam de no máximo metade da concentração para ter o mesmo efeito de quando isolados. Como no caso de *S. aureus* NP0038 que para surtir o mesmo efeito inibitório precisou de apenas 18% da concentração do TTO (quando isolado) e 30% da concentração do Ciprofloxacino (quando isolado), utilizando o total de 48% da concentração necessária se usados isoladamente. Da mesma forma, na *E. coli* NP0022 foi necessária 12% da concentração de TTO e apenas 5% do ciprofloxacino. Apenas 17% da concentração total.

Microrganismo	CIF (TTO)	CIF (CIP)	ICIF	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i> NP0038	0,18	0,30	0,48	Sinergia
<i>Staphylococcus aureus</i> LB25923	0,25	0,10	0,35	Sinergia
<i>Staphylococcus aureus</i> B4	0,28	0,02	0,30	Sinergia
<i>Staphylococcus aureus</i> NP0023	0,28	0,03	0,31	Sinergia
<i>Escherichia coli</i> NP0022	0,12	0,05	0,17	Sinergia
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0,12	0,30	0,42	Sinergia
<i>Escherichia coli</i> LB25922	0,12	0,15	0,27	Sinergia
<i>Escherichia coli</i> IC	0,42	0,02	0,44	Sinergia

Quadro 06- CIF/ICIF

Em uma perspectiva farmacológica, as substâncias isoladas com ação em apenas um alvo molecular, geralmente, possuem uma ação menos eficiente no tratamento de uma infecção quando em comparação a terapia combinada que atua em mais de um alvo simultaneamente, potencializando seu efeito terapêutico (BIAVATTI, 2009).

5- CONCLUSÃO

A técnica de Kirb-Bauer foi utilizada para verificar a sensibilidade ou resistência do TTO e do ciprofloxacino para as cepas de *E. coli* e *S. aureus* e as mesmas se mostraram sensíveis tanto ao TTO, quanto ao CIP.

O teste de concentração inibitória mínima demonstrou que o TTO possui um grande potencial antibacteriano e em amplo espectro de ação. Sua atividade em baixas concentrações têm ação bacteriostática, mas podendo ser bactericida em concentrações suficientes. As concentrações inibitórias mínimas do TTO tanto para a *E. coli* quanto para o *S. aureus* variaram entre 940- 4500 µg/mL.

O ensaio de Checkerboard, ou de interações demonstrou efeito sinérgico em todas as combinações avaliadas para todas as cepas testadas. Os resultados obtidos nesse estudo reforçam a ideia de que a atividade biológica do TTO é devido aos efeitos combinados e/ou sinérgicos de uma mistura complexa dos seus fitoquímicos. Esses resultados apesar de promissores, favorecem pesquisas posteriores com objetivos de isolar os compostos, elucidar mecanismos de ação, utilizar novas técnicas de combinação, tempo de ação da combinação e ensaios *in vivo*, complementares são necessários.

Tais resultados deixam muito evidente que a utilização do TTO, obtido da *Melaleuca alternifolia* atividade antimicrobiana é capaz de inibir *in vitro* o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo uma fonte para futuras investigações na descoberta de medicamentos com atividade antimicrobiana. E quando associado ao ciprofloxacino essa atividade se potencializa. Essa associação é muito benéfica para a diminuição do uso de ciprofloxacino e conseqüentemente a diminuição na probabilidade do mesmo “forçar” algum tipo de resistência. Isso apoia a hipótese que o uso combinado de CIP com TTO podem representar uma alternativa terapêutica valiosa como adjuvante a quimioterapia contra todos os espectros bacterianos.

6- REFERÊNCIAS

ABREU, Ana Cristina; MCBAIN, Andrew J.; SIMOES, Manuel. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, 2012.

AIYEGORO, Olayinka et al. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelia Africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates. *International journal of molecular sciences*, v. 12, n. 7, p. 4477-4487, 2011.

ALVES, Everton Giovanni et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química nova*, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth Linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.*, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.

ANDRADE, Mariana de Azevedo et al. Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. 2008. Tese de Doutorado.

ANDREWS, Jennifer M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, n. suppl_1, p. 5-16, 2001.

ARYA, Vedpriya et al. Antimicrobial activity of *Cassia occidentalis* L (leaf) against various human pathogenic microbes. *Life Sci Med Res*, v. 9, n. 1, p. e12, 2010.

ASCIOGLU, S., SAMORE, M. H., & LIPSITCH, M. A new approach to the analysis of antibiotic resistance data from hospitals. *Microbial Drug*

Resistance, 20(6), 583–590, 2014. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0173>.

BANES-MARSHALL, Lynne; CAWLEY, Patrick; PHILLIPS, Carol A. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. isolates from clinical specimens. *British Journal of Biomedical Science*, v. 58, n. 3, p. 139, 2001.

BARNES, H. John. Colibacillosis. *Diseases of poultry*, p. 631-652, 2003.

BARRY, A. L. Susceptibility tests: diffusion test procedure. *Manual of clinical microbiology*, p. 978-987, 1985.

BERGLUND, Björn. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection ecology & epidemiology*, v. 5, n. 1, p. 28564, 2015.

BIAVATTI, Maique Weber. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, p. 371-378, 2009.

BLANDEAU, Joseph M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clinical therapeutics*, v. 21, n. 1, p. 3-40, 1999.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: Editora Univali, 2003.

BROPHY, Joseph J. et al. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, n. 5, p. 1330-1335, 1989.

BRUN, Paola et al. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. *Current microbiology*, v. 76, p. 108-116, 2019.

BYARUGABA, D. K. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International journal of antimicrobial agents*, v. 24, n.

2, p. 105-110, 2004.

CARDOSO, Lara Alves. Revisão bibliográfica sobre a atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *Melaleuca alternifolia* e de *Zingiber officinale* frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. 2022.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, v. 82, n. 332, p. 181-185, 1995a.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. In-vitro activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against *Streptococcus* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 37, n. 6, p. 1177-1178, 1996.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in applied microbiology*, v. 16, n. 2, p. 49-55, 1993.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology*, v. 78, n. 3, p. 264- 269, 1995.

CARSON, Christine F. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 35, n. 3, p. 421-424, 1995b.

CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A.; RILEY, Thomas V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CARSON, Christine F.; MEE, Brian J.; RILEY, Thomas V. Mechanism of

action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V. The antimicrobial activity of tea tree oil. *The Medical Journal of Australia*, v. 160, n. 4, p. 236-236, 1994.

CASTRO, Ciro de et al. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Revista Árvore*, v. 29, p. 241-249, 2005.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 4, p. 243-247, 2002.

CHRISTOPH, F.; STAHL-BISKUP, E.; KAULFERS, P.-M. Death kinetics of *Staphylococcus aureus* exposed to commercial tea tree oils sl. *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, n. 2, p. 98-102, 2001.

CHUNG, Pooi Yin; NAVARATNAM, Parasakthi; CHUNG, Lip Yong. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 10, p. 1-6, 2011.

CLSI- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30th Informational Supplement. CLSI document M100-S29. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2020.

COLLINS, C. H. *Microbiological methods*. 7. ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, 1995.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; DO SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.

15, p. 272-278, 2005.

COUTINHO, Henrique DM et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008.

COX, Cox et al. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, v. 26, n. 5, p. 355-358, 1998.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010

DE ANDRADE, Leonardo Neves; DA COSTA DARINI, Ana Lúcia. *Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos*. 2016.

DE SOUSA, M. Aires et al. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 10, p. 5150-5157, 2005.

DRAGO, Lorenzo et al. In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. *BMC infectious diseases*, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2007.

ELSOM, G. K. F.; HIDE, D. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin. *Journal of*

Antimicrobial Chemotherapy, v. 43, n. 3, p. 427-428, 1999.

ENDO, Eliana Harue et al. Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. *Journal of herbal medicine*, v. 14, p. 48-54, 2018.

FOSTER, Timothy J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews*, v. 41, n. 3, p. 430-449, 2017.

FRIEDMAN, Mendel et al. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 19, p. 6042-6048, 2004.

FUANGTHONG, Mayuree et al. Exposure of *Acinetobacter baylyi* ADP1 to the biocide chlorhexidine leads to acquired resistance to the biocide itself and to oxidants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 2, p. 319-322, 2011.

FUENTEFRÍA, Alexandre M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in applied microbiology*, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018.

FURTADO, Diego Moreno Fernandes et al. Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 10, 2019.

GELATTI, Luciane Cristina et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 84, p. 501- 506, 2009.

GIBBONS, Simon; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of

multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 14, n. 2, p. 139-140, 2000.

GIBBONS, Simon. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry reviews*, v. 4, p. 63-78, 2005.

GOLD, Howard S.; MOELLERING JR, Robert C. Antimicrobial-drug resistance. *New England journal of medicine*, v. 335, n. 19, p. 1445-1453, 1996.

GRIFFIN, Shane G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 14, n. 5, p. 322- 332, 1999.

GUSTAFSON, Gustafson et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in applied microbiology**, v. 26, n. 3, p. 194-198, 1998.

HALCÓN, Linda; MILKUS, Kelly. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *American journal of infection control*, v. 32, n. 7, p. 402- 408, 2004.

HAMMER, KA 1; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of applied microbiology*, v. 95, n. 4, p. 853-860, 2003.

HAMMER, Kate A. et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and chemical toxicology*, v. 44, n. 5, p. 616-625, 2006.

HAMMER, Katherine A.; CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single-and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy, v. 56, n. 2, p. 909-915, 2012.

HAMMER, Katherine A.; CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *American journal of infection control*, v. 24, n. 3, p. 186-189, 1996.

HEMAISWARYA, Shanmugam; KRUTHIVENTI, Anil Kumar; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HINOUE, J. B. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie*, v. 44, p. 302-303, 1989.

HOLLIDAY, Ivan. *Melaleucas: a field and garden guide*. Frenchs Forest, NSW: Reed New Holland Publishers. ISBN 1-876334-98-3, 2004.

International Organisation for Standardisation. 2017. ISO 4730:2017. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

JACKSON, Clement et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, v. 7, n. 1, 2018.

JU, Jian et al. Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, v. 92, p. 22-32, 2019.

JU, Jian et al. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: A new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and*

Nutrition, v. 62, n. 7, p. 1740-1751, 2022.

KALAN, Lindsay; WRIGHT, Gerard D. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 13, p. e5, 2011.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KATZUNG, Bertram G.; VANDERAH, Todd W. *Farmacologia básica e clínica*. Artmed Editora, 2022.

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; AHMAD, Iqbal. Herbal medicine: current trends and future prospects. In: **New look to phytomedicine**. Academic Press, 2019. p. 3-13.

KLIEBENSTEIN, Daniel J. Plant defense compounds: systems approaches to metabolic analysis. **Annual review of phytopathology**, v. 50, p. 155-173, 2012.

KUETE, Victor et al. Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl.(Moraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2011.

KUMAR, S. Nishanth et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 3143-3150, 2012.

LEE, Spencer; AL RAZQAN, Ghaida Saleh; KWON, Dong H. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*, v. 24, p. 49-55, 2017.

LIRA, Maria Helena Pereira de et al. Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 3, p. 187-197, 2020.

LOGUERCIO, Andrea Pinto et al. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência rural*, v. 35, p. 371-376, 2005.

LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3. ed. New York: Williams & Wilkins, p. 1250, 1991.

LORIAN, Victor (Ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

LOWY, Franklin D. et al. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F. Ghazian. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine*, v. 17, n. 7, p. 548-550, 2010.

MARKHAM, Julie L. Biological activity of tea tree oil. In: *Tea Tree*. CRC Press, p. 169-190, 1999.

MATIAS, Edinardo Fagner et al. Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 8, n. 3, 2010.

MAY, J. et al. Time–kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 45, n. 5, p. 639-643, 2000.

MICELI, N. et al. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food and chemical toxicology*, v. 49, n. 10, p. 2600-2608, 2011.

MITCHELL, Gabriel et al. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside

antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 67, n. 3, p. 559-568, 2012.

MITSUGUI, Cecília Saori et al. Efeito antimicrobiano in vitro da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ciência, Cuidado e Saúde*, v. 7, p. 76-81, 2008.

MOLEYAR, Venkataramana; NARASIMHAM, Pattisapu. Antibacterial activity of essential oil components. *International journal of food microbiology*, v. 16, n. 4, p. 337-342, 1992.

MUKHERJEE, Pranab K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 1, p. 163-194, 2005.

MUNIESA, Maite; COLOMER-LLUCH, Marta; JOFRE, Juan. Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations?. *Mobile genetic elements*, v. 3, n. 4, p. 739-51, 2013.

MUNITA, Jose M.; BAYER, Arnold S.; ARIAS, Cesar A. Evolving resistance among Gram- positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. suppl_2, p. S48-S57, 2015.

MURTAGH, G. J. Month of harvest and yield components of tea tree. I. Biomass. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 47, n. 5, p. 801-815, 1996.

NASCIMENTO, Paula FC et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 108- 113, 2007.

NIMBARTE, Seema; KULKARNI, Archana. Comparative phytochemical analysis and resilience pattern exhibited by thyme and tea tree oil against selected poultry isolates. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, v. 4, n. 4, p. 113-117, 2013.

OLIVEIRA, W. F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o

isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 99, n. 552, p. 211-214, 2004.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 301-307, 2008.

PENFOLD, Arthur Ramon; GRANT, R. *The Germicidal Values of Some Australian Essential Oils and Their Pure Constituents: Together with Those for Some Essential Oil Isolates and Synthetics*. Government Printer, South Africa, 1926.

PENFOLD, Arthur Ramon; GRANT, R. *The germicidal values of the principal commercial Eucalyptus oils and their pure constituents, with observations on the value of concentrated disinfectants*. 1923.

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

PIRES, Marcelle Cristina da Silva et al. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 643-647, 2007.

POIREL, Laurent et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 4, p. 6.4. 14, 2018.

POPOVIĆ, Sanja et al. Effects of dietary essential oils on productive performance, blood lipid profile, enzyme activity and immunological response of broiler chickens. *Poult. Sci*, v. 80, p. 1-12, 2016.

PUVAČA, N. et al. Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and its essential oil: antimicrobial, antioxidant and acaricidal effects in poultry production.

World's Poultry Science Journal, v. 75, n. 2, p. 235-246, 2019.

RELLER, L. Barth et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical infectious diseases, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.

REMONATTO, Gabriela et al. CA-MRSA: um patógeno emergente. NewsLab, v. 80, p. 92- 6, 2007.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L.(Moraceae). Revista brasileira de plantas medicinais, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L.(Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L.(Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells. J Ethnopharmacol, v. 22, p. 80-84, 2005.

RIVAS, Lucia et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. International journal of food microbiology, v. 139, n. 1-2, p. 70-78, 2010.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, José Manuel et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. Journal of Infection and Chemotherapy, v. 17, p. 149-182, 2011.

ROLTA, Rajan et al. Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytochemicals of *Artemisia annua* L: a strategy to control drug resistance pathogens. Journal of Ethnopharmacology, v. 266, p. 113420, 2021.

SAILER, Reinhard et al. Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil. Phytomedicine, v. 5, n. 6, p. 489-495, 1998.

SALVAT A. et al., Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2001

- SANGWAN, Payare L. et al. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 16, n. 22, p. 9847-9857, 2008.
- SANTURIO, Deise Flores et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. *Ciência Rural*, v. 41, p. 1051-1056, 2011.
- SAVIOLLI, Juliana Yuri. Pesquisa e Caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga-STECC; *E. coli* aviária patogênica-APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SCHUMACHER, A. et al. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 37, p. 187-208, 2018.
- SHEMESH, A.; MAYO, W. L. Australian tea tree oil: a natural antiseptic and fungicidal agent. *Aust. J. Pharm*, v. 72, p. 802-803, 1991.
- SILVA, S. R. S. et al. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2003.
- STEFANOVIC, Olgica D.; STANOJEVIC, Dragana D.; COMIC, Ljiljana R. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Pol Pharm*, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.
- SWORDS, Greg; HUNTER, G. L. K. Composition of Australian tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 734-737, 1978.
- TANG, Hung-Jen et al. Clinical significance of community-and healthcare-acquired carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *PLoS One*, v. 11, n. 3, p. e0151897, 2016.

TAVARES, Walter. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 281-301, 2000.

TOMIOKA, Haruaki et al. Clinical and basic studies on therapeutic efficacy of herbal medicines against Mycobacterial infections. **Medicines**, v. 6, n. 2, p. 67, 2019.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia 5ª*. Atheneu São Paulo, 2008.

UCHOA, A.F.; DE MIRANDA, M. R. A.; DE SOUZA, A. J.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; LEMOS, F. J. A.; OLIVEIRA, A. E. A.; XAVIER-FILHO, J. Toxicity of Hydrolyzed Vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and Phytopathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 8056-8061, 2009.

VAN HOEK, Angela HAM et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, v. 2, p. 203, 2011.

VIEIRA, A. J. et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemicobiological interactions*, 2018.

WAGNER, Hildebert; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WALSH, S. E.; MAILLARD J.-Y.; RUSSELL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L., BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on - positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 94, p. 240-247, 2003.

WEYNE, G. et al., *Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L . 35(4), 709–715, 2014.*

WOLSKA, Krystyna I.; GRZES, Katarzyna; KUREK, AnnA. Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. *Pol J Microbiol*, v. 61, n. 2, p. 95-104, 2012.

WHO (World Health Organization). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis [internet]. World Health Organization; 2017.

YAM, T. S.; HAMILTON-MILLER, J. M.; SHAH, Saroj. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2'synthesis, and beta-lactamase roduction in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 42, n. 2, p. 211-216, 1998.

ZHANG, Wencan; CAO, Xu; LIU, Shao Quan. Aroma modulation of vegetable oils—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 60, n. 9, p. 1538-1551, 2020.

ZHANG, Xiaofeng et al. In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *BioMed research international*, v. 2018, 2018.