



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

RENAN RHONALTY ROCHA

**ESTUDO COMPARATIVO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E EFEITO SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton
tetradenius* Baill. E *C. pulegiodorus* Baill. CONTRA ISOLADOS DE
*Staphylococcus aureus***

SOBRAL

2019

RENAN RHONALTY ROCHA

**ESTUDO COMPARATIVO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E EFEITO SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton
tetradenius Baill.* E *C. pulegiodorus Baill.* CONTRA ISOLADOS DE
*Staphylococcus aureus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Microbiologia Aplicada

Orientadora: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro
Coorientadora: Maria Nágila Carneiro Matos

SOBRAL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R576e Rocha, Renan Rhonalty.

Estudo comparativo sobre a composição química, atividade antibacteriana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de croton tetradenius baill. e c. pulegiodorus baill. contra isolados de staphylococcus aureus / Renan Rhonalty Rocha. – 2020.

79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Careiro.

Coorientação: Prof. Dr. Maria Nágila Carneiro Matos.

1. Staphylococcus aureus. 2. Resistência. 3. Croton. 4. Óleo essencial. I. Título.

CDD 660.6

RENAN RHONALTY ROCHA

Estudo comparativo sobre a composição química, atividade antibacteriana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de *croton tetradenius baill.* E *c. Pulegiodorus baill.*

Contra isolados de *staphylococcus aureus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Microbiologia Aplicada.

Aprovada em: 20/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Luiz Vieira da Silva Neto (Membro interno)
Universidade Estadual do Vale do Acaraú - UVA

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Membro externo)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Geovany Amorim Gomes (Membro externo)
Universidade Estadual do Vale do Acaraú - UVA

RESUMO

Staphylococcus aureus possui elevada relevância clínica por sua capacidade de desenvolver mecanismos de resistência, assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formas de controle desse micro-organismo. Portanto, por serem fontes de produtos naturais, os óleos essenciais (OEs) são promissores na busca por novos compostos bioativos que podem ser empregados na saúde. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill. (OECT) e *Croton pulegiodorus* Baill. (OECP) contra isolados de *S. aureus* e o efeito sinérgico com antibióticos convencionais. Para tanto, o OECT e OECP foram extraídos por hidrodestilação, sendo a análise quantitativa realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e a análise qualitativa por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC). Foram utilizadas duas cepas padrões (ATCC 700698 e 6538) e quatro isolados clínicos (0A, 4B, 8B e 9B). O perfil de resistência das cepas foi determinado pelo sistema VITEK®2, sendo que a ATCC 700698 e o isolado clínico 0A apresentaram maior perfil de resistência. A atividade antibacteriana dos óleos foi analisada por disco-difusão, microtitulação e pelo ensaio de curva de crescimento. O efeito sinérgico dos OEs com os antibióticos (oxacilina, ampicilina e benzilpenicilina) foi avaliado através do teste de *checkerboard*. A análise estatística foi determinada pela área sob a curva (ASC) do ensaio de curva de crescimento, utilizando teste ANOVA. OECT e OECP apresentaram rendimento 0,47 e 0,37% p/p, respectivamente. Para a espécie *C. tetradenius* Baill. o componente volátil mais prevalente foi o p-cimeno (28,35%), seguido da cânfora (18,29%) e o α -felandrene (8,98%). Já para a espécie *C. pulegiodorus* foi o trans-acetato de crisantenila (27,05%), α -terpineno (19,21%) e o-cimeno (12,27%). O ensaio de disco-difusão mostrou que as bactérias são sensíveis aos agentes testados. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) na presença do OECT foi de 4.000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto para o OECP foi de 8.000 $\mu\text{g/mL}$, exceto para isolado clínico 4B. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) para as cepas tratadas com OECT foi de 8.000 $\mu\text{g/mL}$, com exceção dos isolados 8B e 0A (4.000 $\mu\text{g/mL}$). Para o OECP todas as cepas apresentaram concentração acima de 8.000 $\mu\text{g/mL}$. A análise da curva de crescimento revelou a capacidade do OECT e OECP causar atraso na fase *lag* e reduzir a fase *log* ($p < 0,001$). Os OEs apresentaram sinergismo entre si e com os antibióticos testados, principalmente quando combinado com OXA. Portanto, tanto *C. tetradenius* Baill. quanto *C. pulegiodorus* Baill. apresentaram ação antibacteriana contra cepas de *S. aureus*, mostrando-se promissoras alternativas naturais na terapia clínica, inclusive combinados com antibióticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Resistência. *Croton*. Óleo essencial.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus has high clinical relevance because of its ability to develop resistance mechanisms, so it is necessary to develop new ways of controlling this microorganism. Therefore, because they are sources of natural products, essential oils (OEs) are promising in the search for new bioactive compounds that can be used in health. The objective of this work was to analyze the chemical composition and antibacterial activity of *Croton tetradenius* Baill essential oil. (OECT) and *Croton pulegioidorus* Baill. (OECF) against *S. aureus* isolates and the synergistic effect with conventional antibiotics. For this, the OECT and OECF were extracted by hydrodistillation, being the quantitative analysis performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) and the qualitative analysis by gas chromatography with flame ionization detector (CG-DIC). Two standard strains (ATCC 700698 and 6538) and four clinical isolates (0A, 4B, 8B and 9B) were used. The strains resistance profile was determined by the VITEK®2 system. The antibacterial activity of the oils was analyzed by disc diffusion, microtiter and growth curve assay. The synergistic effect of SOs with antibiotics (oxacillin, ampicillin and benzylpenicillin) was assessed by the checkerboard test. Statistical analysis was determined by the area under the curve (AUC) of the growth curve assay using ANOVA test. OECT and OECF yielded 0.47 and 0.37% w / w, respectively. For the species *C. tetradenius* Baill. The most prevalent volatile component was p-cymene (28.35%), followed by camphor (18.29%) and α -felandrene (8.98%). For the species *C. pulegioidorus* was the trans-chrysanthenyl acetate (27.05%), α -terpinene (19.21%) and o-cimene (12.27%). Among the strains tested, ATCC 700698 and clinical isolate 0A presented higher resistance profile. Disc diffusion assay showed that bacteria are sensitive to the agents tested. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in the presence of the OECT was 4,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, while for the OECF it was 8,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, except for clinical isolate 4B. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for OECT-treated strains was 8,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, except for isolates 8B and 0A (4,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). For OECF all strains presented concentration above 8,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Growth curve analysis revealed the ability of OECT and OECF to delay lag and reduce log phase ($p < 0.001$). The SOs showed synergism with each other and with the antibiotics tested, with emphasis on OXA combinations. Therefore, both *C. tetradenius* Baill. for *C. pulegioidorus* Baill. showed antibacterial action against *S. aureus* strains, showing promise as a natural alternative in clinical therapy, even combined with antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Resistance. *Croton*. Essential oil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

kV	Quilovolt
IK _{Lit.}	Índice de Kovats da literatura
IK _{Calc.}	Índice de Kovats calculado
mA	Miliamperes
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASC	Área Sob a Curva
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Cna	Adesina de colagénio
C1fA	Fator aglutinante A
C1fB	Fator aglutinante B
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comissão de Ética e Pesquisa
CG/DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Matriz expolissacarídica
DO	Densidade ótica
FnBPA	Fibronectina A

FnBPB	Fibronectina B
eV	Elétron-Volt
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracional
LaBAM	Laboratório de Biofilmes e Antimicrobianos
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i>
°C/min	Graus Celsius por minutos
OECT	Óleo essencial de <i>Croton tetradenius</i>
OECP	Óleo essencial de <i>Croton pulegioidorus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos múltiplos de resistência a antibióticos em bactérias.	19
Figura 2	Representação dos mecanismos antibacterianos dos óleos essenciais.	26
Figura 3	Aspecto botânico de <i>C. tetradenius</i> Baill. com detalhes das folhas e inflorescências.	28
Figura 4	Aspecto botânico de <i>C. pulegiodorus</i> Baill. com detalhes das folhas e inflorescências.	29
Figura 5	Fluxograma das análises que serão descritas e realizadas utilizando o OECT e OECP contra cepas de <i>S. aureus</i> .	32
Figura 6	Estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial das folhas frescas de <i>C. tetradenius</i> (a) e <i>C. pulegiodorus</i> (b).	40
Figura 7	Curva do comportamento de crescimento bacteriano (à esquerda) das cepas tratadas com concentrações sub-CIM de OECT e OECP, e gráfico em barras da área sob a curva (à direita), das cepas (a; a') ATCC 6538, (b; b') ATCC 700698, (c; c') 0A, (d; d') 4B, (e; e') 8B, (f; f') 9B.	42
Figura 8	Isobogramas representando o efeito da associação OECT x OECP na inibição do crescimento das cepas a) ATCC 700698 e b) 0A.	44
Figura 9	Isobogramas representando o efeito da associação OECT e OECP com antibióticos da classe das penicilinas na inibição do crescimento das cepas ATCC 700698 e 0A.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química dos óleos essenciais das folhas de <i>C. tetradenius</i> Baill. e <i>C. pulegiodorus</i> Baill.	39
Tabela 2	Valores de diâmetro do halo de inibição, CIM e CBM da ação do OECT e OECP.	41
Tabela 3	Efeito sinérgico do OECT e OECP sobre o crescimento da cepa padrão ATCC 700698 e do isolado clínico 0A de <i>S. aureus</i> .	44
Tabela 4	Efeito modulador do OECT e OECP na atividade antimicrobiana de ATBs de uso clínico sobre o crescimento da cepa padrão ATCC 700698 e do isolado clínico 0A de <i>S. aureus</i>	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Origem das espécies do gênero <i>Croton</i> utilizados neste estudo.	33
Quadro 2	Perfil de resistência à antibióticos obtido pelo sistema VITEK®2.	35

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, força e determinação, além de ter permitido conhecer pessoas que acreditaram em mim.

À minha noiva, Vitória Laurindo por todo apoio, dedicação, paciência e cuidado durante esse processo.

À minha família, por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins.

A todos os meus amigos do mestrado, especialmente aos que contribuíram em todas as etapas da realização desse trabalho, Ramaiana Melo, Mateus Gomes, Águida Maria e Rafaela Cavalcante, Laína Silva e Pedro Henrique.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho da Santa Casa, especialmente aos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho, Camilla Pinho Rodrigues e Antonio Erivelton Passos Fontenele.

Ao professor Dr. Victor Alves Carneiro, pela dedicação na orientação, disponibilidade, incentivo para realizar este e outros trabalhos e amizade.

À Dra. Nágila Carneiro Matos, pela dedicação, paciência, coorientação em todos os períodos da realização desse projeto, disponibilidade e amizade. Muita gratidão.

Ao aluno de iniciação científica Pedro Henrique, por todo apoio operacional e ajuda.

Ao professor Dr. Geovany Amorim Gomes pela parceria através do Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica (LPNSO), da Universidade Estadual do Vale do Acaraú - UVA, professora Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues através do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria (LACRE), Dr.

Edy Sousa de Brito por meio do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais – EMBRAPA, orientação e amizade.

A todos que integram o Laboratório de Biofilme e Antimicrobianos (LaBAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela disponibilidade dos equipamentos, contribuições com a pesquisa e amizade.

A todos que integram o Núcleo de Bioprospeção e Experimentação Molecular Aplicada (Nubem) do Centro Universitário INTA (UNINTA) pela disponibilidade dos equipamentos, contribuições com a pesquisa e amizade.

À equipe do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Sobral pela disponibilidade das cepas bacterianas de *S. aureus*, em especial a Ma. Izabelly Linhares e Nádia Carvalho.

A todos os professores que contribuíram positivamente para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro (CAPES).

À coordenação do Mestrado pela organização do curso, em especial a Assistente Delane Silveira por toda dedicação, ajuda e apoio.

Ao Universidade Federal do Ceará (UFC) que forneceu estrutura adequada durante o período acadêmico.

“Apenas quando somos instruídos pela realidade é que podemos muda-la.”

BERTOLT BRECHT

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Resistência antimicrobiana	19
2.2	Infecções nosocomiais	20
2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.4	Potencial biotecnológico de plantas medicinais	23
2.4.1	<i>Atividade antimicrobiana de plantas medicinais</i>	25
2.4.2	Gênero <i>Croton</i>	28
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Desenho experimental	33
4.2	Aspectos éticos	33
4.3	Material botânico	34
4.4	Extração de óleos essenciais	34
4.5	Análise dos óleos essenciais	35
4.6	Óleos essenciais e antibióticos	36
4.7	Cepas bacterianas	36
4.8	Condições de ajuste e cultivo bacteriano	37
4.9	Atividade antimicrobiana	37
4.9.1	<i>Disco-difusão</i>	37
4.9.2	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)</i>	37
4.9.3	<i>Curva de crescimento</i>	38
4.9.4	<i>Ensaio de checkerboard</i>	38
4.10	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Composição química do óleo essencial de <i>Croton tetradenius</i> Baill. e <i>Croton pulegioidorus</i> Baill.	40
5.3	Atividade antimicrobiana	41

5.4	Curva de crescimento	42
5.5	Atividade sinérgica	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	68
	APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta, os antibióticos vêm sendo amplamente utilizados como arsenal terapêutico contra infecções bacterianas. No entanto, seu uso indiscriminado levou ao rápido surgimento de cepas cada vez mais resistentes (KIM et al., 2018; FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Estudos atuais indicam que lista de bactérias resistentes aos antibióticos inclui *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e à vancomicina (LEE et al., 2018), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, entre outros (KIM et al., 2018; ROCHA et al., 2019).

Essa resistência se caracteriza por mecanismos nos quais as bactérias diminuem ou neutralizam a ação dos agentes antibacterianos, podendo ser de forma natural ou adquirida (KOHL; PONTAROLO; PEDRASSANI, 2016). Em se tratando de saúde pública, a resistência bacteriana representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço no desenvolvimento de medicamentos e da medicina, além de intensificar outro problema de saúde pública de grande relevância atualmente que são as infecções hospitalares (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

Dessa forma, *Staphylococcus aureus* se apresenta como um dos principais causadores de infecções em ambientes hospitalares e de assistência à saúde (COREY et al., 2015). Sua transmissão ocorre, principalmente, por contato direto (quase sempre pelas mãos) ou indireto (por meio de superfícies contaminadas) (DAVIS et al., 2012), além disso, este patógeno está bem adaptado ao hospedeiro humano e à ambientes de cuidados de saúde (TAHERIKALANI et al., 2016). Sendo assim, este micro-organismo é tanto um comensal frequente como uma das principais causas de endocardite, osteomielite, bacteremia entre outras infecções (MAHMOUDI et al., 2015). Uma característica importante do *S. aureus* é a capacidade de aquisição de mecanismos de resistência aos antibióticos, tornando assim indispensável à busca por novas substâncias que anulem essa importante característica apresentada por micro-organismos (HARBARTH et al., 2015).

Óleos essenciais vegetais podem ser uma excelente alternativa ao combate a micro-organismos, pois são fonte de extensa diversidade molecular com diferentes mecanismos antimicrobianos. Assim sendo, a procura por propriedades antimicrobianas em óleos essenciais de plantas tem se intensificado (YAP et al.,

2014). Óleos essenciais vem se mostrando muito promissores individualmente e em combinação com antibióticos clínicos na eliminação de bactérias resistentes a múltiplos fármacos, tornando-se alvos de importantes estudos voltados para melhorar a qualidade e expectativa de vida da população (MELO et al., 2019).

O gênero *Croton* constitui cerca de 700 espécies, seus óleos essenciais são ricos em monoterpenos e possui propriedades antifúngicas, antibacterianas e antibiofilme comprovadas (MEDEIROS et al., 2017; NADER et al., 2018; MIRANDA et al., 2019; ALMEIDA-PEREIRA et al., 2019). Duas espécies se destacam por serem endêmicas da região Nordeste do Brasil, assim *Croton tetradenius* e *C. pulegioidorus* podem ser encontrados na Caatinga nos estados do Ceará, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Bahia e Sergipe (CARNEIRO-TORRES, 2009).

Considerando as potencialidades antimicrobianas dos óleos essenciais do gênero *Croton*, resolveu-se realizar a caracterização química, avaliação da atividade antibacteriana e efeito sinérgico com antibióticos dos óleos de folhas de *C. tetradenius* e *C. pulegioidorus* sobre isolados clínicos de *S. aureus*. Dessa forma, buscou-se contribuir para ampliar o conhecimento das atividades farmacológicas do gênero *Croton* e para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra infecções bacterianas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resistência bacteriana

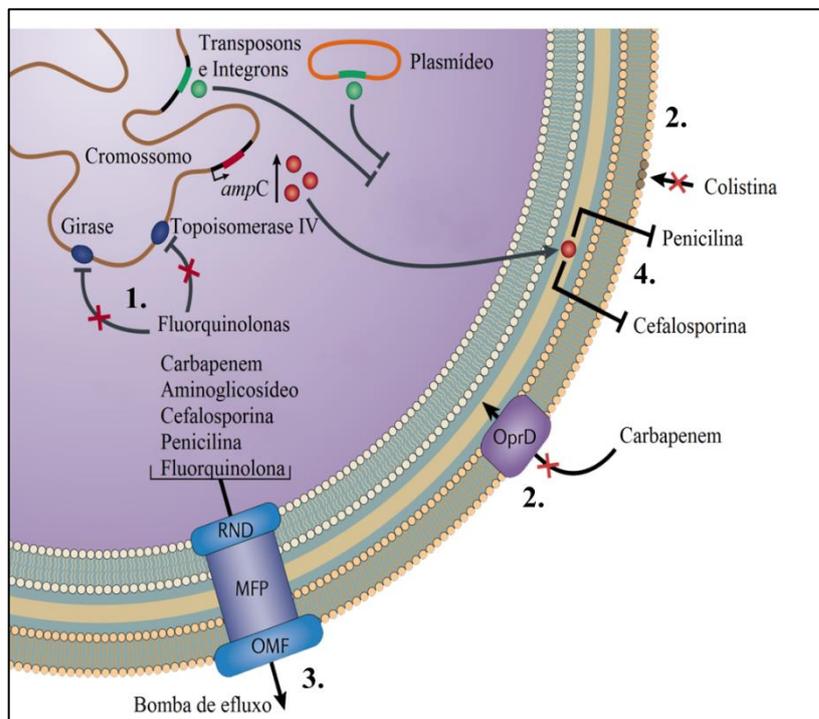
Algumas bactérias desenvolveram mecanismos que as tornaram resistentes a muitos antimicrobianos utilizados na terapêutica clínica, sendo eles: 1) alteração do sítio alvo que surgem após mutações nos genes que codifica a conformação de receptores, tornando-se resistente ao antibiótico por substituir o alvo original, mas preservando sua função celular; 2) alteração da permeabilidade da membrana externa em bactérias em Gram-negativas que ocorre com restrição de entrada das moléculas hidrofílicas, podendo haver a perda de porinas funcionais com a finalidade de resistência; 3) bombas de efluxo que é um mecanismo utilizado pelas bactérias para expulsar da célula substâncias tóxicas, inclusive múltiplos antibióticos; e, 4) inativação enzimática que é a degradação de antibióticos através de enzimas. Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos é a produção de enzimas, entre elas, as betalactamases. Nestas, a inativação enzimática do fármaco ocorre com a produção de enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo, assim, que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (figura 1) (ALVES; BEHAR 2013; BAPTISTA, 2013; RUPPÉ; WORTHER; BARBIER, 2015).

Outro ponto importante é a capacidade de alguns micro-organismos de formar aglomerados celulares tridimensionais conhecidos como biofilmes. Estes aglomerados são formados por células bacterianas intimamente associadas. Eles foram descobertos inicialmente em pacientes com infecções microbianas de difícil tratamento. Podem se formar em um ou em vários dispositivos médicos, como cateteres urinários, cateteres venosos centrais, cateteres intravenosos e lentes de contato (SALVARCI; KOROGLU; GURPINAR, 2015; MASKARINEC et al., 2017; PATEL et al., 2018; YINA et al., 2018).

Os biofilmes apresentam um risco crescente de infecções que se associam aos cuidados de saúde (PERCIVAL et al., 2015; ROSENTHAL et al., 2016). Formar biofilmes é uma estratégia utilizada pelos micro-organismos para sobreviverem sob condições desfavoráveis (MORADALI et al., 2017). Assim, as bactérias possuem uma resistência até mil vezes aos antibióticos do que as células planctônicas do

mesmo organismo (OHADIAN; POURMAND; AMINHARATI, 2014; SPEZIALE et al., 2014).

Figura 1- Mecanismos múltiplos de resistência a antibióticos em bactérias.



Fonte: Adaptado de Hauser e Ozer, (2011).

Os principais micro-organismos multirresistentes isolados no ambiente dos serviços hospitalares são *S. aureus* resistente a oxacilina, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos; *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina e enterobactérias produtoras de carbapenemases e beta-lactamase de espectro ampliado (BRASIL, 2015; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MELO et al., 2019). Estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças indicam que um em cada quatro infecções nosocomiais são atribuídas a uma dessas bactérias (CDC, 2016).

2.2 Infecções nosocomiais

O Ministério da Saúde associa as definições de infecções hospitalares como sendo aquelas adquiridas durante um procedimento assistencial ou durante o período de internamento, que não estava presente no momento da admissão do paciente em ambiente hospitalar (BRASIL, 1997). As infecções hospitalares dificultam e agravam a situação dos pacientes enfermos, podendo levar à sepse ou

morte (CDC, 2016). As infecções que ocorrem, geralmente, são após procedimento cirúrgico e em uso de dispositivos invasivos (cateteres), por esse motivo são alvos prioritários das medidas de prevenção e controle das infecções. As principais síndromes clínicas relatadas são as infecções da corrente sanguínea, associada ao cateter vascular central, infecção de sítio cirúrgico e pneumonia associada a ventilação mecânica e infecção do trato urinário associada ao cateter vesical de demora (BRASIL, 2013; MARSCHALL, 2014).

Portanto, infecções bacterianas adquiridas nos serviços de saúde estão entre as principais causas de morte e aumento da morbimortalidade entre pacientes hospitalizados no mundo inteiro (UPRETI et al., 2018). Ao se tratar as origens etiológicas das infecções nosocomiais, entende-se que 70% dos patógenos envolvidos nelas são de origem endógena, ou seja, são micro-organismos originários da própria microbiota do indivíduo (MENDES et al., 2016). Do ponto de vista epidemiológico geral, os cocos Gram-positivos, são os mais frequentemente isolados nas infecções adquiridas em internações hospitalares (DANTAS, 2015). Desse grupo, *S. aureus* são, atualmente, reconhecidos como um grande problema em hospitais em todo o mundo, principalmente quando associados à multirresistência ou formando biofilmes, por reduzirem as opções terapêuticas (BRASIL, 2015; POORABBAS et al., 2015).

O isolamento destes micro-organismos sempre associados a amostras clínicas de pacientes doentes mostrou seu potencial patogênico. Os surtos de infecções nosocomiais, emergente resistência antimicrobiana e complexidade epidemiológica fizeram deles notáveis organismos (BENACHINMARDI et al., 2014). Além disso, é o patógeno com o maior índice de mortalidade, além de possuírem ampla distribuição ambiental e uma boa capacidade de se manterem viáveis em diversos ambientes, sobrevivendo por longos períodos em superfícies e possuindo necessidades nutricionais mínimas com grande tolerância às variações ambientais (CARDOSO; REIS, 2016).

2.3 *Staphylococcus aureus*

Trata-se de uma bactéria Gram-positiva, não esporulada, em forma de coco e que mede aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. Seu gênero possui 52 espécies, sendo este patógeno o mais importante na clínica (LIMA et al., 2015).

Podem apresentar diversos tipos de arranjos celulares, que vão desde isolados ou pares, em cadeias curtas, ou agrupados de forma irregular (com aspecto de cacho de uvas), devido a irregularidade dos planos de divisão celular (ACOSTA et al., 2017; LEE et al., 2018). Este micro-organismo possui a capacidade de produzir vários fatores de virulência que promovem adesão aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, danificando suas células e protegendo a bactéria do sistema imunológico (ARANTES et al., 2013; LOFFLER et al., 2014; STAPELS et al., 2014; ACOSTA et al., 2017). Revestindo a camada mais exterior da célula, estas bactérias contam, com uma cápsula de polissacarídeos. Esta cápsula é capaz de inibir a fagocitose bacteriana ao encobrir as opsoninas, aumentando, desta forma, a virulência e a capacidade de invasão dos tecidos. Além disso, a superfície externa da maioria das cepas de *S. aureus* possui o fator de coagulação, coagulase ligada, convertendo para fibrina solúvel, o fibrinogênio, que após se ligar ao mesmo, torna-se um importante fator de virulência. A sua detecção é utilizada para identificação desta espécie (CATÃO et al., 2012; SANTANA et al., 2012; HANZELMANN et al., 2016; LEE et al., 2018).

A parede celular de *S. aureus* possui constituintes capazes de induzir a resposta imunológica do hospedeiro, como o ácido teicoico que ativa a via alternativa do complemento e estimula a produção de citocinas. O peptídeoglicano que atua como agente quimiotático para leucócitos, interleucina-1 é o elo entre a resposta imune e inflamatória, e as opsoninas facilitam a fagocitose (SOUSA et al., 2016; THOMER; SCHNEEWIND; MISSIAKAS, 2016). É a partir destas características que possibilitam ao *S. aureus*, invadir o hospedeiro, escapar de suas defesas, se instalarem e multiplicar, levando assim ao aparecimento das doenças. Sua patogenicidade é devida aos fatores de virulência que contribuem de forma efetiva para a colonização bacteriana nos focos de infecção (SPAAN et al., 2013; SPAULDING et al., 2013; FOSTER et al., 2014; VANHOMMERIG et al., 2014; LEE et al., 2018).

Outro fator de grande importância é a extrema capacidade de resistência desse micro-organismo a antimicrobianos. Cepas MRSA surgiram por volta dos anos 60 e se disseminaram nos anos 80. Nos últimos 20 anos, MRSA foi identificado como um dos patógenos com maior frequência no mundo, além de ter se tornado um dos maiores problemas no ambiente hospitalar da atualidade. Bacteremias causadas por esse micro-organismo, estão frequentemente associadas a um

prognóstico ruim, incluindo mortalidade em até 30 dias entre 20 a 40% dos casos (LE; OTTO 2015; LEE et al., 2018).

As cepas de MRSA produzem uma proteína alterada de ligação à penicilina que diminui a afinidade pela maioria das penicilinas semissintéticas. Essa proteína é codificada por um gene adquirido, o *mecA*, transportado em um elemento genético móvel designado por estafilococos cromossomo cassete mec. Portanto, o surgimento de cepas MRSA se deve à aquisição e inserção desses elementos genéticos nos cromossomos de cepas suscetíveis (KÖCK et al., 2010; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; LEE et al., 2018).

Essa aquisição da resistência antimicrobiana apresentou um desafio ao mundo médico em termos de tratamento e controle de infecções estafilocócicas, pois na maioria dos casos, o MRSA é responsável por pelo menos 25 a 50% das infecções por *S. aureus* em ambiente hospitalar. Devido a isso, como último recurso, a vancomicina tem sido historicamente a droga de escolha para o tratamento de infecções graves por MRSA, fornecendo cobertura empírica e terapia definitiva. Contudo, seu uso se tornou questionável, por se tratar de um agente antiestafilocócico menos eficaz que o grupo das penicilinas. Além disso, seu uso elevado já levou ao aparecimento de novas cepas resistentes em certas partes do mundo (LUNA et al., 2010; KONG; JOHNSON; JABRA-RIZK, 2016; LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Portanto, tratar pacientes com infecções por MRSA constitui um sério problema devido ao número restrito de antimicrobianos disponíveis. Desta maneira, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas com capacidade para tratar tais infecções, além de conhecer os padrões de resistência de *S. aureus* em bacteremias para uma adequada prescrição de antimicrobianos e prevenção de eventos que possam culminar na resistência bacteriana (HANZELMANN et al., 2016).

2.4 Potencial biotecnológico de plantas medicinais

O número de novos antibióticos no mercado decaiu significativamente nos últimos anos (BUCHY et al., 2020). Nos Estados Unidos, existem alguns patógenos que carecem de novos fármacos para combatê-los, como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa e espécies de *Enterobacter* (RICE, 2008). A realidade brasileira não está muito distante, como observa-se nos estudos de Neves et al. (2011), Zanol, Picoli e Morsch (2010), Figueiredo et al. (2009), que relatam o surgimento de diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos criando, nesse cenário, a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para atuarem em tais mecanismos.

Em vista disso, entende-se que há uma necessidade da descoberta de novos fármacos com ação antimicrobiana de amplo espectro, para auxiliar no tratamento de infecções relacionadas a assistência a saúde. O Brasil possui o que estudiosos chamam de megadiversidade, possuindo, aproximadamente, 120.000 espécies vegetais (PAGANO; MARIA, 2010). Diante desse contexto, surge a necessidade de realizar investigações científicas voltadas para a determinação do potencial antimicrobiano das plantas medicinais.

Os vegetais são os organismos que mais colaboram para a descoberta de fármacos, deles podem ser extraídos muitas substâncias orgânicas ativas. O termo planta medicinal faz referência a qualquer ser vivo do reino *Plantae* que pode agir como medicamento (MELO, 2011). Desta forma, partes das plantas como raiz, caule e folha possuem substâncias ativas que poderão ser empregadas no desenvolvimento de medicamentos (ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012).

Desde tempos antigos, a raça humana procura na natureza alternativas que eleve sua qualidade de vida para, assim, aumentar suas perspectivas de sobrevivência e melhoria de sua saúde. O conhecimento sobre as plantas medicinais sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos (LOPES et al., 2010). Dessa maneira, estudos demonstram que há mais de 3.000 anos as plantas eram utilizadas para fins medicinais e que, 2.000 anos antes do aparecimento dos médicos gregos, existia propriedades na medicina egípcia organizada o hábito de recorrer às qualidades curativas de certas ervas. Foi uma das primeiras manifestações do homem para compreender e usar a natureza (LUSTOSA, 2012).

No Brasil, a utilização de ervas medicinais vem da miscigenação das culturas africana, europeia e indígena (MELO, 2011). Porém, para que se tenha o uso seguro destas plantas é necessário conhecer sua composição química e realizar uma avaliação científica sobre suas qualidades farmacológicas. Entretanto, deve ser

reconhecida a importância do conhecimento empírico, ou popular, para dar início à investigação científica (FARIA, 2012).

2.4.1 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

A maior parte dos antibióticos naturais usados na prática médica originou-se de fungos que pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium*, e de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Micromonospora* e *Streptomyces*. Os fármacos antimicrobianos de origem semissintética utilizados resultam de compostos como penicilina, cefalosporina, tetraciclina e eritromicina (WRIGHT et al., 2007). Entretanto, as plantas podem contribuir no desenvolvimento de novos antibióticos no momento em que se torna possível que seus metabólitos secundários com atividade antimicrobiana sejam biossintetizados para prevenir ou combater a ação de micro-organismos patogênicos (FARIA, 2012).

A maioria das plantas possui compostos que são antimicrobianos e as protegem contra micro-organismos invasores. Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenoides, alcalóides, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoides), taninos e cumarinas (LANGEVELD, et al., 2014; NAZARRO et al., 2013; SWAMY et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), produtos à base de plantas são usados por 80% da população mundial, especialmente em áreas rurais ou em lugares de difícil acesso à medicamentos (TADEG; MOHAMMED; GEBRE-MARIAN, 2005). Em países desenvolvidos, a medicina alternativa é utilizada com frequência juntamente com a medicina convencional (LEITE, 2008).

O Brasil detém a maior biodiversidade de plantas em todo o mundo e estima-se que possua mais de 20% do total de espécies do planeta. Esta rica biodiversidade é seguida por uma grande aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Hoje, aproximadamente 48% das drogas são desenvolvidas, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais que são uma importante fonte para obtenção de medicamentos (CARVALHO et al., 2014).

Alguns trabalhos confirmam a atividade antimicrobiana de extratos de plantas da flora pertencentes ao Nordeste brasileiro. Assim, pode-se citar a *Bauhinia*

ungulata (SILVA, 2014), *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* (FURTADO et al., 2015), *Cytopogon citratus* (EWANSIHA et al., 2012), *Aloe vera* (ABAKAR; BAKHIET; ABADI, 2017), *Guazuma ulmifolia*, *Hymenaea courbaril*, (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (FERNANDO et al., 2014), *Bauhinia cheilantha* (PEREIRA et al., 2014), *Maytenus rigida* (SANTOS et al., 2011), *Pithecellobium cochliacarpum* (SOARES et al., 2010; LIMA et al., 2014), *Plumbago scandens* (THARMARAJ; ANTONYSAMY, 2015), *Ximenia americana* (ALI, SAEED, KHALID, 2016).

Além disso, a literatura registra diversos estudos das propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de plantas que podem ser definidos como produto obtido de uma matéria-prima vegetal, por destilação a vapor sendo uma mistura volátil de diversos constituintes químicos com diferentes formas moleculares e mecanismos de ação (DHIFI et al., 2016; NAEEM et al. 2018). Nikolić et al. (2014), avaliaram a composição química, antimicrobiana e propriedades citotóxicas do óleo essencial de cinco plantas da família Lamiaceae e obtendo valores de CIM promissores com o óleo de *Satureja montana* para *Pseudomonas aeruginosa* ($23,33 \pm 5,77 \mu\text{g/mL}$), *Streptococcus mutans* ($60,00 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) e *Streptococcus sanguis* ($23,00 \pm 7,64 \mu\text{g/mL}$). No referido óleo foram identificados como componentes majoritários o timol (44,6%) e o p-cimeno (13,4%) os quais proporcionaram a este óleo ação promissora contra os micro-organismos testados.

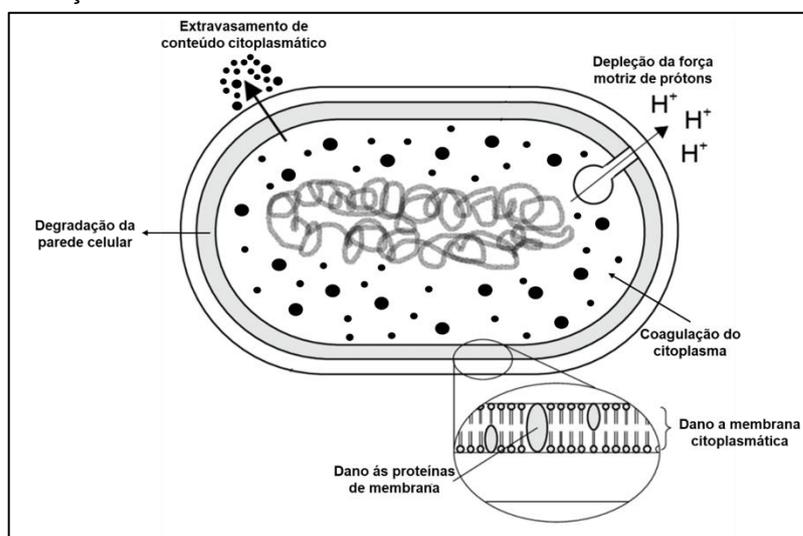
Bajera et al. (2017), descreveram a composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Epilobium parviflorum* Scherb, contra cinco micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) usando o método de microdiluição. O óleo essencial de *E. parviflorum* apresentou como componentes majoritários o ácido plamítico (30,7%), o ácido linoléico (12,5%) e o α -ácido linolênico (10,8%). O óleo essencial inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas, apresentando CIM em torno de 10 -40 $\mu\text{g/mL}$, e para leveduras foi de 5 mg/mL .

Conforme descrito, óleos essenciais contêm diversos constituintes químicos com propriedades antimicrobianas. Esses componentes são sintetizados para proteger as plantas da invasão de patógenos. As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais dependem principalmente da quantidade e tipos de metabólitos secundários produzidos. Esses componentes são secretados por meio de uma série de interações moleculares sob condições específicas de estresse abiótico/biótico

(SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). Cada composto é capaz de exibir um mecanismo de ação diferente contra micro-organismos (SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013; NAZZARO et al., 2013).

A literatura apresenta vários mecanismos de ação de óleos essenciais e de seus constituintes. Esses compostos possuem a capacidade de desorganizar a arquitetura celular, levando à quebra da integridade da membrana, aumentando a permeabilidade e interrompendo algumas atividades celulares. Desta forma, a degradação da parede celular e a ruptura de sua membrana pode interferir em vários processos vitais devido a destruição de proteínas, à coagulação ou extravasamento de produtos citoplasmáticos, potenciais de membrana reduzidos, a interrupção das bombas de prótons e a depleção de adenosina trifosfato (ATP) (figura 2) (DE MARTINO et al., 2009; MILLEZI et al., 2012; SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013; NAZZARO et al., 2013; ARJIN; TAPINGKAE, 2014; OZ et al., 2015; SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; ALENCAR FILHO et al., 2017).

Figura 2 - Representação dos mecanismos antibacterianos dos óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Arjin e Tapingkae (2014).

Outra possibilidade para o uso de plantas medicinais no combate a micro-organismos é a combinação terapêutica sinérgica. De acordo com Chandra e Rakholiya (2011), o tratamento combinado de produtos naturais de plantas medicinais com antibióticos pode ampliar o espectro antimicrobiano, evitando o aparecimento de resistência mutante e diminuindo a toxicidade.

O sinergismo entre óleos essenciais e antibióticos disponíveis vem se mostrando como uma alternativa promissora, uma vez que seu efeito aumenta a

atividade antibacteriana frente à micro-organismos sensíveis ou resistentes. Portanto, a potencialização do efeito combinado dessas drogas é utilizada como estratégia na terapêutica de infecções, permitindo o uso de drogas antibacterianas quando esta isoladamente não se mostra eficaz sobre cepas bacterianas (KUMAR et al., 2009; LANGEVELD, et al., 2014).

2.4.2 Gênero *Croton*

O segundo gênero mais extenso de Euphorbiaceae, *Croton* possui aproximadamente 1250 espécies conhecidas, onde 68 espécies podem ser encontradas no bioma brasileiro da Caatinga (SILVA et al., 2010; COSTA FILHO et al., 2012; CORDEIRO et al., 2015). Este gênero possui um perfil químico diverso com metabólitos secundários que incluem terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenóides), esteróides, alcalóides e outros compostos fenólicos, além de potencial econômico significativo, tornando-o uma fonte potencial de estudos sobre compostos naturais bioativos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; DÓRIA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; XU; LIU; LIANG, 2018).

Devido a sua importância, diversos estudos têm avaliado a atividade antibacteriana do gênero *Croton* em todo o mundo (VUNDA et al., 2012; AZEVEDO et al., 2012; CUI-PING et al., 2014; VOUKENG; BENG; KUETE, 20016; LEITE et al., 2017; XU; LIU; LIANG, 2018; FIROMSA et al., 2018).

Desta forma, suas espécies são conhecidas por apresentar atividades inseticida, larvicida, antimalárica, antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-helmíntica, moluscicida, antiinflamatória e antineoplásica comprovadas. Além disso, as espécies de *Croton* são popularmente usadas para tratar distúrbios digestivos, vermes intestinais, diabetes, hipercolesterolemia, malária, inflamação, febre e dor (DORIA et al., 2010; LOPES et al., 2012; RAMOS et al., 2013; COELHO-DE-SOUZA et al., 2013; OBEY et al., 2016; CARVALHO et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017; ALENCAR FILHO et al., 2017; NIJOYA; ELOFF; MCGAW 2018; XU; LIU; LIANG, 2018).

Várias espécies desse gênero se tornaram alvos de estudos por apresentarem elevado potencial para produtos biotecnológicos com ação antibacteriana (PALMEIRA et al., 2006). Nesse contexto, Alencar-Filho et al. (2017), avaliaram a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de

folhas de *Croton heliotropiifolius* em diferentes estações do ano. Nesse estudo, o óleo apresentou como componentes majoritários o β -cariofileno (41 – 47%) e biciclogermacreno (8 – 22%), além de revelar acentuada ação contra diversas cepas testadas, inclusive *S. aureus*.

Em outro estudo, onde determinou-se a composição química e a atividade antibacteriana do óleo essencial de folhas de *C. rhamnifolioides* Pax & Hoffm, verificou-se que o óleo essencial apresentou elevada concentração de 1,8-cineol (46.32%), demonstrando atividade em baixas concentrações inibitórias e bactericidas mínimas contra bactérias Gram positivas e negativas (COSTA et al., 2013).

Dessa maneira, dentre as espécies de *Croton*, *C. tetradenius* Baill, conhecida popularmente por “catinga-de-bode”, “velaminho”, barba-de-bode”, “velame-do-campo” e “velame manso”, é um arbusto pequeno, com folhas delicadas e um aroma mentolado bem acentuado (Figura 3). Geralmente encontrada em florestas perenifólias sobre solo arenoso ou pedregoso da região Nordeste do Brasil, sendo muito popular no Ceará. Essa espécie apresenta menor incidência em áreas de vegetação secundária, pântanos de altitude e áreas antropizadas (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009; LUCENA; AMORIM; ALVES, 2009; CARVALHO et al., 2016; FERNANDES, 2016; ALMEIDA-PEREIRA et al., 2017).

Figura 3 - Aspecto botânico de *C. tetradenius* Baill. com detalhes das folhas e inflorescências.



Fonte: Próprio autor.

Essa espécie possui de quatro a seis nectários cilíndricos no pecíolo, sendo a característica mais utilizada no seu reconhecimento. Seus frutos são observados nos meses de fevereiro e maio, enquanto que suas flores em fevereiro, março, maio e setembro (LUCENA; AMORIM; ALVES, 2009).

Óleo essencial de folhas de *C. tetradenius* Baill. tem sido alvo de estudos por apresentar efeito inseticida sobre larvas e insetos adultos *Aedes aegypti*, demonstrando um potencial para aplicação do bioproduto. Além disso, identificou-se no óleo essencial constituintes majoritários pertencentes as classes monoterpenos como cânfora (24,49%), γ -terpineol (15,06%) e α -terpineno (6,48%) indicando ação larvicida (CARVALHO et al., 2016).

A ação antibacteriana de dois genótipos da espécie *C. tetradenius* foi determinada, recentemente, por Almeida-Pereira et al. (2019), o óleo essencial mostrou ser rico em cânfora (17%), p-cimeno (7,1%), transpinocarveol (13,61%), 1,8-cineol (12,9%), trans-ascaridol (11,65%), pinocarvona (8,8%), apresentando resultados promissores contra *S. aureus*. Contudo, sua composição química e atividades biológicas precisam ser melhor elucidadas, pois ainda existem poucos trabalhos na literatura sobre esta espécie.

Outra espécie do gênero *Croton*, é a *C. pulegioidorus* Baill. É popularmente conhecida por velame-rasteiro e velaminho, podendo ser encontrada no Nordeste brasileiro e se apresenta como subarbusto, tendo entre 0,3 – 1,0 metros de altura (figura 4). Exala um odor característico devido a presença de ácido caprílico ou octanoico que possui características bactericida e antifúngica (SILVA, 2006; KIM; RHEE, 2016).

Figura 4 - Aspecto botânico de *C. pulegiodorus* Baill. com detalhes das folhas e inflorescências.



Fonte: TORRES (2008).

A literatura relata diversos efeitos biológicos para o óleo essencial de *C. pulegiodorus*. Nesse sentido, de acordo com Silva (2006), o óleo essencial de *C. pulegiodorus* é constituído majoritariamente por p-cimeno (22,3%), ascaridol (17%) e cânfora (13%) lhe conferindo ação inseticida sobre larvas do *A. aegypt* (TORRES, 2008; MAGALHÃES et al., 2015). Dória et al. (2010), avaliando a atividade larvicida de duas espécies de *Croton* do Nordeste brasileiro contra *A. aegypti*, verificou que o óleo essencial de *C. pulegiodorus*, é rico em β -cariofileno (20,9%), biciclogermacrene (16,8%) e germacrene-D (10,5%), e possuía ação tóxica para as larvas testadas.

Em estudo recente, avaliando a ação carrapaticida do óleo essencial de folhas de duas espécies de *Croton*, *C. pulegiodorus* apresentou os melhores resultados contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus. microplus*. com composição rica em p-cimeno (23,13%) e ascaridol (22,5%) (CASTRO et al., 2019).

Portanto, pouco se sabe sobre a ação antimicrobiana dessas espécies, contudo por apresentarem componentes químicos secundários semelhantes e com potencial efeito contra micro-organismos, surge o interesse em realizar um estudo comparativo sobre a composição química, atividade antibacteriana e efeito sinérgico de seus óleos essenciais contra cepas de *S. aureus* multirresistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a composição química, a atividade antibacteriana e o sinergismo com antibióticos convencionais dos óleos essenciais obtidos de *C. tetradenius* Baill. (OECT) e *C. pulegiodorus* Baill. (OECF) contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos específicos

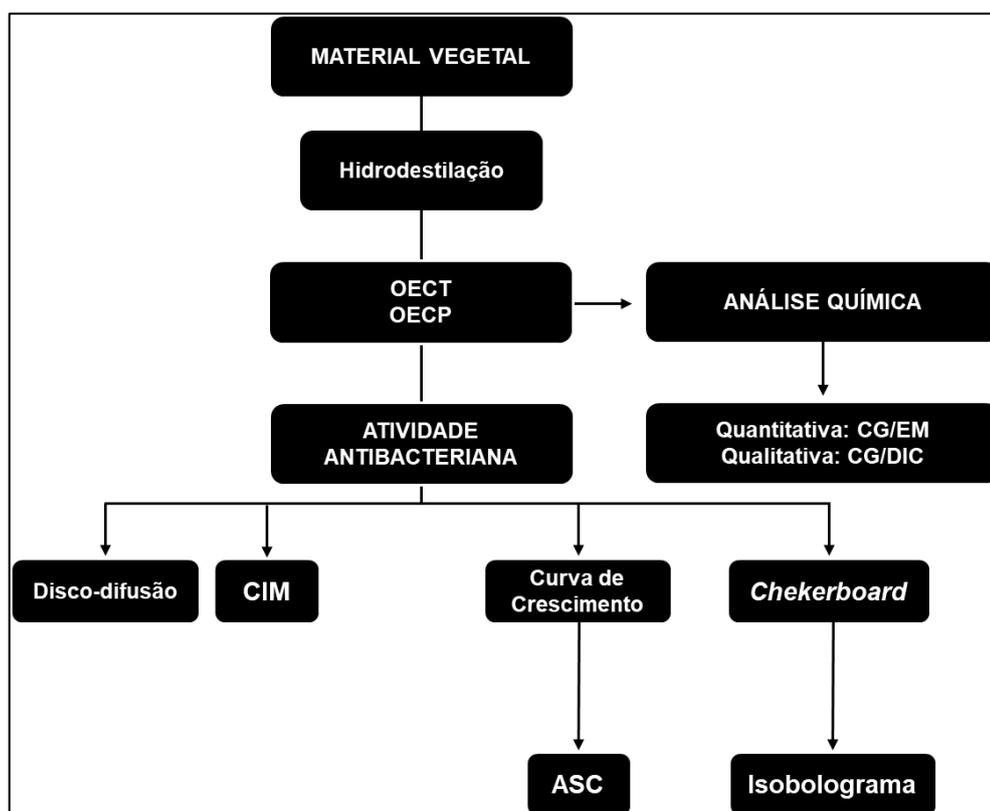
- Determinar a composição química do OECT e OECF;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do OECT e OECF por disco-difusão e microdiluição (determinação da concentração inibitória e bactericida mínima – CIM/CBM) contra isolados clínicos de *S. aureus*;
- Delinear a cinética de crescimento das cepas de *S. aureus* quando submetidos a concentrações sub-CIM do OECT e OECF;
- Determinar atividade sinérgica entre o OECT e OECF com antibióticos convencionais contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho experimental

Na figura 5 é apresentado um fluxograma simplificado das principais etapas desenvolvidas nesse estudo, desde a obtenção do OECT e OECP a sua utilização em análises microbiológicas.

Figura 5 - Fluxograma das análises que serão descritas e realizadas utilizando o OECT e OECP contra cepas de *S. aureus*.



CG/EM: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa; CG/DIC: Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas; CIM: Concentração Inibitória Mínima; ASC: Área Sob a Curva. Fonte: Próprio autor.

4.2 Aspectos éticos

A coleta de dados e procedimentos experimentais utilizando isolados clínicos de material humano seguiu a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, garantindo a confidencialidade e privacidade, proteção

de imagem e não estigmatização dos participantes da pesquisa (BRASIL, 2012). Assim, o projeto foi aprovado e obteve o número de registro (CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) do Comitê de Ética e Pesquisa da instituição proponente, o Centro Universitário INTA, Brasil (CAAE: 00749318.0.0000.8133), e da instituição coparticipante, a Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Brasil (CAAE: 00749318.0.3001.8109), sob número de aprovação, Nº 3.147.399 e Nº 3.242.030, respectivamente. Os documentos utilizados para cadastro na plataforma estão listados nos anexos (A, B e C) e apêndices (A, B e C).

4.3 Material botânico

Foram utilizadas as espécies de *Croton tetradenius* Baill. e *C. pulegiodorus* Baill colhidas no estado do Ceará – Brasil, conforme o quadro 1. Os espécimes foram depositados no Herbário da Universidade Estadual do Vale do Acaraú – HUVA.

Quadro 1 - Origem das espécies do gênero *Croton* utilizados neste estudo.

Espécie	Localidade	Coordenadas	Nº exsicata depositada no herbário UVA*
<i>Croton tetradenius</i> Baill. (Velame manso)	Cocalzinho – Distrito de Viçosa/CE	3°33'44.0"S 41°05'31.9"W	21629
<i>Croton pulegiodorus</i> Baill. (Velame rasteiro)	Sítio Bela Vista - Groaíras/CE	3°57'56.4"S 40°23'33.2"W	21374

Fonte: Próprio autor. *Universidade Estadual do Vale do Acaraú.

4.4 Extração de óleos essenciais

A obtenção dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica (LPNSO), do curso de química da UVA. Folhas frescas das duas espécies foram cortadas em pequenos pedaços, misturadas com 2,5 L de água destilada e submetidas, separadamente, a hidrodestilação utilizando aparato tipo Cleavenger (EHLERT et al., 2006; SILVA et al., 2015). A hidrodestilação foi realizada por aproximadamente 2:30 horas para cada planta. Foi utilizado um total de 1120 g de folhas de *C. tetradenius* e 2100 g para *C. pulegiodorus*. Os óleos

essenciais foram separados dos hidrolatos, tratados com sulfato de sódio anidro e armazenados a 4°C. O cálculo do rendimento dos óleos essenciais foi realizado segundo a equação: $Rendimento (\%) = (\text{peso do óleo} / \text{peso das folhas frescas}) \times 100$.

4.5 Análise dos óleos essenciais

A identificação dos compostos voláteis do OECT e OECP foi obtida utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para análise qualitativa e cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC) para análise quantitativa (ANEXOS F e G). A análise qualitativa foi feita em um instrumento Shimadzu modelo GC-2010 (quádruplo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna RTX-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 µm, Restek), modo de injeção com divisão de fluxo 1:100, gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL/min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência de 250 °C e fonte de íons a 230 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C/min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). Já a análise quantitativa foi realizada em equipamento Shimadzu modelo CG-2010 Plus, com coluna RTX-5 metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador nitrogênio com fluxo 1,00 mL/min⁻¹, com a temperatura do injetor a 250°C e temperatura do detector a 280°C. A programação do forno cromatográfico foi similar à usada nas análises realizadas em CG/EM.

A percentagem dos constituintes foi calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionadas com a área total de todos os constituintes da amostra. Os diversos constituintes dos óleos essenciais foram identificados através da comparação visual de seus espectros de massas com aqueles existentes na literatura, espectros fornecidos pelo banco de dados (NIST11) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles existentes na literatura (ADAMS, 2009). Uma solução padrão de n-alcenos (C7-C30) foi injetada nas mesmas condições cromatográficas da amostra, e foi utilizada para obter os índices de retenção conforme descrito por Van Den Dool e Kratz (1963).

4.6 Óleos essenciais e antibióticos

A solução estoque de OECP e OECT foram preparados na concentração de 16000 µg/mL em *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB, acumedia®, Michigan, EUA) a 1% de tween 80 (VETEC Química Fina LTDA/Sigma Aldrich®, Rio de Janeiro, Brasil). Como controle, foi utilizado caldo BHI com 1% de tween 80. O antibiótico oxacilina sódica 500 mg (OXA, Blau Farmacêutica S.A., São Paulo, Brasil), ampicilina sódica 500 mg (AMP, Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Goiás, Brasil) e benzilpenicilina 5.000.000 unidades internacionais (BZP, Blau Farmacêutica S.A., São Paulo, Brasil) foram obtidas comercialmente. O antibiótico foi reconstituído em solução salina 0,9% estéril (Farmace®, Ceará, Brazil) e diluídas com caldo BHI para concentrações desejadas.

4.7 Cepas bacterianas

As cepas clínicas (0A, 4B, 8B, 9B) foram isoladas e identificadas no Laboratório de Microbiologia da Instituição Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Ceará, Brasil, como parte da rotina hospitalar. As cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) 6538 e 700698 foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Todas as cepas foram submetidas a determinação do perfil de resistência pelo sistema VITEK®2 (*bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França*).

Quadro 2: Perfil de resistência à antibioticos obtido pelo sistema VITEK®2.

S. aureus	Fonte	Resistência antibiótica
Standard	ATCC 6538	Sensível
Standard	ATCC 700698	BZP, CLI, ERT, GEN, LEV, OXA, TEC, VAN
0A	Secreção auricular	BZP, ERT, LEV, OXA e SUT
4B	Sangue	BZP
8B	Sangue	BZP, CLI, ERT
9B	ND	BZP e OXA

Nota: ND: Não identificado; BZP: benzilpenicilina; CLI: clindamicina; ERT: eritromicina; GEN: gentamicina; LEV: levofloxacino; OXA: oxacilina; SUT: sulfametoxazol + trimetoprima; TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina. Fonte: Próprio autor.

As bactérias ATCC 700698 e 0A se configuram como MRSA, por meio de confirmação do sistema VITEK®2 com a utilização do teste de *screening* de resistência a Cefoxitina positivo.

4.8 Condições de ajuste e cultivo bacteriano

A partir de uma cultura (BHI com 20 % de glicerol) estoque, armazenada em freezer -80 °C, foi realizada a ativação da cepa com 50 µL em 5 mL de BHI e incubada a 37°C por 24 h em condições aeróbicas. Após 18 h, período em que as células atingem a fase de crescimento exponencial, foi realizado o ajuste do número de células bacterianas para cada ensaio experimental utilizando o padrão de turbidez McFarland 0.5 de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S25* (CLSI, 2019).

4.9 Atividade antimicrobiana

4.9.1 Disco-difusão

O screening da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizado pelo método de difusão em disco recomendado pelo CLSI (2016). *Swabs* estéreis foram mergulhados e rotacionados na parede interna do tubo contendo uma suspensão bacteriana 10⁸ UFC/mL ajustada em salina. Em seguida, toda a superfície das placas contendo Mueller Hinton Ágar (MHA, acumedia®, Michigan, EUA) foi inoculada. Discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) impregnados com 5 µL de OECT e OECP, foram simetricamente distribuídos sobre a placas de MHA e incubadas por 24 horas a 37 °C. Após esse período, foi realizada a leitura do diâmetro do halo de inibição em milímetros com a utilização de um paquímetro (DIGIMESS, São Paulo, Brasil) (CLSI, 2016).

4.9.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

O ensaio da CIM foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo “U” (CLSI, 2016). Inicialmente, todos os poços foram preenchidos com 100 µL

de OECT e OECP em caldo BHI em concentrações decrescentes 8000 a 0,0625 µg/mL. Em seguida, 100 µL de uma suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL) foi adicionado aos poços. Utilizou-se apenas meio BHI como controle negativo. Após 24 horas de incubação a 37 °C foi considerado como CIM a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível. Para determinação da CIM dos antibióticos foram utilizadas concentrações de 0,003 a 4000 µg/MI (OXA); 0,25 a 250 µg/mL (AMP) e 0,0002 a 2000 µg/mL (BZP). Todas as análises foram realizadas em quadruplicata. Para determinação da CBM, foram transferidos 10 µL dos poços onde não houve crescimento microbiano visível para placas contendo Brain Heart Infusion Ágar (BHIA, KASVI, Liofilchem®, Italy). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em condições aeróbicas, e foi considerado CBM menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano na superfície do ágar (EL-GUENDOZ et al., 2018).

4.9.3 Curva de crescimento

O ensaio da curva de crescimento foi realizado para todas as cepas bacterianas em placas de microtitulação de 96 poços de poliestireno, como descrito por Huang et al. (2018) com modificações. A suspensão bacteriana de *S. aureus* foi ajustada (10^6 UFC/mL) e tratadas com OECT e OECP na concentração de SubCIM (2.000 µg/mL) e imediatamente cultivadas em BHI caldo a 37 °C. Realizou-se a leitura durante 24 horas em intervalos de 60 minutos na absorbância de 620nm no leitor SpectraMax® Paradigm® (Molecular Devices).

4.9.4 Ensaio de checkerboard

A cepa 0A por possuir um perfil de múltipla resistência de acordo com o sistema VITEK®2, foi utilizada, juntamente com a cepa MRSA gold-standard ATCC 700698, para avaliação do efeito sinérgico entre os óleos essenciais, bem como combinados com OXA, AMP e BZP. Inicialmente, foi realizado a diluição em série das substâncias em caldo BHI separadamente. Utilizando uma placa de microtitulação de 96 poços, foram adicionados 50 µl de cada substância (1:1 v/v) nas linhas (OECT ou OECP), em concentrações crescentes, e antibióticos (OXA, AMP ou BZP), distribuídos de maneira semelhante entre as colunas. Assim, obteve-se

uma combinação única de concentrações das duas substâncias em cada um dos poços. Em seguida, foi acrescentado 100 µL do micro-organismo (1×10^6 UFC/mL) e incubados a 37 °C por 24 h em condições aeróbicas para determinação da CIM das substâncias combinadas (LEWS et al., 2002; PILLAI MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005; MULYANINGSIH et al., 2010; HAMMOUND et al., 2013).

Este teste foi utilizado como base para calcular o Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF), de acordo com as fórmulas: $CIF_A = CIM_{A+B} / CIM_A$; $CIF_B = CIM_{B+A} / CIM_B$; $ICIF = CIF_A + CIF_B$. Os valores do IFIC foram interpretados de acordo com o Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST), sendo efeito sinérgico ($ICIF \leq 0,5$), aditivo ($0,5 < ICIF \leq 1$), indiferente ($1 < ICIF \leq 4$) ou antagônico ($ICIF > 4,0$).

Além disso, as CIF dos agentes antimicrobianos, foram plotados nos eixos x e y, de um gráfico, formando isobogramas para confirmar interações sinérgicas (BRANEN; DAVIDSON, 2004). A interação entre dois antimicrobianos é aditiva quando os pontos estão ao longo da linha de aditividade. Para interações antagônicas e sinérgicas, os pontos se distribuem acima e abaixo da linha, respectivamente.

4.10 Análise estatística

Ensaio de atividade antimicrobianas realizados em quadriplicata foram apresentados com média \pm desvio padrão (DP), exceto para disco difusão. Diferenças entre os grupos tratado e controle foram consideradas significativas com $p < 0,001$. Os gráficos gerados no teste de curva de crescimento foram utilizados para determinar a área sob a curva (ASC). Os dados foram estatisticamente analisados utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA) aplicando a análise de variância (ANOVA) com o teste post-hoc de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Composição química dos óleos essenciais de *C. tetradenius* Baill. e *C. pulegiodorus* Baill.

Folhas frescas de *C. tetradenius* Baill. e *C. pulegiodorus* Baill. submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger resultaram em óleos essenciais com rendimento 0,47 e 0,37% p/p, respectivamente. A análise do OECT e OECP por CG/EM e CG/DIC gerou 25 picos identificáveis para o primeiro óleo e 21 picos para o segundo (ANEXOS G e H). A composição química do OECT e OECP e seus respectivos índices de retenção de Kovats (IK's) estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Composição química dos óleos essenciais de folhas de *C. tetradenius* Baill. e *C. pulegiodorus* Baill.

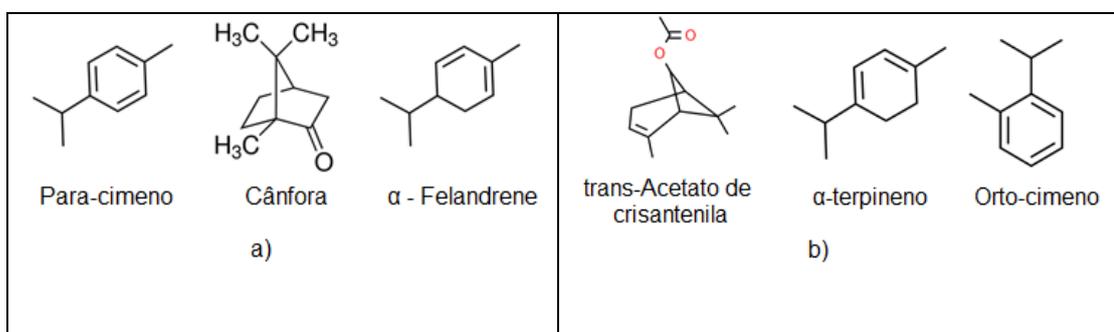
Componentes ³	OECT ¹			OECP ²		
	IKL ⁴	IKC ⁵	(%) ⁶	IKL	IKC	(%)
Hidrocarbonetos monoterpênicos			65,61			53,36
Triciclono	926	933	0,59	-	-	-
α-Thujeno	930	936	1,18	930	933	1
α-Pineno	939	944	4,58	939	942	0,74
Canfeno	954	959	1,79	946	958	0,24
Sabineno	975	982	0,38	975	980	0,53
β-Pineno	979	987	0,4	979	985	0,58
Mirceno	990	996	2,52	990	993	3,65
α-Felandreno	1002	1012	8,98	1002	1011	2,94
α-Terpineno	1017	1024	5,43	1017	1023	19,21
o-Cimeno	-	-	-	1026	1031	12,27
p-Cimeno	1024	1032	28,24	-	-	-
D-Limoneno	1029	1037	4,97	1029	1035	1,64
β-Trans-ocimeno	-	-	-	1050	1052	0,22
γ-Terpineno	1059	1066	6,24	1059	1065	9,51
Terpinoleno	1088	1096	0,31	1088	1094	0,83
Monoterpenos oxigenados			28,06			6,88
1,8-Cineol	1031	1040	3,92	1031	1039	3,33
Cânfora	1146	1153	17,76	1146	1154	0,35
Isoborneol	1160	1165	1,9	1160	1166	0,63
Borneol	1169	1174	0,76	-	-	-
Terpinen-4-ol	1177	1184	2,65	1177	1184	1,68
α-Terpineol	1188	1197	1,07	1188	1196	0,89

Ésteres monoterpênicos			5,67			27,05
trans-Acetato de crisantenila	1238	1246	5,08	1238	1248	27,05
Acetato de isobornila	1285	1292	0,2	-	-	-
Acetato de mirtenila	1326	1333	0,39	-	-	-
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			0,39			1,28
β -Cariofileno	1419	1426	0,13	1390	1398	0,92
α -Humuleno	1454	1460	0,26	-	-	-
Sesquiterpeno oxigenado			0,27			
Espatuleno	1578	1589	0,27	-	-	-
Total			100			88,57

¹OECT: Óleo essencial de *C. tetradenius*; ²OECP: Óleo essencial de *C. pulegiodoris*; Os componentes³ estão ordenados de acordo com sua eluição a partir de uma coluna HP-5MS; ⁴IKL: índices de retenção de Kovats da literatura (ADAMS, 2007); ⁵IKC: índice de retenção de Kovats calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série C7-C30 de n-alcenos em uma coluna capilar coluna HP-5MS; ⁶Porcentagem (%) da área do pico; Fonte: Próprio autor.

A análise dos componentes presentes no OECT e OECP, representou 100% e 88,54% dos constituintes, respectivamente. Para a espécie *C. tetradenius* Baill. o componente volátil mais prevalente foi o p-cimeno (28,24%), seguido por cânfora (17,76%) e o α -felandrene (8,98%). Já o trans-Acetato de crisantenila (27,05%), α -terpineno (19,21%) e o-cimeno (12,27%) se apresentaram como majoritários no OECP (figura 6). Ambas as espécies são ricas em hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados e ésteres monoterpênicos.

Figura 6 - Estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial das folhas frescas de *C. tetradenius* (a) e *C. pulegiodoris* (b).



Fonte: PubChem Database (2019).

5.2 Atividade antimicrobiana

A tabela 2 mostra os valores do diâmetro do halo de inibição, CIM e CBM para OECT e OECP. Os resultados demonstram uma diferença do halo de inibição

entre os óleos testados. Os valores de CIM são de 4.000 µg/mL e 8.000 µg/mL e CBM maior que 8.000 µg/mL para as duas espécies testadas.

Tabela 2: Valores de diâmetro do halo de inibição, CIM e CBM da ação do OECT e OECP.

<i>Staphylococcus aureus</i>	DZI (mm) ³		CIM (µg/mL) ⁴		CBM (µg/mL) ⁵	
	OECT ¹	OECP ²	OECT	OECP	OECT	OECP
ATCC 6538	13	06	4.000	8.000	8.000	>8.000
ATCC 700698	16	08	4.000	8.000	8.000	>8.000
0A	12	07	4.000	8.000	4.000	>8.000
4B	15	09	4.000	4.000	8.000	>8.000
8B	10	09	4.000	8.000	4.000	>8.000
9B	12	07	4.000	8.000	8.000	>8.000

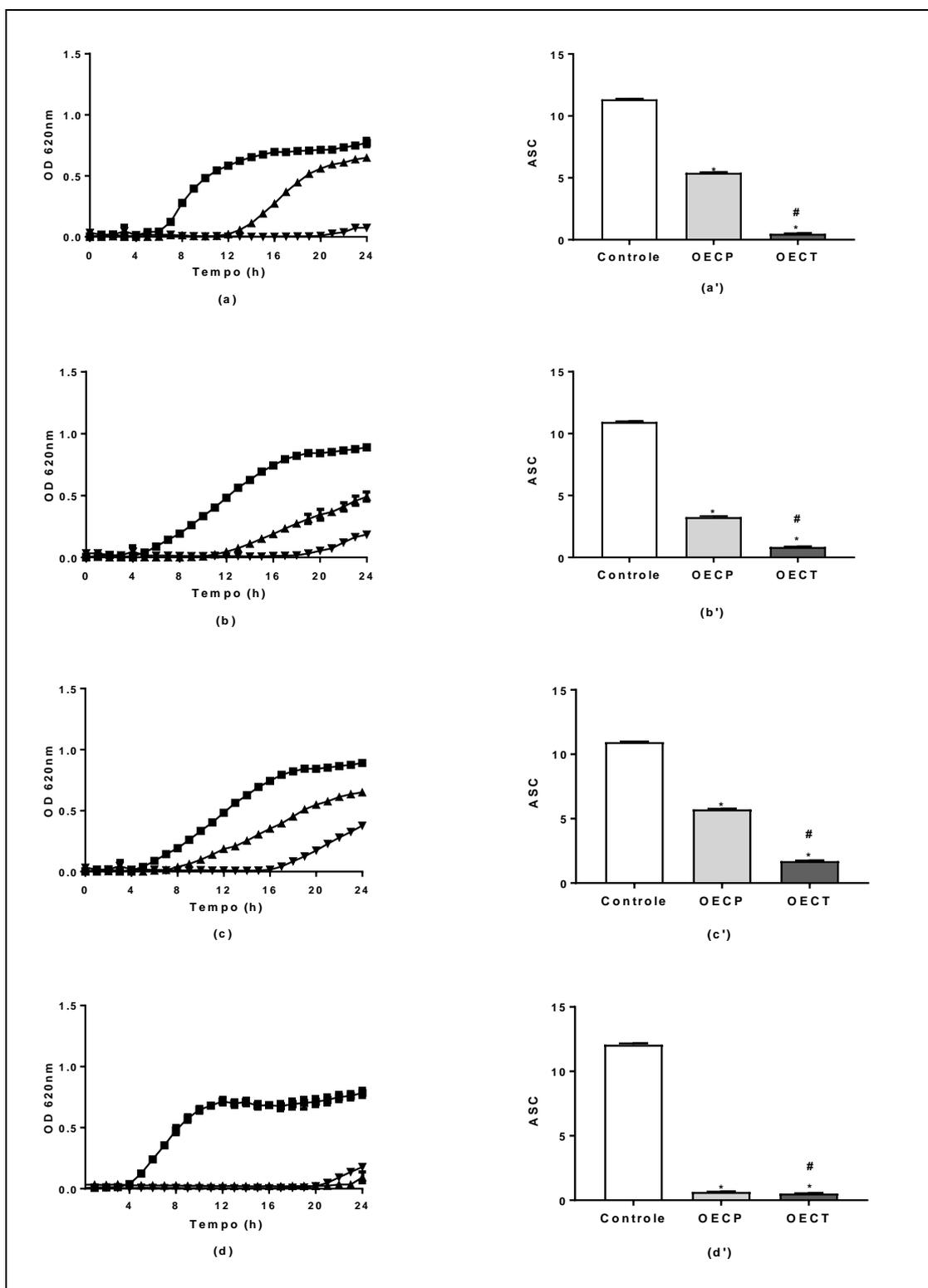
¹OECT: Óleo essencial de *C. tetradenius*; ²OECP: Óleo essencial de *C. pulegioidorus*; ³DZI: Diâmetros das zonas de inibição usando discos de 6mm; ⁴CIM: Concentração Inibitória Mínima; ⁵CBM: Concentração bactericida mínima. Fonte: Próprio autor.

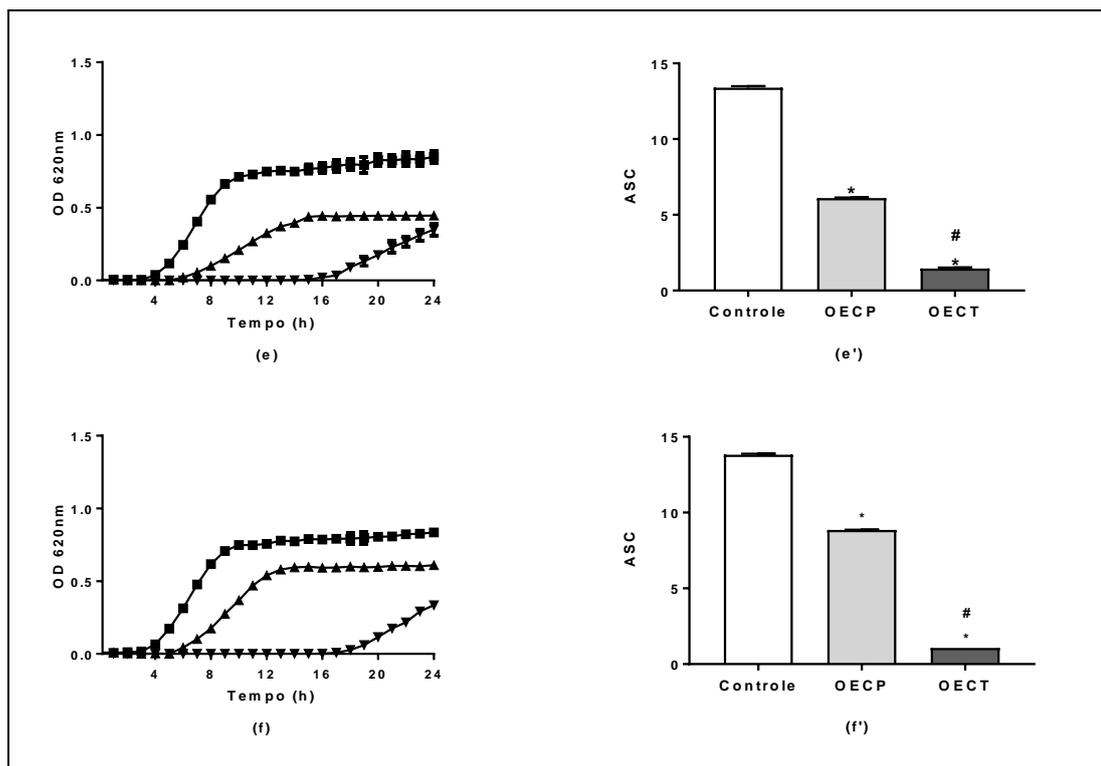
A avaliação antibacteriana pelo método de disco-difusão demonstrou que OECT e OECP possuem atividade contra as cepas testadas por apresentarem zona de inibição de crescimento. Assim, OECT (DZI = 10 a 16 mm) apresentou maiores valores no diâmetro do halo de inibição em relação ao OECP (DZI = 09 a 06 mm). Nos resultados de CIM, OECT apresentou CIM igual a 4.000 µg/mL para todas as cepas testadas, já o OECP apresentou CIM igual a duas vezes esse valor, com exceção da cepa 4B (4.000 µg/mL). Os valores de CBM foram >8.000 µg/mL para todas as cepas tratadas com OECP. Quando foram submetidas ao OECT, todas as cepas apresentaram a CBM igual a 8.000 µg/mL, exceto 0A e 8B (4.000 µg/mL).

5.4 Curva de crescimento

Na cinética de crescimento do grupo controle, a fase adaptação (*lag*) foi de 4 a 6 h após a incubação, entrando na fase de crescimento exponencial (*log*) e permanecendo em média 14 h antes da fase estacionária. Os grupos tratados com OECT e OECP foram testados com concentração sub-CIM de 2.000 µg/mL. O grupo tratado com o OECT foi o mais afetado, apresentando uma maior extensão da fase *lag* para todas as cepas, com destaque para o isolado clínico 4B (23 horas), demonstrado na figura 7.

Figura 7 - Curva do comportamento de crescimento bacteriano (à esquerda) das cepas tratadas com concentrações sub-CIM de OECT e OECP, e gráfico em barras da área sob a curva (à direita), das cepas (a; a') ATCC 6538, (b; b') ATCC 700698, (c; c') OA, (d; d') 4B, (e; e') 8B, (f; f') 9B.





OECT: Óleo essencial de *C. tetradenius*; OECP: Óleo essencial de *C. pulegiodoris*; Curva de crescimento: Controle (■); A: OECP (▲) e OECT (▼); Área sobre a curva (ASC): Controle (□); OECP (■); OECT (■). *Nível de significância de $p < 0,001$ da comparação entre o grupo controle e tratado com OECP ou OECT; # Nível de significância de $p < 0,001$ da comparação entre os grupos tratados com OECP e OECT. Fonte: Próprio autor.

Para o grupo tratado com OECP, verificou-se que o alongamento da fase *lag* foi próximo ao apresentado pelo grupo controle para os isolados 0A, 8B e 9B. Enquanto os grupos tratados com OECT mostraram que o óleo essencial foi capaz de retardar o início da fase de crescimento exponencial em mais de 16 horas para todas as cepas testadas. Devido ao alongamento da fase *lag* em um período de 24 h, não foi possível identificar o final da fase *log* de todas as cepas tratadas com OECT ou OECP, exceto os isolados clínicos 8B e 9B tratados com OECP.

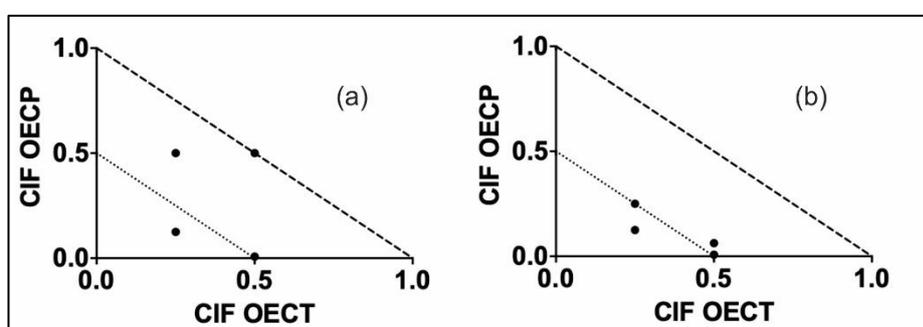
Analisando a ASC constatou-se que em comparação aos grupos controles ocorreu uma redução significativa ($p < 0,001$) do crescimento bacteriano em concentração sub-CIM apresentado por todas as cepas testadas. Essa redução foi atribuída ao OECT para todas as cepas, visto pela diferença significativa entre OECT e OECP (figura 7).

5.5 Atividade sinérgica

Foram testadas 66 diferentes combinações dos antibióticos e óleos essenciais para cada cepa, sendo o efeito sinérgico entre as drogas confirmado pela análise de isobologramas (figura 8 e 9).

Na análise OECT/OECP, mesmo apresentando resistência à múltiplos fármacos, obteve-se efeito sinérgico para ambas as cepas testadas, com ênfase para ação contra o isolado clínico 0A, conforme figura 8.

Figura 8 – Isobologramas representando o efeito da associação OECT x OECP na inibição do crescimento das cepas a) ATCC 700698 e b) 0A.



CIF: Concentração Inibitória Fracional; Fonte: Próprio autor.

Assim, ao se combinar os OEs, verificou-se atividade semelhante para ambas as associações, com reduções de 4 e 8 vezes de OECT e OECP, respectivamente (tabela 3).

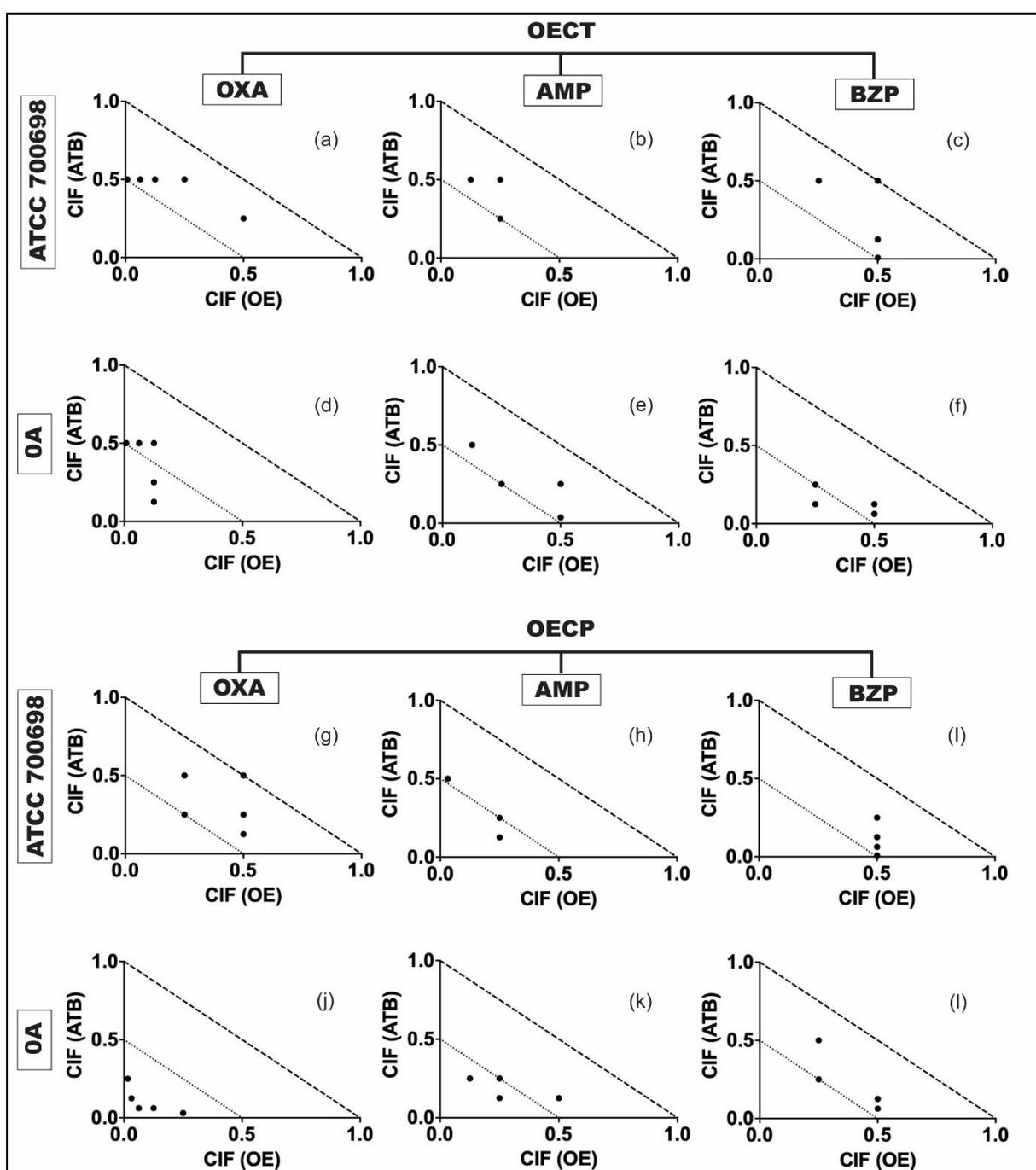
Tabela 3 - Efeito sinérgico do OECT e OECP sobre o crescimento da cepa padrão ATCC 700698 e do isolado clínico 0A de *S. aureus*.

Combinação	¹ CIM (µg/mL)		² ICIF	Interpretação	Redução
	Individual	Combinado			
ATCC 700698					
³ OECT	4.000	1000	0,375	Sinérgico	4x
⁴ OECP	8.000	1000			
0A					
OECT	4.000	1000	0,375	Sinérgico	4x
OECP	8.000	1000			

¹Concentração Inibitória mínima; ²Índice de Concentração Inibitória Fracional; ³OECT: Óleo essencial de *C. tetradenius*; ⁴OECP: Óleo essencial de *C. pulegioidorus*; Onde: a tabela mostra somente as associações das menores concentrações em que houve inibição do crescimento microbiano. Fonte: Próprio autor.

As associações do OECT e OECP se mostraram semelhantes nas combinações com os antibióticos clínicos, ambos apresentando efeito sinérgico, contudo ainda que ambas as cepas se caracterizem como MRSA, apresentam diferentes perfis de sensibilidade depois de submetidas às combinações entre OE e antibióticos (figura 9).

Figura 9 – Isobogramas representando o efeito da associação OECT e OECP com antibióticos da classe das penicilinas na inibição do crescimento das cepas ATCC 700698 e OA.



Onde: OECT - ATCC 700697: OECT + OXA (a); OECT + AMP (b); OECT + BZP (c); OA: OECT + OXA (d); OECT + AMP (e); OECT + BZP (f); OECP - ATCC 700698: OECP + OXA (g); OECP + AMP (h); OECP + BZP (i); OA: OECP + OXA (j); OECP + AMP (k); OECP + BZP (l). OECT: Óleo essencial de *C. tetradenius*; OECP: Óleo essencial de *C. pulegiodorus*; OXA: Oxacilina; AMP: Ampicilina; BZP: Benzilpenicilina. Os pontos representam os valores de CIF das associações em que o crescimento microbiano foi inibido. Fonte: Próprio autor

Todas as combinações envolvendo o OECT contra o isolado clínico OA apresentaram ação sinérgica, com destaque para OECT/OXA que apresentou a reduzido ICIF (0,250), diminuindo a concentração do OECT e OXA de 8 e 4 vezes, respectivamente. Além disso, interação OECT/BZP também apresentou efeito sinérgico com ICIF igual a 0,375 e reduções na CIM individual de 4 e 8 vezes (tabela 4).

Tabela 4 - Efeito modulador do OECT e OECP na atividade antimicrobiana de ATBs de uso clínico sobre o crescimento da cepa padrão ATCC 700698 e do isolado clínico OA de *S. aureus*.

Combinação	¹ CIM (µg/mL)		² ICIF	Interpretação	Redução
	Individual	Combinado			
ATCC 700698					
OECT	4.000	1000	0,500	Sinérgico	4x
AMP	31,25	7,81			2x
OA					
OECT	4.000	250	0,250	Sinérgico	8x
OXA	250	62,50			4x
OECT	4.000	1000	0,500	Sinérgico	4x
AMP	15,62	3,90			4x
OECT	4.000	1000	0,375	Sinérgico	4x
BZP	31,25	3,90			8x
ATCC 700698					
OECP	8.000	2000	0,500	Sinérgico	4x
OXA	1.000	250			4x
OECP	8.000	2000	0,375	Sinérgico	4x
AMP	31,25	3,90			4x
OA					
OECP	8.000	500	0,125	Sinérgico	16x
OXA	250	15,62			16x
OECP	8.000	2000	0,375	Sinérgico	4x
AMP	15,62	1,95			8x
OECP	8.000	2000	0,500	Sinérgico	8x
BZP	31,25	7,81			4x

Onde: a tabela mostra somente as associações das menores concentrações em que houve inibição do crescimento microbiano. ¹Concentração Inibitória mínima; ²Índice de Concentração Inibitória Fracional; OECT: Óleo essencial de *C. tetradenius*; OECP: Óleo essencial de *C. pulegiodorus*; OXA: Oxacilina; AMP: Ampicilina; BZP: Benzilpenicilina. Fonte: Próprio autor

As combinações que envolvem o OECP exibiram maior ação sinérgica por apresentarem menor ICIF, quando comparada com o OECT contra ambas as cepas

testadas. Desta forma, destaca-se a combinação entre o OECP e o antibiótico OXA por apresentar a menor taxa de ICIF (0,125) e reduções da CIM em 16 vezes.

A combinação OECP/AMP exhibe efeito sinérgico com ICIF igual a 0,375 para ambas as cepas testadas e reduções nas concentrações do óleo e antibiótico de 4 e 8 vezes, respectivamente (figura 9).

6 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa o rendimento de OECT e OECP foram de 0,47 e 0,37% p/p, respectivamente. O aproveitamento apresentado pelo OECT foi menor que obtidos por Carvalho et al. (2016), igual 2,73% (p/v). Fernandes (2016) apresentou rendimento igual a 2,73% (p/v). Já a espécie *C. pulegiodorus* apresenta valor próximo ao encontrado em estudo que avalia a ação antitumoral e larvicida do OECP com rendimento igual a 0,8% (p/p) (BEZERRA et al. 2009). Entretanto, em outro estudo de duas espécies de *Croton*, sendo *C. heliotropiifolius* e *C. pulegiodorus* encontram rendimentos igual a 0,2 e 5% (p/v), respectivamente (DÓRIA et al., 2010).

Em ambas as espécies estudadas houve predominância de monoterpenos, uma classe moléculas com elevado número de representantes (DÓRIA et al., 2010). Desempenham um papel importante na defesa das plantas contra bactérias, fungos e herbívoros (HERRMANN; WINK, 2011; MEDEIROS et al., 2017). Carvalho et al. (2016), em sua pesquisa com OECT apresentam como composto majoritário a cânfora (25,49%), com um maior valor de teor desse constituinte do que aquele descrito neste estudo, 17,76 %. Já Siqueira (2017), ao avaliar as composições químicas dos óleos de dois genótipos de *C. tetradenius*, detectou os mesmos constituintes dominantes presentes em OECT investigado neste trabalho, porém em proporções diferentes, como p-cimeno (17,55%), cânfora (7,25%) e α -felandreno (4,51%).

Em se tratando do OECP, Torres et al. (2008) obteve óleo rico em p-cimeno (22,3%), ascaridol (17,0%) e cânfora (13,0%) com ação larvicida, exatamente os mesmos componentes e constituintes encontrados em estudo que avalia sua ação antitumoral (BEZERRA et al., 2009).

Vários fatores podem interferir no metabolismo secundário das plantas e modificar consideravelmente a produção e composição dos constituintes do óleo

essencial, como sazonalidade, temperatura, ritmo circadiano, luminosidade recebida, disponibilidade hídrica e de nutrientes, altitude e ataque de patógenos às plantas (SILVA et al., 2006; NAZARRO et al., 2013). Esses fatores podem explicar as diferenças, quantos os aspectos qualitativos e quantitativos, verificadas entre os óleos essenciais utilizadas nessa pesquisa e os óleos de outros estudos já reportados na literatura.

Quanto aos ensaios de atividade antibacteriana, na presente pesquisa foi possível verificar que o OECT teve ação bacteriostática uniforme (4.000 µg/mL) para todas as cepas de *S. aureus* testadas, independente do perfil de resistência antibiótica. Isso ocorre pelo fato dos OE apresentarem diversos mecanismos de ação, dificultando o desenvolvimento de resistência (NAZARRO et al., 2013; SWAMY et al., 2016). Já o OECP apresentou ação bacteriostática apenas na concentração de 8.000 µg/mL e ação bactericida superior a 8.000 µg / mL. Almeida-Pereira et al. (2019) obtiveram ação anti-estafilocócica do OECT em concentrações (125 - 205 µg/mL). Entretanto, Siqueira (2017) determinou ação dos óleos de dois genótipos de *C. tetradenius* contra *S. aureus* e obteve valores de CIM variando entre 2.000 e 5.000 µg/mL. Resultados como esses podem ser atribuídos pela proporção do componente majoritário ou mesmo por diferença no quimiotipo dos óleos, visto que a interação entre os constituintes encontrados pode ser responsável por sua atividade (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Sabe-se que os componentes majoritários possuem maior efeito sobre a ação exercida por determinados óleos essenciais, assim, por OECT apresentar uma ação antibacteriana mais acentuada, pode ser associado a elevada presença de p-cimeno na sua constituição. Outros estudos descreveram a atividade antimicrobiana desse componente, o qual possui a capacidade de afetar o potencial de membrana de bactérias (DORMAN; DEANS, 2000; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; BEN ARFA et al., 2006). Burt et al. (2007) demonstraram que ação do p-cimeno resultou em diminuição da motilidade celular por reduzir a força motriz da bomba de próton, no qual é necessária para o movimento flagelar (NAZARRO et al., 2013; SWAMY et al., 2016).

Em estudos similares, o óleo essencial de folhas e caules de *C. heliotropiifolius*, apresentando elevada semelhança em sua constituição química com o OECT e OECP, mostrou efeito contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (ARAÚJO et al., 2017). O óleo essencial de *C. limae* com quantidades

significativas de compostos monoterpênicos (cedrol (28,4%), eucaliptol (17,4%), p-cimeno (4,2%) e β -pineno (3,0%)), mostrou atividade contra bactérias Gram-negativas com CIM > 1024 $\mu\text{g/mL}$ e contra *S. aureus* (CIM = 512 $\mu\text{g/mL}$) (LEITE et al., 2012).

Em geral, concentrações subinibitórias de óleo essencial apresentam uma interferência negativa no crescimento bacteriano (OLIVEIRA et al., 2014; MELO et al. 2019). Essa ação diferencial também foi observada na curva de crescimento bacteriano sob exposição subinibitórias de OECT e OECP. As células tratadas mostram claramente um alongamento da fase de *lag* quando comparada com o controle que perdurou por quase 20 horas, com ênfase para alterações apresentadas pelas bactérias submetidas ao OECT. Em estudo que avalia a viabilidade celular de isolados clínicos de *S. aureus*, Siqueira (2017) verificou o comportamento da cinética de crescimento de cepas de *S. aureus* submetidas ao OECT com composição química similar a esse estudo, determinando a inibição do crescimento por mais de 24 horas. Esses comportamentos, devem-se ao fato de que algumas bactérias possuem a capacidade adaptativa de se proteger contra o estresse causado por ataques, alterando o perfil de ácidos graxos de sua membrana citoplasmática (MELO et al., 2019). Nesse estudo, a análise da ASC mostrou que, para todas as cepas, o OECT interferiu mais no crescimento do que o OECP, com redução em seu nível de crescimento acima de 70%, quando comparado ao controle.

Além dos efeitos individuais, os óleos essenciais podem apresentar efeito sinérgico entre si, bem como combinados com antibióticos convencionais (ANÉ; VUUREN, 2017, LEE; LEUNG; WONG, 2014). Um estudo anterior demonstrou um efeito sinérgico entre os compostos p-cimeno e carvacrol, sugerindo que a ocorrência desse efeito foi devido ao p-cimeno desestruturar a membrana plasmática e permitir que o carvacrol fosse facilmente transportado para a célula (ULTEE, A. et al 2000).

Portanto, essa convergência sinérgica aumenta a atividade de óleo essencial e antimicrobianos, reduzindo suas concentrações em formulações (ALJAAFARI et al., 2019). No presente estudo isso foi observado nas combinações entre os óleos essenciais e os antibióticos do grupo das penicilinas, os quais apresentaram efeito sinérgico contra cepas MRSA, diminuindo de forma significativa suas CIM individuais (figura 8 e 9). Em estudo recente, foi verificado o sinergismo entre o óleo essencial

das folhas e galhos de *Melaleuca armillaris*, com o antibiótico cloxacilina contra isolados clínicos de *S. aureus*. Ainda nesse estudo, verificou-se que o óleo é rico em 1,8 cineol, componente químico abundante em ambas as espécies desse estudo (BULDAIN et al., 2018). Essa investigação corrobora com a de Siqueira (2017), que ao avaliar a combinação do OECT de dois genótipos com os antibióticos ciprofloxacino e meropenem contra cepa padrão de *S. aureus*, encontrou efeito sinérgico para todas as combinações. Entretanto, Melo et al. (2019), ao associarem o óleo essencial de *O. gratissimum* L. e o eugenol com oxacilina com ciprofloxacino, verificaram efeito aditivo dessas combinações para o isolado clínico de *S. aureus*.

Além da reconhecida importância e ação de efeitos sinérgicos, alguns autores já confirmam a ideia de que combinações que resultam em aditividade também podem ser tão eficazes, por apresentar similar capacidade para causar danos na membrana (YANG et al., 2017; MELO et al., 2019). Dessa forma, neste estudo verificou-se efeito aditivo nas combinações de ambos os óleos essenciais e o antibiótico BZP e uma acentuada redução de sua concentração (128x) para a cepa ATCC 700698.

Portanto, após verificar os efeitos em combinação, estudos reforçam e sugerem a possível utilização de óleos essenciais como produtos biotecnológicos na clínica aplicada, individualmente ou associados à antibióticos, como curativos especiais, formulações tópicas, fios de sutura entre outros (EDMONDSON et al., 2011; LEE; LEUNG; WONG, 2014; ANÉ; VUUREN, 2017; GEMEDA et al., 2018). Além de novas opções para protocolos terapêuticos, a combinação de produtos naturais com antibióticos convencionais mostrou-se uma promissora alternativa por serem comparativamente mais econômicos, apresentarem maior aceitação do público devido ao uso tradicional, com melhores propriedades de biodegradabilidade, e ainda, minimizarem concentrações de fármacos e reações adversas. Pois a combinação leva a um efeito sinérgico, reduzindo significativamente a CIM desses medicamentos e permitindo o uso de doses mais baixas em cepas multirresistentes para o sucesso terapêutico, como visto na tabela 3 (FERNANDO et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Os OEs provenientes de folhas frescas de *C. tetradenius* e *C. pulegiodorus*, obtidas no Ceará, Brasil, demonstraram atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus* com perfil de resistência à múltiplas drogas. Além disso, foi determinado a capacidade sinérgica dos OEs combinados entre si e com antibióticos para aumentar a sensibilidade dos micro-organismos testados à OXA, AMP e BZP, com ênfase na combinação OECP + OXA. Considerando os resultados obtidos, sugere-se a aplicação promissora desses óleos essenciais para novas terapias, como alternativa natural ou combinadas a antibióticos clínicos para o tratamento e profilaxia de doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

- ABAKAR, H. O. M.; BAKHIET, S. E. A.; ABADI, R. S. M. Antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of *Aloe vera* sap and leaves using different extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.**, Sudão, v. 6, n. 3, p. 298-303, mar./abr. 2017.
- ACOSTA, A. C. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE).**, Pernambuco, v.11, n.4, p.252-269, set./jan. 2017.
- ADAMS, Robert Phillip. **Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy.** 4. ed. Illinois: Allured, 2009. 804 p.
- ALENCAR FILHO J. M. T. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacologia.**, Bahia, v. 27, n. 4, p. 440-444, fev./mar. 2017.
- ALI, Z. M. M., SAEED, A. E. M.; KHALID. H. S. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Ximenia americana* L bark and leaves. **American Journal of Research Communication.**, Sudão, v. 4, n. 1, p. 122-129, dez. 2016.
- ALJAAFARI, Mariam. et al. **Essential Oils: Partnering with Antibiotics.** In: EL-SHEMY, Hany A. Essential Oils - Oils of Nature. 1. ed. Londres: IntechOpen, 2019. 17 p.
- ALMEIDA, T.S. et al. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products.**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 630–633, jan. 2013.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. et al. Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill. using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research.**, Sergipe, v. 16, n. 2, p. 1-12, jan./mai. 2017.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm, **Journal of Essential Oil Research.**, Sergipe, v. 31, n. 5, p. 379-389, nov./jun. 2019.
- ALVES, A. P.; BEHAR, A. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista AMRIGS.**, Porto Alegre, v.57, n. 3, p. 213-218, jul./set. 2013.
- ANÉ, O.; VUUREN, S. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, África, v. 1, n. 1, p. 92, jul./mai. 2017.
- ARANTES, T. et al. Avaliação da colonização e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* em amostras de secreção nasal de profissionais de enfermagem. **Revista Brasileira de Farmácia.**, São Paulo, v. 94, n. 1, p. 30-34, fev./mar. 2013.

ARAÚJO, F. M. et al., Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops & Products**., Bahia, v. 105, n. 1, p. 203–206, dez./mai. 2017.

ARJIN, C.; TAPINGKAE, W. Use of Phytogetic Compounds as Antibiotics Substitute in Monogastric Animal Diets. **Thai Journal of Animal Science**., Chiang Mai, v. 1, n. 1, p. 11-20, jan. 2014.

AZEVEDO, M. M. B. et al. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves of two morphotypes of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Essential Oil Research**., Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 351-357, ago. 2012.

BAJERA, T. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. **Industrial Crops and Products**., Pardubice, v. 100, n. 1, p. 95–105, ago./fev. 2017.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2013. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2013.

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

BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**., France, v. 43, n. 1, p. 149–154, ago. 2006.

BENACHINMARDI, K. K. et al. Prevalence of non-fermenting Gram-negative bacilli and their *in vitro* susceptibility pattern at a tertiary care teaching hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**., Índia, v. 41, n. 1, p. 162-166, set./dez. 2014.

BEZERRA, D. P. et al. Atividade antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton regelianus* e seu componente ascaridol. **Chemistry & Biodiversity**., Fortaleza, v. 6, n. 8, p. 1224–1231, ago. 2009.

BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin.

International Journal of Food Microbiology., Moscow, v. 90, n. 1, p. 63-74, jan. 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 12. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM**. Relatório de resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmado laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva. Brasília: ANVISA, 2015. Disponível em:

<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/12>. Acesso em: 01 mar. 2018.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. **Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2013. 84 p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Ministério da Saúde. **LEI Nº 9.431 DE 06 DE JANEIRO DE 1997**. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. Brasília, 2012. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9431.htm. Acesso em: 19 jul. 2019.

BRASIL. **Resolução - CNS Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012**. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. Acesso em: 18 jul 2019.

BUCHY, P. et al. Impact of vaccines on antimicrobial resistance. **International Journal of Infectious Diseases**., Cingapura, v. 90, n. 1, p. 188 – 196, jan./out. 2020.

BULDAIN, D. et al. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Veterinary Science**., Argentina, v. 2, n. 5, p. 177, abr./ago. 2018.

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**., Holanda, v. 73, n. 1, p. 4484–4490, fev./mai. 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**., Fortaleza, v. 30, n. 1, p. 288–294, jan./set. 2007.

CARDOSO, A.M; REIS, C. Contaminação de superfícies inanimadas de UTI por bactérias Gram negativas multirresistentes em hospital universitário de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**., Goiânia, v. 48, n. 3, p. 59-65, dez./fev. 2016.

TORRES, Daniela Santos Carneiro. **Diversidade de Croton L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga**. Bahia: Departamento de Ciências Biológicas, 2009. Originalmente apresentada como dissertação de doutorado em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

CARVALHO, A. F. et al., Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**., São Paulo, v.16, n.3, p.521-526, nov./mar. 2014.

- CARVALHO, K. S. et al. Toxicological evaluation of essential oil the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology Research.**, Bahia, v. 115, n. 9, p. 3441-3448, mai. 2016.
- CASTRO, K. N. C. et al. Acaricidal potential of volatile oils from *Croton* species on *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, Paraná, v. 29, n. 6, p. 811-815, jun./out. 2019.
- CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em funcionários de um serviço de saúde em Campina Grande-PB. **Revista de Biologia e Farmácia.**, Pernambuco, v. 7, n. 1, p. 1983-4209, nov./dez. 2012.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National and State Healthcare-Associated Infections Progress Report.** 2016. Disponível em: www.cdc.gov/hai/progress-report/index.html. Acesso em: 22 mar. 2018.
- CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.**, Índia, v. 1, n. 13, p. 520-529, jan. 2011.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 29. ed. Wayne, PA: CLSI, 2019.
- COELHO-DE-SOUZA, A.N. et al. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & Clinical Pharmacology.**, Fortaleza, v. 27, n. 1, p. 288-298, jan. 2013.
- CORDEIRO, I. et al. ***Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>. Acesso em: 08 mar. 2019.
- COREY, G. R. et al. Potential role for telavancin in bacteremic infections due to gram-positive pathogens: focus on *Staphylococcus*. **Microbiological Reviews.**, California, v. 28, n. 3, p. 603–610, set./dez. 2015.
- COSTA FILHO, L. O. et al. Foliar cuticular n-alkane of some *Croton* species from Brazilian semiarid vegetation. **Biochemical Systematics and Ecology.**, Pernambuco, v. 41, n. 1, p. 13–15, abr. 2012.
- COSTA, A. C. V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. **Semina: Ciências Agrárias.**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2853-2864, nov./dez. 2013.
- COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP).**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, mai./ago. 2017.

CUI-PING, L. et al. Diterpenoids from *Croton laui* and Their Cytotoxic and Antimicrobial Activities. **Journal of Natural Products.**, China, v. 77, n. 4, p. 1013-1020, abr. 2014.

DANTAS, Raquel Cristina Calvacanti. **Estudo Epidemiológico e Molecular das Resistências aos Carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue**: Produção de Betalactamases, perda de porina *OprD* e hiperexpressão de bombas de efluxo. Uberlândia: Instituto de Ciências Biomédicas, 2015. Originalmente apresentada como dissertação de Doutorado em Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

DAVIS, M. F. et al. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases.**, Baltimore, v. 12, n. 9, p. 703-716, set. 2012.

DE MARTINO, L. et al. Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. **Natural Product Communications.**, Italia, v. 4, n. 1, p. 1741–1746, ago./nov. 2009.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines (Basel).**, Ariana, v. 3, n. 4, p. 25-41, mar./set. 2016.

DÓRIA, G. A. A. et al. study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology.**, Sergipe, v. 48, n. 6, p. 615–620, out./abr. 2010.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology.**, Reino Unido, v. 88, n. 1, p. 308–316, fev. 2000.

EDMONDSON, M. et al. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. **International Wound Journal.**, Australia, v. 8, n. 4, p. 375–384, ago./mai. 2011.

EHLERT, P. A. D. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 79–80, set. 2006.

EL-GUENDOUIZ, S. et al. Moroccan propolis: A natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with no induction of resistance after continuous exposure. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, Portugal, v. 2018, n. 1, p. 1 - 19, jul./nov. 2018.

EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Terminology Relating to Methods for the Determination of Susceptibility of Bacteria to Antimicrobial Agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

(ESCMID). **Clinical Microbiology and Infection.**, Europa, v. 6, n. 9, p. 1-6, may./set. 2000.

EWANSIHA, J. U. et al. Antimicrobial Activity of *Cymbopogon Citratus* (Lemon Grass) and It's Phytochemical Properties. **Frontiers in Science.**, Nigeria, v. 2, n. 6, p. 214-220, dez. 2012.

FARIA, Raimundo Nonato. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (Caesalpinioideae) e da inibição de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos.** Bahia: Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – SBFIS, 2012. Originalmente apresentada como dissertação Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, 2012.

FERNANDES, Daiana Nolasco Moreira. **Composição Química, Atividade Antimicrobiana e Antioxidante do Óleo Essencial de *Croton tetradenius* Baill (Euphorbiaceae).** Bahia: Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais. 2016. Originalmente apresentada como dissertação Mestrado em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, 2016.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical.**, Goiânia, v. 34, n. 2, p. 113-122, mai./ago. 2005.

FERNANDO, G. F. et al. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. **Pharmaceutical Biology.**, Crato, v. 52, n. 5, p. 560-565, abr./nov. 2014.

FIGUEIREDO, D. Q. et al., Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Partologia e Medicina Laboratorial.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 177-84, mai./jun. 2009.

FIROMSA, W. et al. Bactericidal action of *Croton macrostachyus* leaf extract against common human pathogenic bacteria. **Journal of Medicinal Plants Studies.**, São Paulo, v. 6, n. 6, p. 33-36, mar. 2018.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology.**, Ireland, v. 12, n. 1, p. 49–62, dez. 2014.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health.**, United State, v. 10, n. 4, p. 369-378, mai./ago. 2017.

FURTADO, J. M. et al., Atividade Antimicrobiana do Extrato Aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* Frente a Bactérias de Interesse. **UNOPAR Científica. Ciência Biológica e da Saúde.**, Sobral, v. 17, n. 4, p. 233-7, abr./set. 2015.

GEMEDA, N. Development, Characterization, and Evaluation of Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Topical Formulations from *Cymbopogon martini* (Roxb.) W. Watson Essential Oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, Ethiopia, v. 2018, n. 9812093, p. 16, jul./set. 2018.

HAMMOUND, R. et al. Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. **Phytomedicine.**, Germany, v. 21, n. 4, p. 443-447, mar. 2013.

HANZELMANN, D. et al. Toll-like receptor 2 activation depends on lipopeptide shedding by bacterial surfactants. **Nature Communications.**, Germany, v. 7, n. 12304, p. 1-11, dez./jul. 2016.

HARBARTH, S. et al. Antimicrobial resistance: One world, one fight. **Antimicrobial Resistance and Infection Control.**, Genebra, v. 4, n. 49, p. 1-12, dez. 2015.

HAUSER, R. A.; OZER, A. E. **Pseudomonas aeruginosa**. Poster produced with support from Cubist Pharmaceuticals. Nature Review Microbiology. 2011. Disponível em: <http://rum-data.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/index.html>. Acesso em: 18 mai. 2019.

HERRMANN, F.; WINK, M. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. **Phytomedicine.**, Germany, v. 18, n. 13, p. 1191–1196, out. 2011.

HUANG, J. et al. Antibacterial activity of *Artemisia asiatica* essential oil against some common respiratory infection causing bacterial strains and its mechanism of action in *Haemophilus influenzae*. **Microbial Pathogenesis.**, China, v. 114, n. 1, p. 470-475, jan. 2018.

KIM, M. K. et al Mechanisms driving the antibacterial and antibiofilm properties of Hp1404 and its analogue peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports.**, Coreia, v. 8, n.1763, p. 1-16, jul./jan. 2018.

KIM, S. A.; RHEE, M. S. Highly enhanced bactericidal effects of mediumchain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β - resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O15. **Food Control.**, Coreia, v. 60, p. 447–454, fev. 2016.

KÖCK, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. **Euro Surveill.**, Germany, v. 15, n. 41, p. 19688, out. 2010.

KOHL, T.; PONTAROLO, G.H.; PEDRASSANI, D. Resistência Antimicrobiana De Bactérias Isoladas De Amostras De Animais Atendidos Em Hospital Veterinário. **Saúde Meio Ambiente.**, Canoinhas, v. 5, n. 2, p. 115-127, dez. 2016.

KONG, E. F.; JOHNSON, J. K.; JABRA-RIZK, M. A. Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. **PLoS Pathog.**, United States, v. 12, n. 10, e1005837, out. 2016.

KUMAR, A. S. et al., Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (*Malvaceae*) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal of Pharmacology.**, India, v. 4, n. 1, p. 13-6, mar. 2009.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews.**, Canadá, v. 31, n. 4, p. 1-103, set. 2018.

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

LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in *Staphylococci*-an overview. **Frontiers Microbiology.**, USA, v. 6, n. 1, p. 1174, set./out. 2015.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers.**, Australia, v. 31, n. 4, p. 18033, mai. 2018.

LEE, R. L. P.; LEUNG, P. H. M.; WONG, T. K. S. A randomized controlled trial of topical tea tree preparation for MRSA colonized wounds. **International Journal of Nursing Sciences.**, Hong Kong, v. 1, n. 1, p. 7–14, jan./mar. 2014.

LEITE, T. R. et al. Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *Croton limae*. **Pharmaceutical Biology.**, Crato, v. 55, n. 1, p. 2015-2019, nov. 2017.

LEWIS, R. E. et al., Comparison of Etest, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, Houston, v. 49, n.2, p. 345-351, fev. 2002.

LIMA, C. M. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, Recife, v.16, n.4, p.832-838, fev./mai. 2014.

LIMA, M. F. P. Et al. *Staphylococcus aureus* e as Infecções Hospitalares – Revisão De Literatura. **Revista UNINGÁ Review.**, Minas Gerais, v.21, n.1, p.32-39, jan./mar. 2015.

LOFFLER, B. et al. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. **International Journal of Medical Microbiology.**, Germany, v. 304, n. 1, p. 170–176, mar. 2014.

LOPES, G.A.D. et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão.**, São Paulo, v.6, n.2, p.143-155, jul. 2010.

LOPES, E. L. et al. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* kunth. **Química Nova.**, Fortaleza, v. 35, n. 1, p. 2169–2172, abri./out. 2012.

LUCENA, M.F.A.; AMORIM, B.S.; ALVES, M. Sinopse das espécies de Euphorbiaceae s.l. do Parque Nacional Serra de Itabaiana, Sergipe, Brasil. **Revista Caatinga.**, Bahia, v. 22, n. 4, p. 214-224, abr./dez. 2009.

LUNA, C. M. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.**, Salvador, v. 14, n. 2, p. 119-127, dez. 2010.

LUSTOSA, Ana Karina Marques Fortes. **Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida.** Teresina: Centro de Ciências Saúde, 2012. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2012.

MAGALHÃES, C. R. I. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, São Paulo, v.17, n.4, supl. III, p.1150-1158, jan./ago. 2015.

MAHMOUDI, H. et al. Study of polymorphism spa gene (encoding protein A) of *Staphylococcus aureus* in clinical isolates and nasal carriers. **Tehran University Medical Journal TUMS Publications.**, Índia, v. 73, n. 1, p. 24–30, jul. 2015.

MARSCHALL, J. et al. Strategies to prevent central line-associated bloodstream infections in acute care hospitals: 2014 update. **Infection Control & Hospital Epidemiology.**, Missouri, v. 35, n. S2, p. 89-107, jul2014.

MASKARINEC, S. A.; et al. The Risk of Cardiac Device-Related Infection in Bacteremic Patients Is Species Specific: Results of a 12-Year Prospective Cohort. **Open Forum Infectious Diseases.**, Carolina, v. 4, n. 3, p. 1-7, mai./jun. 2017.

MEDEIROS, V. M. et al. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewioides*. **Microbial Pathogenesis.**, João Pessoa, v. 111, n. 1, p. 468-471, out. 2017.

MELO, Jeane Aparecida. **Valorização da flora do cerrado com importância medicinal.** Luziânia: Licenciatura em Ciências Biológicas, 2011. Originalmente apresentada como dissertação de Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia), Universidade de Brasília, 2011.

MELO, R. S. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil Against Multidrug-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules.**, Sobral, v. 24, n. 21, p. 3864, out. 2019.

MENDES, R.R. et al. Perfil bacteriológico das mãos de profissionais de saúde no centro cirúrgico e no pós-operatório do hospital geral de Palmas, Tocantins. **Revista de Patologia do Tocantins.**, Tocantins, v. 3, n. 1, p. 44-60, jan. 2016.

MILLEZI, F. M et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety.**, Portugal, v. 32, p. 351–359, jul. 2012.

MIRANDA, F. M. et al. Promising antifungal activity of *Croton tricolor* stem essential oil against *Candida* yeasts, **Journal of Essential Oil Research.**, Bahia, v. 31, n. 3, p. 223-227, mai./nov. 2019.

MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A.. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.**, USA, v. 7, n.1 p. 3910-3389, fev. 2017.

MULYANINGSIH S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine.**, Germany, v. 1, n. 1, p. 1061–1066, nov. 2010.

NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, São Paulo, v. 38, n. 9, p. 1713-1719, set. 2018.

NAEEM, A. Essential Oils: Brief Background and Uses. **Annals of Short Reports.**, Parkistan, v. 1, n. 1, p. 1-6, jun./mai. 2018.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel).**, Italy, v. 6, n. 12, p. 1451-74, set./nov. 2013.

NEVES P. R. et al., *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 409-420, ago. 2011.

NIJOYA, M. E.; ELOFF, J. N.; MCGAW, L. J. *Croton gratissimus* leaf extracts inhibit cancer cell growth by inducing caspase 3/7 activation with additional anti-inflammatory and antioxidant activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, Africa, v. 18, n. 1, p. 305-316, nov. 2018.

NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five *Lamiaceae* essential oils. **Industrial Crops and Products.**, Serbia, v. 61, n. 1, p. 225–232, mai. 2014.

OBEY, J. K. et al. Antimicrobial Activity of *Croton macrostachyus* Stem Bark Extracts against Several Human Pathogenic Bacteria. **Journal of Pathogens.**, Africa, v. 2016, n. 1453428, p. 1- 5, dez./abr. 2016.

OHADIAN M. S.; POURMAND, M. R.; AMINHARATI, F. Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients, Iran. **Journal of Infection in Developing Countries.**, Tehran, v. 8, n. 12, p.1511– 1517, jul./ago. 2014.

OLIVEIRA, Simone Torres de. **Uso do peptídeo sintético lys-a1 no favorecimento da atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.** Fortaleza: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2014.

OZ, M. et al. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology & Therapeutics.**, Califórnia, v. 152, n. 1, p. 83–97, ago. 2015.

PAGANO, M. C.; MARIA, S. M. Effect of phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of *Zeyheria tuberculosa* a native species in Brazil's forest. **Middle-East Journal of Scientific Research.**, Minas Gerais, v. 6, n. 6, p. 604-11, jun. 2010.

PATEL, N. B. et al. Acceleration of the formation of biofilms on contact lens surfaces in the presence of neutrophil-derived cellular debris is conserved across multiple genera. **Molecular Vision.**, Dallas, v. 24, n. 1, p. 94-104, jan. 2018.

PERCIVAL; S.L.; et al. Infecções associadas à assistência médica, dispositivos médicos e biofilmes: risco, tolerância e controle. **Jornal de Medicina Microbiológica.**, Goiás, v. 64, n. 1, p. 323–334. mai. 2015.

PILLAI, Satish.; MOELLERING Robert.; ELIOPOULOS George. *In*: Victor, Lorian (org). **Antibiotics in Laboratory Medicine.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 2005. p. 365–440.

POORABBAS, B. et al. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. **Iranian Journal of Microbiology.**, Iran, v. 7, n. 3, p. 127-35, mai./jun. 2015.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **International journal of antimicrobial agents.**, France, v. 45, n. 6, p. 568-585, mar./jun. 2015.

PUBCHEM DATABASE. **National Center for Biotechnology Information.** P-Cymene, CID=7463, Camphor, CID=2537, alpha-Phellandrene, CID=7460, trans-Chrysanthenyl acetate, CID=10899521, alpha-Terpinene, CID=7462, O-Cymene, CID=10703. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>. Acesso em: jan 2020.

RAMOS, J.M.O. et al. Chemical constituents and potential antiinflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, Sergipe, v. 23, n. 1, p. 644-650, mar./jun. 2013.

LEITE, João Paulo Viana. **Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia.** Fitoterapia - bases científicas e tecnológicas. 1 . ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 344.

RICE, L. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases.**, Clevelândia, v. 197, n. 1 p. 1079- 1081, jan./mar. 2008.

ROCHA, A. J. et al. *Pseudomonas Aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, Sobral, v. 62, n. 19180503, p. 1-15, set./mai. 2019.

ROSA, R. L.; BARCELOS, A. L. V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes *mellitus* na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, Santa Catarina, vol.14, n.2, p. 306-310, out./nov. 2012.

ROSENTHAL, V. D. et al. International nosocomial infection control consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: device-associated module. **American Journal of Infection Control.**, Argentina, v. 44, n. 1, p. 1495–1504, dez. 2016.

RUPPÉ, E.; WOERTHER, P-L; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care.**, France, v. 5, n. 1, p. 61, ago. 2015.

SAAD, N, Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their componentes. **Flavour and Fragrance Journal.** France, v. 28, n. 5, p. 269– 279, jan./mai. 2013.

SALVARCI, U.; KOROGLU, H.; GURPINAR T. Evaluation of antimicrobial activities of minocycline and rifampin-impregnated silicone surfaces in an in vitro urinary system model. **Journal of Pakistan Medical Association.**, Konya, v. 65, n. 2, p.115-119, fev. 2015.

SANTANA, L. S. et al. Infecção hospitalar em pacientes cirúrgicos de um hospital do interior de Minas Gerais. **Revista de Enfermagem Centro Oeste Mineiro.**, Minas Gerais, v. 2, n. 1, p. 51-57, jan./abr. 2012.

SANTOS, V.L et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, Parnaíba, v.13, n.1, p.68-72, set./mai. 2011.

SILVA, D. T. et al. Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* nees. **Revista Árvore.**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1065-1072, fev./out. 2015.

SILVA, H. C. et al., A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry.**, Fortaleza, v. 49, n. 1, p. 203–209, fev. 2014.

SILVA, J. S. et al. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco. **Acta Botânica Brasileira.**, Pernambuco, v. 24, n. 1, p. 441–453, jul./mar. 2010.

SILVA, J.S.; SALES, M.F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia.**, Pernambuco, v. 60, n. 1, p. 879–901, mai./nov. 2009.

SILVA, Wellington José da. **Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no estado de sergipe contra *Aedes aegypti* Linn.** São Cristóvão: Programa Regional de Desenvolvimento e meio Ambiente, 2006. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe, 2006.

SIQUEIRA, Ingrid Borges. **Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Croton tetradenius* (Baill.) frente a bactérias uropatógenas e sinergismo com antibióticos.** São Cristóvão: Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2017. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, 2017.

SOARES, J. R. P. F. et al. Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium Cochliocarpum (gomez) macbr* sobre micro-organismos orais. **Odontologia Clínica Científica.**, Recife, v. 9, n. 4, p. 331-335, dez. 2010.

SOUSA, D. M. et al. Infecção por *Staphylococcus aureus* Resistente em Unidades de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Revista de Enfermagem.**, Teresina, v.10, n. 4, p. 1315-1323, abr. 2016.

SPAAN, A. N. et al. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. **Annual Review of Microbiology.**, Holanda, v. 67, n. 1, p. 629–650, set./jul. 2013.

SPAULDING, A. R. et al. *Staphylococcal* and *streptococcal* superantigen exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews.**, USA, v. 26, n. 1, p. 422–447, jul. 2013.

SPEZIALE, P. et al. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.**, Italy, v. 4, n. 1, p. 171, dez. 2014.

STAPELS, D. A. et al. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, Germany, v. 111, n. 1, p. 13187–13192, set. 2014.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated

Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, Índia, v. 2016, n. 3012462, p. 1-21, jul./out. 2016.

TADEG, H.; MOHAMMED, E. A.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology.**, Ethiopia, v. 100, n. 1, p. 168-175, ago. 2005.

TAHERIKALANI, M. et al. Determining the prevalence of SCCmec polymorphism, virulence and antibiotic resistance genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates collected from selected hospitals in west of Iran. **Journal of Chemotherapy.**, Iran, v. 28, n. 2, p. 104–109, mar./abr. 2016.

THARMARAJ, R. J. J. M.; ANTONYSAMY, J. M. Screening of Bactericidal Activity of Selected Plumbago Species Against Bacterial Pathogens. **Journal of Microbiology & Experimentation.**, Índia, v. 2, n. 6, p.194-200, jul./dez. 2015.

THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Annual Review Pathology.**, Chicago, v. 11, n. 1, p. 1, 343–364, may. 2016.

TORRES, Maria da Conceição de Menezes. **Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* var. *matosii* (Euphobiaceae).** Fortaleza: Programa de Pós-Graduação em Química, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, 2008.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology.**, Holanda, v. 68, n. 1, p. 1561–1568, jan. 2002.

UPRETI, N. *et al.* Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control.**, Nepal, v. 7, n. 121 1-10, out. 2018.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography.**, USA, v.11, n. 1, p.463-7, dez. 1963.

VANHOMMERIG, E. et al. Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **PLOS ONE.**, United States, v. 9, n. 8, e104561, p. 1-8, abr./ago. 2014.

VOUKENG, I. K.; BENG, V. P.; KUETE, V. Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes. **BMC Complement Alternative Medicine.**, Cameroon, v. 16, n. 1, p. 388, out. 2016.

VUNDA, S. L. L. et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Parasitology Research.**, Porto Alegre, v. 111, n. 1, p. 961–966, set./out. 2012.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology.**, Canada, v.5, n. 1, p.175-186, mar. 2007.

XU, W.H.; LIU, W. Y.; LIANG, Q. Chemical Constituents from *Croton* Species and Their Biological Activities. **Molecules.**, China, v. 23, n. 9, p. 2333, jul./set. 2018.

YANG, S-K et al. Additivity vs synergism: investigation of the additive interaction of *Cinnamon Bark* oil and meropenem in combinatory therapy. **Molecules.**, Malaysia, v. 22, n. 1733, p. 1-14, ago./nov. 2017.

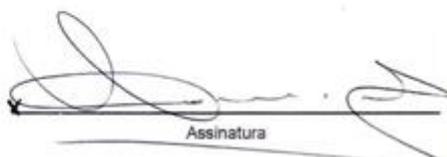
YAP, P. S. X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal.**, Malaysia, v. 8, n. 1, p. 6-14, jan. 2014.

YINA, S. et al. The Interaction of N-Acetylcysteine and Serum Transferrin Promotes Bacterial Biofilm Formation. **Cellular Physiology and Biochemistry.**, China, v. 4, n. 5, p. 1399-1409, jan./fev. 2018.

ZANOL, F. M.; PICOLI, S. U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. **Jornal Brasileiro de Partologia e Medicina Laboratorial.**, Novo Hamburgo, v. 46, n. 4, p. 309-14, abr./agor. 2010.

ANEXOS

ANEXO A - FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTA DO NORDESTE BRASILEIRO CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE Staphylococcus aureus			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 4			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Multidisciplinar/Biotecnologia			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: VICTOR ALVES CARNEIRO			
6. CPF: 461.719.673-00		7. Endereço (Rua, n.º): JOAQUIM TORRES JOAQUIM TAVORA 550 FORTALEZA CEARA 60135130	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (85) 3252-8721	10. Outro Telefone:
		11. Email: viktorcarneiro@gmail.com	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>16</u> / <u>07</u> / <u>18</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: INSTITUTO SUPERIOR DE TEOLOGIA APLICADA - INTA		13. CNPJ: 03.365.403/0001-22	14. Unidade/Órgão: <u>Proresp</u>
15. Telefone: (88) 3614-3232		16. Outro Telefone: <u>(88) 99469-9000</u>	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>Christlene O.S.P. Cavalcante</u>		CPF: <u>394624982-53</u>	
Cargo/Função: <u>Rea-Reitora Pesquisa e PG</u>			
Data: <u>17</u> / <u>04</u> / <u>18</u>		Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			

17. Nome: 7794 INSTITUTO SUPERIOR DE TEOLOGIA APLICADA - INTA	18. Telefone: (88) 3614-3232	19. Outro Telefone: (88) 99469-9000
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.		
Nome: <u>Christene C.S.P. Cavalcante</u>	CPF: <u>394 624 982-53</u>	
Cargo/Função: <u>Pro-Reitora Pesquisa e PG</u>	Email: <u>christene@bol.com.br</u>	
Data: <u>17, 07, 18</u>	 <p>UNINTA Centro Universitário Inta Christene Cavalcante Ex-aluna, Grazielle S. P. Cavalcante Pro. PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO</p>	

ANEXO B - CARTA DE ANUÊNCIA PARA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



SANTA CASA
DE MISERICÓRDIA
DE SOBRAL

FILIADA À CONFEDERAÇÃO DAS MISERICÓRDIAS DO BRASIL
Certificada como Hospital de Ensino pela Portaria Interministerial nº 2.576 de 10/10/2007
DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – DEPE

Sobral (CE), 06 de setembro de 2018.

CARTA DE ANUÊNCIA PARA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTA DO NORDESTE BRASILEIRO CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**”, sob responsabilidade do(a) orientador(a) **Prof. Dr. Victor Alves Carneiro**, atende ao protocolo para realização de pesquisa desta instituição, obtendo Parecer Favorável desta Comissão de Pesquisa para sua realização. A pesquisa foi submetida ao Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão no mês de junho/2018 e terá como campo de coleta de dados a **Santa Casa de Misericórdia de Sobral**, durante o período de **novembro de 2018**, conforme cronograma em anexo.

Atenciosamente,

Lia Gomes da Frota Machado
Coordenadora da Comissão de Pesquisa
Santa Casa de Misericórdia de Sobral - SCMS

Me. Lia Gomes da Frota Machado
Coordenadora da Comissão de Pesquisa
Santa Casa de Misericórdia de Sobral

ANEXO C: TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO



TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

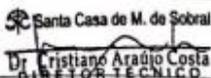
Eu, Dr. Cristiano Araújo Costa, diretor técnico da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), fiel depositário da base de dados do setor de microbiologia do Laboratório Fernando Mendes situado em Sobral, declaro que o pesquisador-orientador Victor Alves Carneiro e a pesquisadora-orientanda Ramaiana Soares Melo estão autorizados a realizar neste setor hospitalar o projeto de pesquisa: Avaliação antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de planta do nordeste brasileiro contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, cujo objetivo geral é avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial extraído de planta do nordeste brasileiro contra isolados clínicos de *S. aureus* da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS).

Adicionalmente, esse projeto consiste em utilizar isolados clínicos presentes no laboratório de microbiologia isolados de oriundos de amostras de fluidos corporais, feridas e/ou ponta de cateter como parte da rotina de exames do hospital, como também obter informações da origem da cepa bacteriana e a análise do perfil de resistência aos antimicrobianos. A obtenção do material (cepas bacterianas) e informações sobre as cepas será realizada após aprovação pelo CEP.

Ressalto que estou ciente de que serão garantidos os direitos, dentre outros assegurados pela resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde da garantia da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos outros e do emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa.

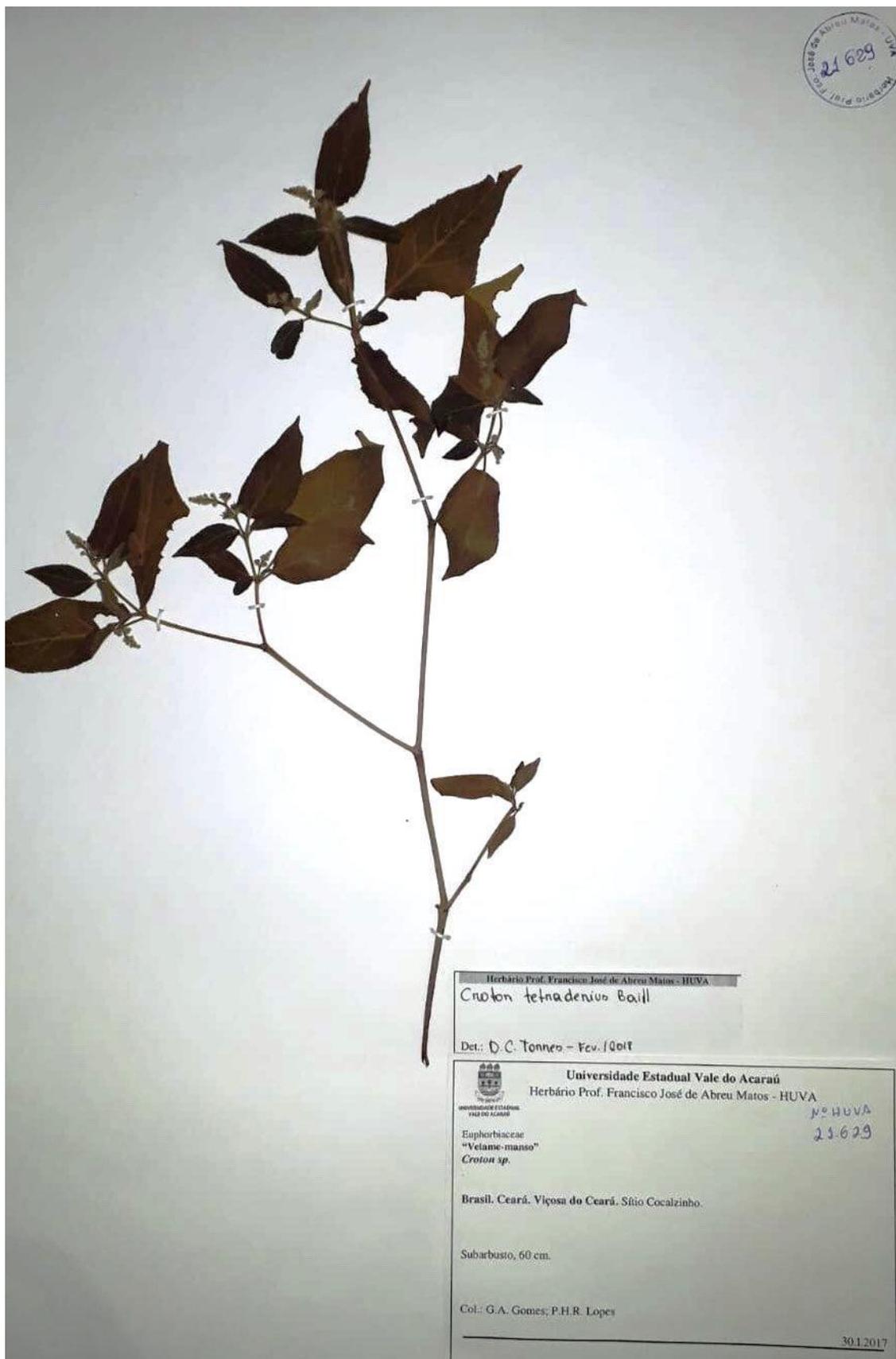
Informo-lhe ainda, que a pesquisa somente será iniciada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, para garantir a todos os envolvidos os referenciais básicos da bioética, isto é, autonomia, não maleficência, benevolência e justiça.

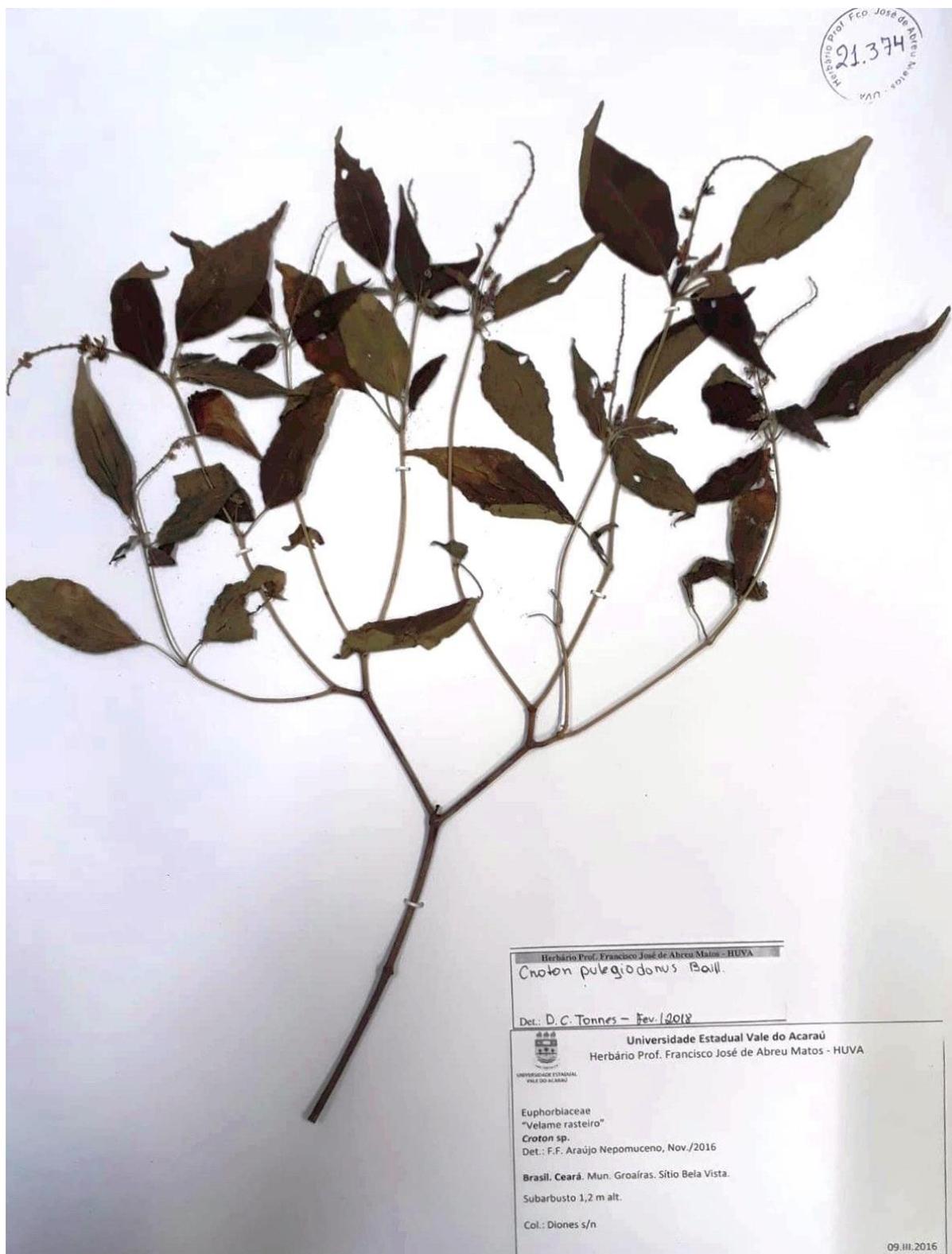
Sobral, 09 de JANEIRO de 2019.


Santa Casa de M. de Sobral
Dr. Cristiano Araújo Costa
DIRETOR TÉCNICO

Dr. Cristiano Araújo Costa (assinatura e carimbo)

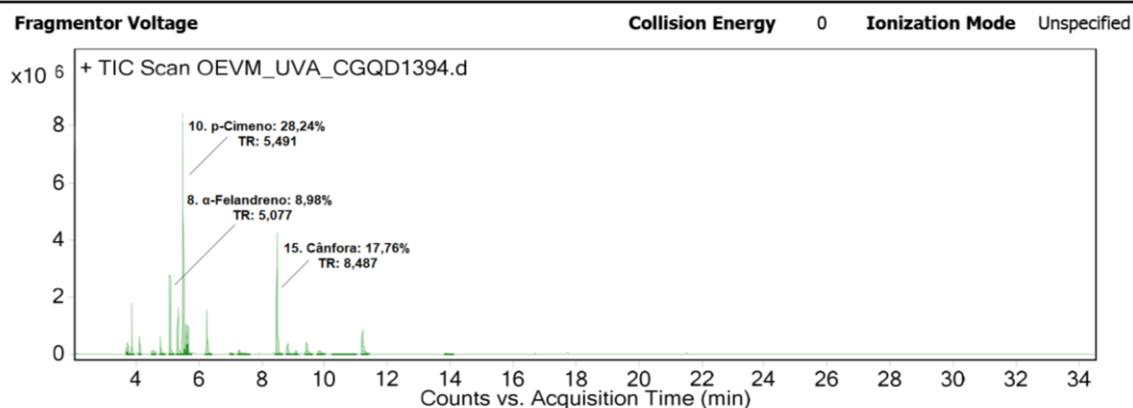
1/1

ANEXO D: EXSICATA (N° HUVA 21629) *Croton tetradenius* Baill.

ANEXO E: EXSICATA (N° HUVA 21374) *Croton pulegioidorus* Baill.

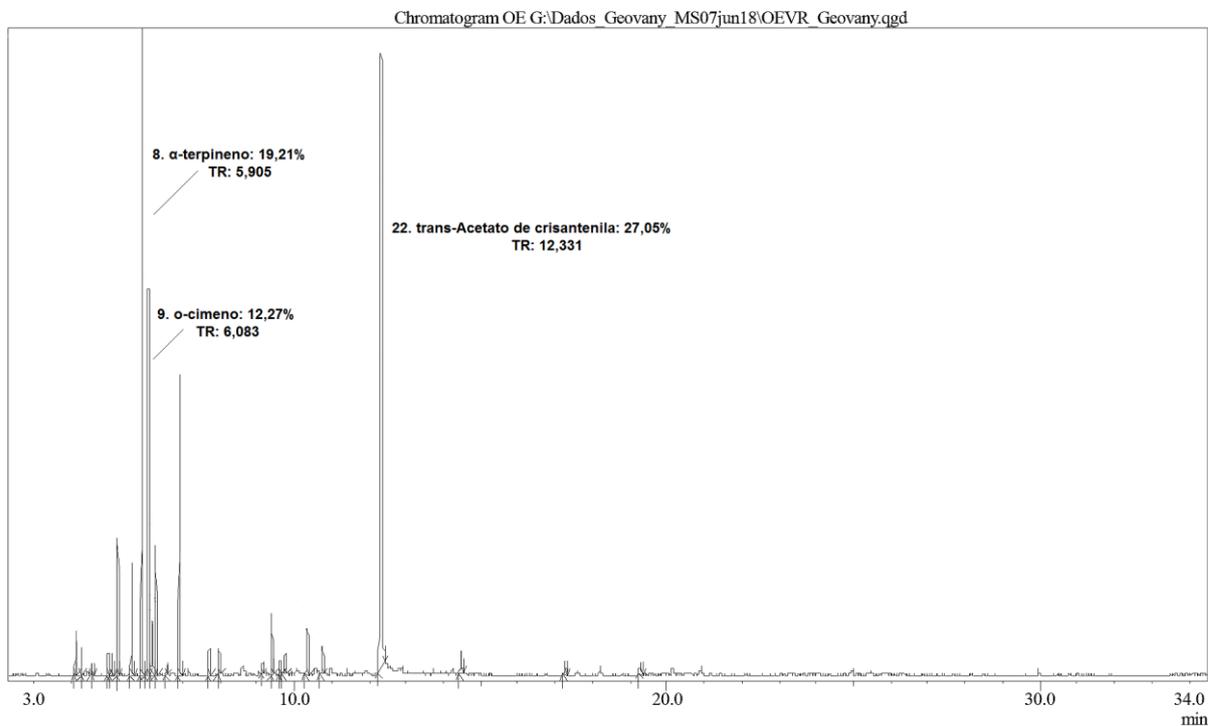
ANEXO F: CROMATOGRAMA E TABELA DE CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DO OECT

User Chromatograms



Pico	T _R GC/MS	Constituintes	%
1.	3,697	Triciclono	0,59
2.	3,735	α-Tujeno	1,18
3.	3,862	α-Pineno	4,58
4.	4,11	Canfeno	1,79
5.	4,511	Sabineno	0,38
6.	4,594	β-Pineno	0,40
7.	4,765	β-Mirceno	2,52
8.	5,077	α-Felandreno	8,98
9.	5,325	α-Terpineno	5,43
10.	5,491	p-Cimeno	28,24
11.	5,586	D-Limoneno	4,97
12.	5,65	1,8-Cineol	3,92
13.	6,248	γ-Terpineno	6,24
14.	7,005	Terpinoleno	0,31
15.	8,487	Cânfora	17,76
16.	8,824	Isoborneol	1,90
17.	9,079	Borneol	0,76
18.	9,41	Terpinen-4-ol	2,65
19.	9,823	α-Terpineol	1,07
20.	11,204	trans-Acetato de crisantenila	5,08
21.	12,635	Acetato de isobornila	0,20
22.	13,85	Acetato de mirtenila	0,39
23.	16,694	β-Cariofileno	0,13
24.	17,719	α-Humuleno	0,26
25.	21,523	Espatulenol	0,27

ANEXO G: CROMATOGRAMA E TABELA DE CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DO OECP



Pico	T _R GC/MS	Constituintes	%
1	4,135	α-tujeno	1,00
2	4,287	α-pineno	0,74
3	4,572	canfeno	0,24
4	4,996	sabineno	0,53
5	5,103	β-pineno	0,58
6	5,261	β-mirceno	3,65
7	5,633	α-felandreno	2,94
8	5,905	α-terpineno	19,21
9	6,083	o-cimeno	12,27
10	6,188	d,l-limoneno	1,64
11	6,277	1,8-cineol	3,33
12	6,579	β-trans-ocimeno	0,22
13	6,920	γ-terpineno	9,51
14	7,717	terpinoleno	0,83
15	7,977	????	-
16	9,138	???	-
17	9,399	cânfora	0,35
18	9,617	?????	-
19	9,756	isoborneol	0,63
20	10,352	terpinen-4-ol	1,68
21	10,753	α-terpineol	0,89
22	12,331	acetato de trans crisantenila	27,05
23	14,47	????	-
24	17,263	β-elemeno	0,92
25	19,288	α-humuleno	0,36

<i>S. aureus</i> 4										
--------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ANTIBIOGRAMA					
Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e as concentrações inibitórias mínimas correspondentes					
Espécie bacteriana Gram-positiva	Antimicrobiano testado				
	TEI	TIG	TRIM+SUL	VAN	ÁC. FUS.
<i>S. aureus</i> 1					
<i>S. aureus</i> 2					
<i>S. aureus</i> 3					
<i>S. aureus</i> 4					

*Benzilpenicilina (BZP), ciprofloxacina (CIP), clindamicina (CLIN), eritromicina (ERT), gentamicina (GNT), linezolidina (LIN), moxifloxacina (MOX), norfloxacina (NOR), oxacilina (OXA), rifampicina (RIP), teicoplanina (TEI), tigeciclina (TIG), trimetoprim/sulfametoxazol (TRIM+SUL), vancomicina (VAN) e ácido fusídico (Ác. Fus.)

APÊNDICE B: SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO


CENTRO UNIVERSITÁRIO INTA – UNINTA

**SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO**

Título do projeto: Avaliação antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de planta do nordeste brasileiro contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Pesquisador Responsável: Victor Alves Carneiro

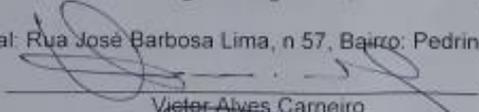
Nome da pesquisadora-orientanda: Ramaiana Soares Melo

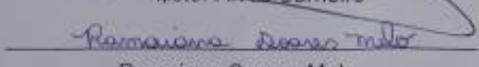
Dados do Comitê de ética Proponente:
Nome: Instituto Superior de Teologia Aplicada - INTA
Email: cep@inta.edu.br
Telefone: (88)3112-3500
Endereço: Rua Coronel Antônio Rodrigues Magalhães, n 700, Bairro: Dom Expedito – Sobral – CE

Dados do Comitê de ética Coparticipante:
Nome: Santa Casa de Misericórdia de Sobral
Email: cep@stacasa.com.br
Telefone: (88)3112-0464
Endereço: Rua Antônio Crisóstomo de Melo, n 919, Bairro: Centro – Sobral – CE

Dados do pesquisador principal:
Nome: Victor Alves Carneiro
Email: viktorcarneiro@gmail.com
Telefone: (85)3252-8721
Endereço de trabalho: Rua Cel. Rodrigues Magalhães, 359 – D. Expedito Lopes, Sobral-CE.
Endereço residencial: Rua Joaquim Torres, n 550, Bairro: Joaquim Távora – Fortaleza – CE

Dados da orientanda:
Nome: Ramaiana Soares Melo
Email: ramaiana_soares@hotmail.com
Telefone: (88)999449680
Endereço de trabalho: Rua Cel. Rodrigues Magalhães, 359 – D. Expedito Lopes, Sobral-CE.
Endereço residencial: Rua José Barbosa Lima, n 57, Bairro: Pedrinhas, Sobral – CE


Victor Alves Carneiro


Ramaiana Soares Melo

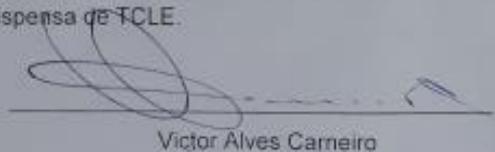
1/3

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do estado do Ceará:

Vimos por meio deste documento solicitar a dispensa de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o estudo intitulado "Avaliação antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de planta do nordeste brasileiro contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*." proposto por Victor Alves Carneiro e Ramaiana Soares Melo. A dispensa do uso de TCLE se fundamenta por ser um estudo que não utilizará o material biológico coletado para realizar a cultura bacteriana, serão utilizadas apenas as cepas bacterianas já isoladas do material coletado (oriundos de amostras de fluidos corporais, feridas e/ou ponta de cateter) pelos profissionais da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS) como parte da rotina de solicitação de exames médicos, além disso, não ocorrerá contato do pesquisador com os pacientes.

Essas cepas serão utilizadas nos estudos *in vitro* para verificar a ação antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial extraído de planta do nordeste brasileiro. A coleta de informações do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas será através do sistema computacional integrado ao VITEK[®]2 do laboratório de microbiologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS). Será um estudo sem intervenções clínicas e sem influências no tratamento dos pacientes, e consequentemente sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

Esse pedido de dispensa baseia-se também no trabalho de Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino (2016) sobre "Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil", em que a obtenção dos isolados foi realizado de forma semelhante, com dispensa de TCLE.



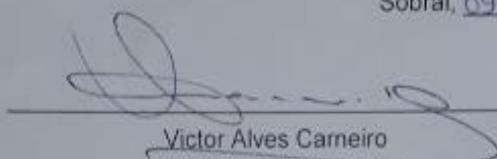
Victor Alves Carneiro



Ramaiana Soares Melo

O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados e as cepas bacterianas, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Resolução CNS Nº 466/12, e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Sobral, 09 de 01 de 2019



Victor Alves Carneiro



Ramaiana Soares Melo

3/3

APÊNDICE C - TERMO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS

 **CENTRO UNIVERSITÁRIO INTA**
Credenciado através da Portaria Ministerial N.º 831, de 11/07/2017 - D.O.U. 12/07/2017

Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

Nós, Victor Alves Carneiro (pesquisador principal) e Ramaiana Soares Melo (orientanda), do Centro Universitário INTA - UNINTA, do departamento de Mestrado em Biotecnologia, no âmbito do projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTA DO NORDESTE BRASILEIRO CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus*", comprometo-me com a utilização dos dados contidos no banco de dados integrado ao sistema VITEK® do laboratório de microbiologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, a fim de obtenção dos objetivos previstos, e somente após receber a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

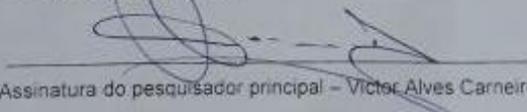
Nos comprometemos a manter a confidencialidade dos dados coletados nos no banco de dados, bem como com a privacidade de seus conteúdos. Esclareço que os dados a serem coletados se referem ao perfil de resistência aos antimicrobianos de cepas bacterianas isoladas de amostras biológicas como parte da rotina de exames do hospital, no período de janeiro a fevereiro de 2019.

Declaro entender que é da nossa responsabilidade de cuidar da integridade das informações e de garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas.

Também é da nossa responsabilidade de não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, à pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa.

Por fim, nos comprometemos com a guarda, cuidado e utilização das informações apenas para cumprimento dos objetivos previstos nesta pesquisa aqui referida.

09 de 02 de 2019 de 2019.


Assinatura do pesquisador principal - Victor Alves Carneiro


Ramaiana Soares Melo

Rua Cel Antônio Rodrigues Magalhães, 359, Bairro Dom Expedito Lopes
Sobral-CE | CEP: 62.050-100 | www.uninta.edu.br | Tel.: (88) 3112.3500