



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS**

GABRIEL LUCAS CARVALHO MELO

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton pluriglandulosus* CARN. -
TORRES & RIINA**

FORTALEZA

2024

GABRIEL LUCAS CARVALHO MELO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton pluriglandulosus* CARN. -TORRES &
RIINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M485a Melo, Gabriel Lucas Carvalho.

Avaliação da composição química, atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial de *Croton pluriglandulosus* Carn. -Torres & Riina / Gabriel Lucas Carvalho Melo. – 2024.
77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos.
Coorientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

1. Euphorbiaceae. 2. Produtos naturais. 3. Resistência antimicrobiana. 4. Biofilmes. I. Título.
CDD 660.6

GABRIEL LUCAS CARVALHO MELO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton pluriglandulosus* CARN. -TORRES &
RIINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel
Centro Universitário UNINTA

Prof.^a Dra. Kleane Targino Oliveira Pereira
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Aos meus pais José Maria e Gildete, a minha
irmã Misleide e a meus avós Antônia e
Sebastião (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus e a Virgem Santíssima por me guiarem em toda a minha jornada até agora.

Aos meus pais e minha irmã, que sempre estiveram ao meu lado e sempre serão meu alicerce em toda a minha vida.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira e Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos, pelos ensinamentos e pelo auxílio durante minha pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente Alexandre e Livia, que me auxiliaram muito no início da minha jornada em um ambiente novo, e a todos os outros que fazem ou fizeram parte do laboratório e que contribuíram para este trabalho: Ellen, Aryane, Isa, Caio, João Pedro, Kelva, Erlandia, Paula, Sofia, Tati e Itala.

As minhas amigas Dani, Rayara e Ellen, que me acolheram de braços abertos em Fortaleza e se fizeram casa. Obrigado por serem tão especiais; carrego vocês no meu coração, mesmo que nele não haja espaço suficiente para tamanha gratidão.

Ao meu amigo Leandro, que me incentivou a fazer o processo seletivo e me auxiliou durante todo ele, e aos meus professores da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, especialmente a Prof.^a Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque, por quem tenho imenso carinho e apreço.

As minhas amigas Tawanny e Jayssa, por estarem sempre comigo e por podermos sempre contar uns com os outros para chorar e fazer piadas que só nós conseguimos entender.

Aos amigos que fiz em Fortaleza, Ramon e Karla, sei que foi Deus quem os colocou em minha vida. Sou grato por todos os momentos de risadas, drinks e vivências compartilhadas. Obrigado.

A todos os meus amigos de longa data que me incentivaram e continuam a me incentivar a seguir em frente e buscar meus sonhos: Glória, Gabriel, Zafira, Zaira, Aparecida, Manoel, Eduarda, Carol Bessa e Allysson.

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

Segundo a Organização das Nações Unidas, a resistência antimicrobiana é um dos principais problemas de saúde mundial, intensificada pelo uso indiscriminado de antibióticos e a indisponibilidade de novos antimicrobianos. Ademais, muitos processos infecciosos estão associados a biofilmes, que aumentam a resistência dos patógenos. Para combater a resistência antimicrobiana, novos compostos estão sendo estudados, com destaque para produtos naturais como os óleos essenciais, que apresentam atividades antimicrobiana, bem relatadas na literatura. Logo, o objetivo do estudo, cerne em determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Croton pluriglandulosus* e avaliar sua atividade antibacteriana e antibiofilme sobre cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas. A atividade antibacteriana foi determinada através da avaliação, da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima em concentrações de 10 a 0,156 mg/ml. A atividade antibiofilme foi avaliada pela quantificação de biomassa com cristal violeta e pela contagem de células viáveis através da enumeração de unidades formadoras de colônias. Para determinar os possíveis mecanismos de ação, os biofilmes tratados com o óleo essencial foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal de Varredura a Laser. O óleo essencial de *C. pluriglandulosus* demonstrou concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para cepas de *S. aureus* em concentrações de 10 e 5 mg/ml. Em relação a inibição da formação de biofilme, em geral, todas as cepas apresentaram reduções significativas de biomassa e número de UFCs quando tratados com óleo essencial de *C. pluriglandulosus*, entretanto, as cepas de *S. aureus* se mostraram mais sensíveis. Em biofilmes maduros, o tratamento com óleo essencial de *C. pluriglandulosus* não causou redução de biomassa para a maioria das cepas, exceto *E. coli*. Contudo, reduziu significativas o número de unidades formadoras de colônias, especialmente para *S. aureus*. As micrografias indicam que a ação antimicrobiana está diretamente ligada a danos estruturais nas membranas, como observado para *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados indicam que o óleo essencial de *C. pluriglandulosus* é promissor agente antimicrobiano com potencial para o tratamento de infecções causados de biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; produtos naturais; resistência antimicrobiana; biofilmes.

ABSTRACT

The United Nations says that antimicrobial resistance is one of the world's main health problems, intensified by the indiscriminate use of antibiotics and the unavailability of new antimicrobials. In addition, many infectious processes are associated with biofilms, which increase the resistance of pathogens. To combat antimicrobial resistance, new compounds are being studied, especially natural products such as essential oils, which have antimicrobial activities that have been well reported in the literature. The aim of this study was therefore to determine the chemical composition of the essential oil from the leaves of *Croton pluriglandulosus* and to evaluate its antibacterial and antibiofilm activity on gram-positive and gram-negative bacterial strains. The antibacterial activity was determined by evaluating the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration at concentrations of 10 to 0.156 mg/ml. Antibiofilm activity was assessed by quantifying biomass with crystal violet and by counting viable cells by enumerating colony-forming units. To determine the possible mechanisms of action, the biofilms treated with the essential oil were analyzed by Scanning Electron Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy. The essential oil of *C. pluriglandulosus* showed minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration for *S. aureus* strains at concentrations of 10 and 5 mg/ml. About inhibition of biofilm formation, in general, all the strains showed significant reductions in biomass and number of CFUs when treated with *C. pluriglandulosus* essential oil, however, the *S. aureus* strains proved to be more sensitive. In mature biofilms, treatment with *C. pluriglandulosus* essential oil did not cause a reduction in biomass for most strains, except *E. coli*. However, it significantly reduced the number of colony-forming units, especially for *S. aureus*. The micrographs indicate that the antimicrobial action is directly linked to structural damage to the membranes, as observed for *E. coli* and *S. aureus*. The results indicate that the essential oil of *C. pluriglandulosus* is a promising antimicrobial agent with potential for treating infections caused by biofilms of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli*.

Keywords: Euphorbiaceae; natural products; antimicrobial resistance; biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura química dos β -lactâmicos	17
Figura 2	– Mecanismos de aquisição de resistência a antibióticos	20
Figura 3	– Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos	21
Figura 4	– Resistência de <i>S. aureus</i> a oxacilina (MRSA)	24
Figura 5	– Resistência de <i>E. coli</i> a principais classes de antibióticos ao longo dos anos	27
Figura 6	– Modelo atual ampliado sobre o processo de formação de biofilme	30
Figura 7	– Registros georreferenciados de espécies de <i>Croton</i> ao redor do globo	31
Figura 8	– <i>Croton pluriglandulosus</i> Carn.-Torres & Riina	33
Figura 9	– Principais mecanismos de ação antibacteriano de óleos essenciais	35
Figura 10	– Aparelho de Clevenger	38
Figura 11	– Efeito do OCp sobre a formação de biofilmes de diferentes cepas de <i>S. aureus</i>	47
Figura 12	– Efeito do OCp sobre a formação de biofilmes de cepas de <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	48
Figura 13	– Efeito do OCp sobre biofilmes pré-formados de diferentes cepas de <i>S. aureus</i>	49
Figura 14	– Efeito do OCp sobre biofilmes pré-formados de cepas de <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	50
Figura 15	– Eletromicrografias da formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	51
Figura 16	– Eletromicrografias da formação de biofilme de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	52
Figura 17	– Micrografias de biofilmes pré-formados de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas utilizadas para os testes antimicrobianos	40
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de <i>Croton pluriglandulosus</i> Carn. -Torres & Riina	45
Tabela 3 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs) do óleo essencial de <i>Croton pluriglandulosus</i> contra bactérias gram-positivas e gram-negativas	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEC	<i>Escherichia coli</i> aderente-invasiva
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Cristal Violeta
D.O.	Densidade Óptica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DHPS	Diidropteroato Sintase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroaggregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeos
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
LPS	Lipopolissacarídeos
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
MHA	Mueller Hinton Ágar
MHB	Mueller Hinton Caldo
MM	Massa Molecular
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
OCp	Óleo Essencial De <i>Croton pluriglandulosus</i>
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial De Saúde
PMF	Força Próton Motriz
RAM	Resistência Antimicrobiana
TSA	Soja Tríptica Ágar
TSB	Soja Tríptica Caldo

UFC Unidades Formadoras de Colônia

VRSA *Staphylococcus aureus* Resistente a Vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	“Antibiotics: A short review”	16
2.2	Resistência antimicrobiana	19
2.3	Bactérias de interesse clínico	22
2.3.1	<i>Staphylococcus</i> spp.	22
2.3.2	<i>Escherichia coli</i>	26
2.4	Biofilmes	28
2.5	<i>Croton</i> spp.	31
2.5.1	<i>Croton pluriglandulosus</i> Carn. -Torres & Riina	32
2.6	Óleos essenciais	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	Coleta do material vegetal	38
4.2	Extração do óleo essencial	38
4.3	Determinação da composição química do óleo essencial de <i>Croton pluriglandulosus</i>	39
4.4	Microrganismos	39
4.5	Condições de cultura	40
4.6	Solubilização e diluição do óleo essencial	41
4.7	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)	41
4.8	Avaliação da atividade antibiofilme	42
4.8.1	<i>Quantificação da biomassa bacteriana</i>	42
4.8.2	<i>Determinação do número de células viáveis</i>	42
4.8.3	<i>Ensaio da ação do OCp em biofilmes pré-formado</i>	43
4.8.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	43
4.8.5	<i>Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)</i>	44
4.9	Análise estatística	44

5	RESULTADOS	45
5.1	Determinação da composição do óleo essencial de <i>Croton pluriglandulosus</i>	45
5.2	Determinação da CIMs e CBMs	45
5.3	Avaliação da atividade de OCp sobre a formação de biofilmes	46
5.4	Avaliação da atividade de OCp sobre biofilmes pré-formados	48
5.5	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
5.6	Análise de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos desempenharam um papel crucial para a revolução da medicina moderna, e a segunda metade do século XX ficou conhecida como a "era de ouro dos antibióticos". Esses fármacos abriram novas perspectivas no tratamento de várias doenças e desempenharam um papel fundamental para o êxito de procedimentos cirúrgicos invasivos (Ribeiro Da Cunha; Fonseca; Calado, 2019). No entanto, a partir da década de 1980, houve uma notável estagnação do surgimento de novas classes de antibióticos, resultando em uma lacuna significativa nas descobertas desde então (Nelson *et al.*, 2021).

A principal justificativa para essa lacuna no desenvolvimento de novos medicamentos está intimamente ligada a fatores econômicos na indústria farmacêutica, principalmente devido aos elevados custos envolvidos na pesquisa e ao desafio de garantir um retorno financeiro adequado para as empresas (Nelson *et al.*, 2021). A escassez de novos antibióticos, aliada à crescente resistência bacteriana, tem tornado as infecções progressivamente mais perigosas e difíceis de tratar, resultando em um notável aumento nas taxas de mortalidade em escala global (Bengtsson-Palme; Kristiansson; Larsson, 2018).

Atualmente, cerca de 80% das bactérias têm a capacidade de formar estruturas conhecidas como biofilmes (Flemming; Wuertz, 2019). Os biofilmes são caracterizados como comunidades biológicas complexas que podem aderir a superfícies ou permanecer suspensas, produzindo uma substância polimérica extracelular (SPE) composta principalmente por exopolissacarídeos. A matriz confere uma notável resistência às células do biofilme, tornando-as resistentes à ação de medicamentos (Muhammad *et al.*, 2020).

Essas comunidades microbianas podem desencadear processos infecciosos ao aderirem a dispositivos médicos, como próteses e cateteres, ou em tecidos de pacientes, tornando-os difíceis de tratar, muitas vezes exigindo a remoção dos dispositivos ou resultando em infecções crônicas (Sauer *et al.*, 2022). Devido ao impacto significativo que os biofilmes têm na saúde humana, as pesquisas direcionadas para o combate e prevenção desses biofilmes têm ganhado cada vez mais destaque, especialmente em relação a certas espécies como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (Van Harten *et al.*, 2017; Botelho; Grosso; Peixe, 2019).

O crescente aumento da resistência antimicrobiana (RAM) impulsiona a necessidade de buscar novos agentes antimicrobianos, a fim de combater processos infecciosos causados por microrganismos resistentes e seus biofilmes (Klein *et al.*, 2018). Nesse contexto, destaca-se o crescente interesse em explorar propriedade medicinais de plantas que possam

oferecer alternativas terapêuticas (Tavares; Seca, 2019). A história nos revela, que ao longo dos anos, os produtos naturais sempre estiveram associados ao tratamento de diversas doenças infecciosas, oferecendo alternativas terapêuticas (Melander; Basak; Melander, 2020). Entre os diversos compostos naturais, os óleos essenciais (OEs) se destacam. Os OEs consistem em substâncias voláteis que contêm diversos componentes bioativos, responsáveis pelas propriedades inseticidas e antimicrobianas de algumas espécies vegetais (Yang *et al.*, 2018).

Dentro do grupo de plantas produtoras de óleos essenciais, o gênero *Croton* se destaca pelo seu significativo valor econômico, decorrente de sua ampla aplicação na medicina tradicional (Abbas; Tahir, 2020). Os óleos essenciais obtidos a partir de espécies de *Croton* são ricos em compostos, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (Ferreira *et al.*, 2020). No Brasil, já foram identificadas e catalogadas mais de 350 espécies de *Croton*, exibindo uma ampla variedade de componentes em seus óleos essenciais. Dentre essas espécies, há inúmeros relatos encontrados na literatura sobre a ação antibacteriana de alguns óleos essenciais, como os óleos extraídos de *C. tetradenius*, *C. pulegioidorous*, *C. ferrugineus* e o *C. blanchetianus* (Siqueira *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2021; Valarezo *et al.*, 2021; Nunes *et al.*, 2023). No entanto, há carência de estudos que explorem o potencial antibacteriano do óleo essencial de *Croton pluriglandulosus* (RIINA *et al.*, 2021).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a composição química do óleo essencial de *Croton pluriglandulosus*, além de avaliar a sua atividade antibacteriana, antibiofilme, sobre a bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Antibióticos: Uma breve revisão

Atualmente, os antibióticos representam a classe mais significativa de produtos farmacêuticos e são reconhecidos como a inovação médica mais impactante do século XX, desempenhando um papel essencial para o tratamento de infecções bacterianas, salvando inúmeras vidas ao longo do tempo (Ribeiro Da Cunha; Fonseca; Calado, 2019). Além disso, essas drogas são essenciais para o êxito de diversas cirurgias invasivas, como em transplantes de órgãos, tratamento com imunomoduladores e dentre outros (Ventola, 2015).

A era pré-antibiótica compreende o período em que inúmeras doenças e epidemias surgiram, e a compreensão da relação entre microrganismos e doenças era desconhecida. Os métodos de tratamento e prevenção de processos infecciosos eram praticamente ineficazes, o que frequentemente resultava em um aumento da disseminação das enfermidades, às vezes atingindo proporções pandêmicas (Jayachandran, 2018). Nesse contexto, um dos problemas mais significativos foi o surgimento de epidemias, como a Peste Justina, que ceifou a vida de aproximadamente 100 milhões de pessoas, e a Peste Negra no século XIV, vitimizando mais de 50 milhões de europeus (Mohr, 2016). No entanto, hoje em dia, essas epidemias poderiam ser controladas com o auxílio de antibióticos (Galy et al., 2018).

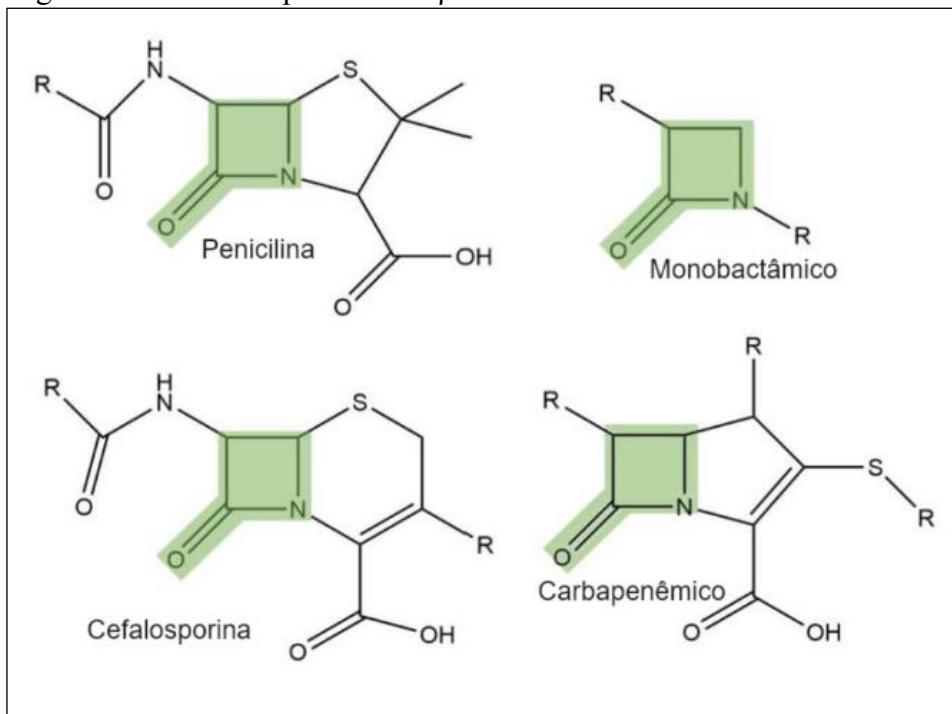
Antes da descoberta do primeiro antibiótico comercial por Alexander Fleming, diversos pesquisadores haviam iniciado seus estudos acerca de drogas que inibissem o crescimento bacteriano. O ácido micofenólico, considerada a primeira descoberta, foi identificado em 1893 por Bartolomeo Gosio, e demonstrou a capacidade de inibir o crescimento de *Bacillus anthracis*, porém sua utilização para fins médicos foi esquecida e retomada apenas posteriormente por outros pesquisadores (Mohr, 2016). Em 1909, o microbiologista Paul Ehrlich descobriu o Salvarsan, um antibiótico sintético derivado do arsênio, que se mostrou eficaz contra o *Treponema pallidum*, a bactéria causadora da sífilis. Entretanto, o Neosalvarsan posteriormente o substituiu, pois era mais eficaz no tratamento da sífilis. Com o tempo, tornou-se evidente o risco dessas substâncias devido à presença de arsênio em sua composição, levando à sua substituição pelo Prontosil, o primeiro da classe das sulfonamidas, descoberto por Gerhard Domagk em 1930 (Digiandomenico; Sellman, 2015).

Ao longo do tempo, o Prontosil e fármacos relacionados foram substituídos pela penicilina devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana causada por mutações na enzima diidropteroato sintase (DHPS), comprometendo assim eficácia do Prontosil (Golkar;

Bagasra; Pace, 2014). Em 1928, Alexander Fleming descobriu por acaso que o fungo *Penicillium notatum* inibia o crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus*. Tal descoberta o levou a especular que os fungos produziam uma substância com a capacidade de inibir o crescimento das bactérias. Em 1929, ele então consegue isolar essa substância e a denomina de penicilina, sendo considerada o primeiro antibiótico verdadeiro (Tan; Tatsumura, 2015). No entanto, seu uso clínico efetivo só se tornou realidade em 1945 (Gaynes, 2017).

Posteriormente, a estrutura da penicilina foi elucidada por meio de técnicas de cristalografia de raios X, permitindo classificar essa substância como membro da família dos β -lactâmicos naturais. Compostos derivados dessa família, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, possuem um anel-lactâmico em sua estrutura (Figura 1), em que seu mecanismo de ação cerne na interferência direta da biossíntese da parede celular de bactérias gram-positivas (Uddin et al., 2021).

Figura 1 – Estrutura química dos β -lactâmicos



Fonte: Adaptada de Abbas; Salih; Hassan, (2022).

A "era de ouro dos antibióticos" teve início com os estudos pioneiros de René Dubos em 1939, ao isolar a tirotricina a partir de bactérias encontradas no solo. Essa substância demonstrou eficácia contra cepas gram-positivas (Mohr, 2016). Posteriormente, na década de 1940, Selman Waksman conduziu uma extensa investigação sobre as propriedades antimicrobianas das bactérias do solo. Durante esse período, Waksman descobriu diversas

espécies de bactérias com atividades antagônicas entre si, resultando no desenvolvimento de vários antibióticos e antifúngicos, incluindo a neomicina, estreptomicina e outros que ainda são utilizados atualmente (Ribeiro Da Cunha; Fonseca; Calado, 2019).

O trabalho de Waksman desempenhou um papel fundamental na propulsão da denominada "época de ouro dos antibióticos". Através de seus estudos pioneiros, ele estabeleceu a base inicial para o desenvolvimento de uma série de novos medicamentos antibióticos pelas indústrias farmacêuticas (Gould, 2016). Esse período de avanços culminou na criação de diversas classes de antibióticos, tais como nitrofurano (1953), macrolídeos (1952), tetraciclinas (1948), quinolonas (1960) e oxazolidinonas (1987). No entanto, esse avanço rápido em um período relativamente curto também trouxe consigo o uso excessivo de antibióticos, o que, infelizmente, foi seguido por uma redução nas pesquisas nessa área desde a década de 70 (Nicolaou; Rigol, 2018). Isso resultou em uma escassez de novas famílias de antibióticos, e nos últimos 50 anos, nenhuma nova classe de antibióticos foi descoberta ou desenvolvida (Durand; Raoult; Dubourg, 2019).

Na atualidade, poucas empresas farmacêuticas se dedicam ao desenvolvimento de antibióticos, transferindo essa responsabilidade para empresas menores, como as startups de biotecnologia. Dados de 2018, mostram que de 45 novos antibióticos candidatos a ensaios clínicos, apenas 2 eram provenientes de grandes empresas farmacêuticas (Nicolaou; Rigol, 2018). O principal problema nesse cenário de escassez de novos medicamentos está diretamente relacionado à resistência antimicrobiana (RAM). No passado, a solução para a resistência bacteriana era relativamente simples, pois havia uma ampla variedade de opções disponíveis, permitindo a substituição dos medicamentos quando as bactérias se tornavam resistentes. Contudo, ao longo dos anos, a falta de novos medicamentos e o crescente problema da RAM, impulsionado pela pressão seletiva exercida por esses fármacos antimicrobianos, transformaram-se em uma preocupação global emergente (Dodds, 2017).

Desde a década de 1980, a carência de desenvolvimento de novos antibióticos tem sido uma questão alarmante. Atualmente, são limitadas as alternativas para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, por vezes essas alternativas sequer existem (Frieri; Kumar; Boutin, 2017). Somado a isso, a produção de antibióticos impõe desafios significativos à indústria farmacêutica, dada a necessidade de investimentos substanciais em pesquisa nesse campo, juntamente com a crescente resistência microbiana, torna o desenvolvimento de novos medicamentos uma tarefa complexa. Além desse fator, a perspectiva de retornos financeiros relativamente baixos desencoraja as empresas farmacêuticas a se envolverem nesse ramo (Plackett, 2020).

Atualmente, estamos vivendo o que é chamado de "era pós-antibiótica", na qual os antibióticos convencionais estão tornando-se ineficazes para o tratamento de infecções devido o surgimento de bactérias multirresistentes. Contudo, diversas colaborações entre instituições acadêmicas e empresas privadas, buscam novas estratégias para combater essas infecções (Subramaniam; Girish, 2020).

2.2 Resistência antimicrobiana

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana (RAM) é identificada como uma das 10 principais ameaças à saúde global. Este fenômeno é inerente e natural aos microrganismos, resultante da intensa pressão seletiva gerada pela exposição aos antibióticos. Um exemplo notório é a resistência à penicilina, esse fármaco foi introduzido no mercado no ano de 1941 e no ano seguinte, em 1942, foi identificado cepas de *S. aureus* resistentes a essa classe de medicamentos (Subramaniam; Girish, 2020).

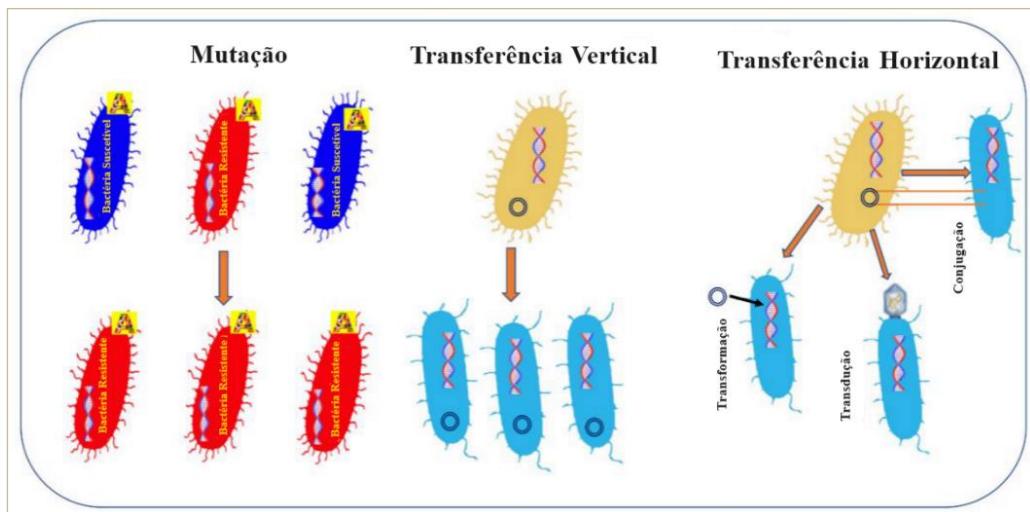
Atualmente, a RAM provoca cerca de 70.000 mortes anuais em todo o mundo. Previsões alarmantes indicam que esse número pode aumentar significativamente, chegando a 10 milhões de mortes anuais até 2050 (Aslam *et al.*, 2018). Relatórios provenientes da Índia apontam que a cada 9 minutos, uma criança morre devido a infecções causadas por bactérias resistentes (Subramaniam; Girish, 2020). Em 2017, foram registrados mais de 558.000 casos de tuberculose resistente em todo o mundo, e desses, 230.000 resultaram em óbito (Ballesteros *et al.*, 2020). Essas informações relacionam-se a crescente ameaça da resistência antimicrobiana frente a saúde global.

Durante a pandemia de SARS-CoV-2, cidades como Nova Iorque relataram um aumento significativo na resistência antimicrobiana (Guimarães; Carvalho, 2020). Por exemplo, isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mostraram um aumento superior a 10% na resistência a múltiplos antibióticos, incluindo ciprofloxacina e piperacilina-tazobactam. Da mesma forma, *Klebsiella pneumoniae* demonstrou resistência crescente a carbapenêmicos, um grupo crucial de antibióticos usados para tratar infecções graves (Nori *et al.*, 2021). Esse aumento na resistência foi associado ao uso excessivo e muitas vezes inadequado de antibióticos durante a pandemia.

No que diz respeito aos mecanismos de aquisição de resistência das bactérias aos antibióticos, atualmente já se tem conhecimento de vários. A transferência de resistência em patógenos pode ser categorizada em dois tipos: natural, dividida em intrínseca e induzida, e adquirida. A resistência intrínseca ocorre quando a bactéria possui naturalmente resistência a

certos tipos de fármacos, independente de exposições anteriores. A resistência induzida é ativada pela exposição a quantidades clínicas de antibióticos, resultando na ativação de genes que conferem resistência (Bem *et al.*, 2019). A resistência adquirida tem duas formas: por meio de mutações no DNA celular durante a replicação, nas quais as cepas mutantes transmitem genes verticalmente para a prole, e por meio de transferência horizontal de genes, envolvendo processos como transformação, transdução e conjugação (Figura 2) (Friedrich, 2019).

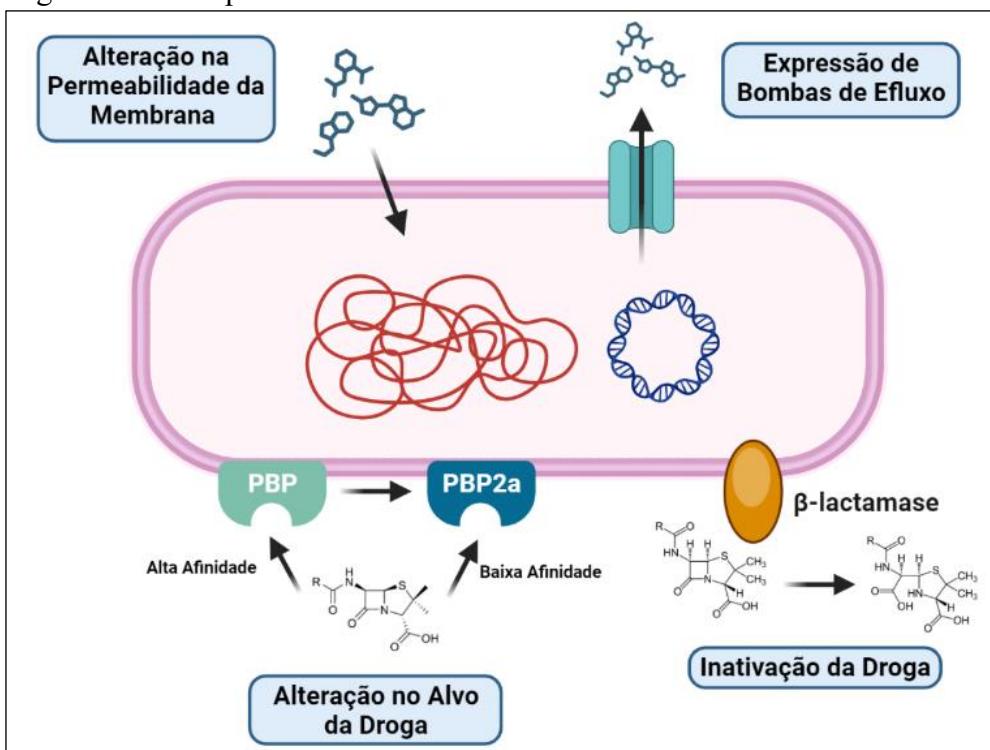
Figura 2 – Mecanismos de aquisição de resistência a antibióticos.



Fonte: Adaptada de Mancuso *et al.*, (2021).

Os processos de resistência bacteriana não são atribuíveis a um único mecanismo, muitas vezes envolve uma interação complexa de múltiplos processos intrínsecos da estrutura celular bacteriana, que podem ser categorizados em três tipos principais: Redução das concentrações intracelulares; modificações do antibiótico e inativação do antibiótico (Blair *et al.*, 2015) (Figura 3).

Figura 3 – Principais Mecanismos de Resistência a Antimicrobianos.



Fonte: Elaborada pelo autor com base em Mancuso *et al.*, (2021).

As bactérias podem reduzir as concentrações intracelulares de antibióticos de duas maneiras principais. Primeiramente, a diminuição da permeabilidade da membrana bacteriana, resultante de processos de mutação que diminui a expressão de porinas na membrana, impedindo a entrada de antibióticos nas células, sendo bem documentada em microrganismos gram-negativos como *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* (Kong *et al.*, 2018). Além disso, as bactérias podem expressar bombas de efluxo específicas em suas membranas para expulsar moléculas-alvo do interior celular, como demonstrado em estudos com isolados clínicos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, que apresentaram superexpressão de bombas de efluxo de drogas (Kosmidis *et al.*, 2012).

Outro mecanismo de resistência antimicrobiana ocorre devido a mutações espontâneas ou modificações pós-tradução em moléculas alvo dos antibióticos, podendo resultar em alterações conformacionais que comprometem a eficácia do medicamento. (Hooper; Jacony, 2015). Além disso, a resistência também pode surgir de forma direta, com a transferência de grupos químicos para locais específicos do antibiótico, impedindo sua ligação ao alvo na célula bacteriana (Qin *et al.*, 2012).

O aumento notável de cepas resistentes ao longo dos últimos anos não pode ser atribuído a um único elemento independente, mas sim a uma complexa interação de diversos fatores que atuam em conjunto para moldar esse cenário global (Mahmoud *et al.*, 2018). A

pressão seletiva é um desses fatores e pode ser compreendida como o mecanismo pelo qual as condições ambientais favorecem a sobrevivência e reprodução de indivíduos com características específicas (Holmes *et al.*, 2016).

A imprecisão no diagnóstico é um fator agravante. Com frequência, em situações de incerteza sobre o agente infeccioso, seja vírus ou bactéria, os profissionais de saúde podem prescrever antibióticos, embora esses medicamentos sejam ineficazes contra vírus e possam contribuir para o desenvolvimento de resistência (Marc *et al.*, 2016). A prescrição inadequada também pode desencadear processos de resistência, quando os profissionais optam por medicamentos de amplo espectro, quando um antibiótico de espectro mais restrito seria mais apropriado (Zhao *et al.*, 2019).

A automedicação também desempenha um papel significativo no surgimento de resistência, colocando os indivíduos em risco de reações adversas a droga e mascarando os sinais e sintomas das doenças, que muitas vezes não são causadas por um patógeno bacteriano, agravando ainda mais esse cenário (Nepal; Bhatta, 2018). A falta de rigor aos protocolos de biossegurança em ambientes hospitalares é outra preocupação significativa podendo resultar no surgimento de patógenos resistentes. Tanto pacientes quanto funcionários carregam microbiotas em seus corpos e roupas, e na ausência das medidas de biossegurança adequadas, essas comunidades microbianas, que podem incluir bactérias com genes de resistência, têm o potencial de se espalhar para fora do ambiente hospitalar (Almagor *et al.*, 2018).

Os antibióticos desempenham um papel crucial na medicina, sendo usados tanto em seres humanos quanto em animais para tratar infecções. Além disso, eles também são utilizados como promotores de crescimento na pecuária, melhorando o ganho de peso dos animais (Ronquillo; Hernandez, 2017). Contudo, essas práticas podem desencadear um aumento da RAM, com o potencial de afetar os seres humanos por intermédio das cadeias alimentares (Almagor *et al.*, 2018). Atualmente, a escassez de novas classes de antibióticos é uma preocupação crescente. A redução significativa do investimento em pesquisas para o desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica resultou em opções limitadas de tratamento (Sreeja *et al.*, 2017).

2.3 Bactérias de interesse clínico

2.3.1 *Staphylococcus spp.*

O gênero *Staphylococcus* é caracterizado por bactérias gram-positivas, que tendem

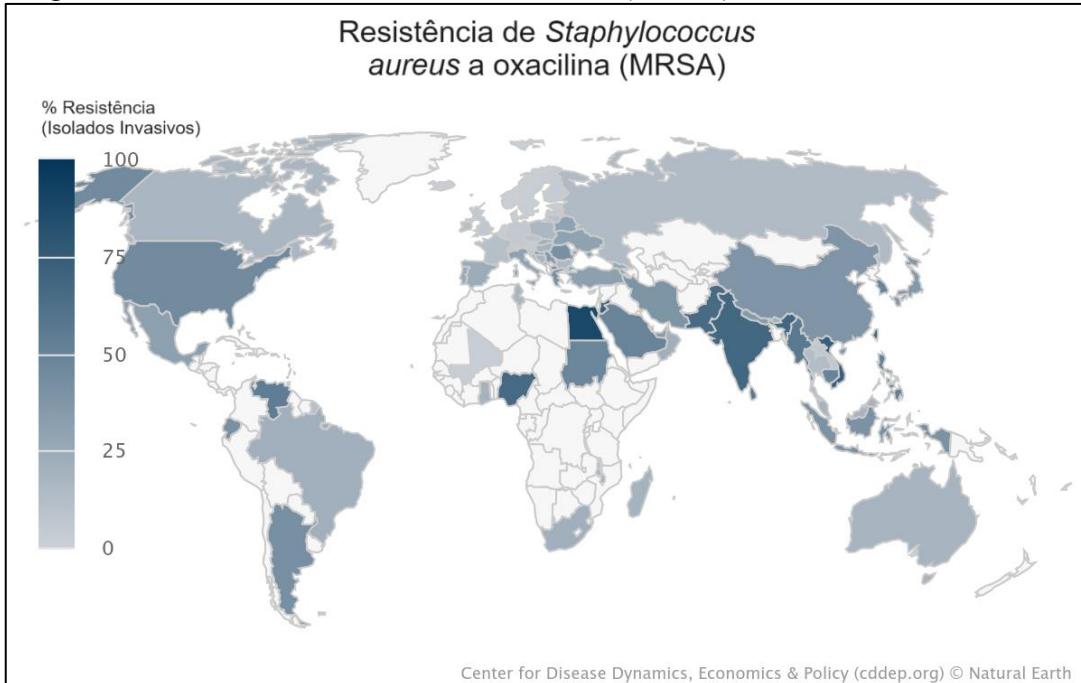
a se agrupar em pares, assemelhando-se a cachos de uva. A maioria das espécies são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, e apresenta uma taxa de reprodução rápida em condições de cultivo a 37 °C. As colônias exibem bordas de aspecto rugoso e uma coloração amarelo ouro (Rezaei, 2022). As espécies podem ser classificadas em dois grupos distintos: coagulase positiva e coagulase negativa. Essa diferenciação está relacionada à capacidade dessas bactérias de coagular o plasma sanguíneo, um fenótipo frequentemente associado a processos infecciosos. Em geral, as espécies coagulase positiva estão associadas a infecções mais graves (Pickering *et al.*, 2021).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota natural da pele e mucosas, sendo a maioria das espécies inofensivas para os seres humanos (Kellerman *et al.*, 2022). No entanto, em circunstâncias específicas, essas bactérias podem adotar comportamentos oportunistas, desencadeando diversos tipos de infecções em humanos e animais. Na maioria dos casos, essas infecções são superficiais e leves, mas podem se tornar graves quando afetam pacientes neonatais, indivíduos imunocomprometidos ou em tratamento intensivo (Rezaei, 2022).

Os implantes médicos, embora representem uma tecnologia em constante progresso que tem revolucionado a medicina, enfrentam desafios relacionados a infecções bacterianas podendo levar à perda desses dispositivos. Bactérias têm a capacidade de aderir e formar biofilmes na superfície de cateteres venosos, implantes mamários e outros dispositivos médicos (Lakhundi; Zhang, 2018). Em um estudo realizado com 85 pacientes submetidos à nutrição parenteral, 19% deles apresentaram infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateter venoso central (ICSCV). O gênero predominante nesse tipo de infecção foi o *Staphylococcus* spp., representando aproximadamente 44% das ocorrências. Dentro desse grupo, as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* foram as mais comuns (Parra-Flores *et al.*, 2017). Atualmente, o tratamento dessas infecções envolve a administração de elevadas doses de antibióticos com múltiplos mecanismos de ação, bem como o revestimento de superfícies de implantes com antibióticos. No entanto, essa abordagem pode resultar em pressões seletivas sobre microrganismos, levando ao surgimento de genes de resistência (Wang *et al.*, 2016).

S. aureus, uma espécie coagulase positiva, está estreitamente associada a infecções em seres humanos, sendo suas principais ocorrências registradas em ambientes comunitários e hospitalares (Bennett; Dolin; Blaser, 2020). A preocupação com problemas de saúde relacionados a essa espécie não é recente. Atualmente relatórios globais destacam o crescente risco epidemiológico associado a esse microrganismo, particularmente no que se refere à resistência a drogas, conforme ilustrado na Figura 4 (Chang; Lin, 2018; Tacconelli *et al.*, 2018).

Figura 4 - Resistência de *S. aureus* a oxacilina (MRSA).



Fonte: <https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>.

Essa espécie normalmente coexiste no organismo humano, mas pode se tornar oportunista, causando infecções em tecidos moles, pele, feridas, bem como bactеремia e osteomielite (Nadimpalli *et al.*, 2018). Recentemente, tem sido considerada uma das principais causadoras de infecções nosocomiais, colonizando uma variedade de áreas, incluindo superfícies de mobília hospitalar, e podendo persistir nesses ambientes por meses (Centeleghe *et al.*, 2022; Viancelli *et al.*, 2022).

S. aureus também é conhecida devido aos processos de desenvolvimento de resistência aos antibióticos (Papa *et al.*, 2013). Um exemplo foi o desenvolvimento da cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) um ano após o desenvolvimento do fármaco, e hoje essa cepa é uma das mais prevalentes em infecções nosocomiais (Kaur *et al.*, 2022). Posteriormente, como forma de tratar as infecções ocasionadas por essa cepa, a vancomicina foi introduzida, contudo o seu uso culminou no surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) (Loomba; Taneja; Mishra, 2010). Além disso, existem cepas de *S. aureus* que apresentam resistência intermediária a antibióticos, sendo a resistência à vancomicina (VISA) uma das mais comuns em processos infecciosos. Estas cepas geralmente estão associadas a infecções mais graves e prolongadas em comparação com cepas suscetíveis (Vestergaard; Frees; Ingmer, 2019).

Durante a pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, vários autores observaram

uma elevada incidência de coinfecções com *S. aureus*. Além disso, esses casos foram associados a taxas mais elevadas de mortalidade (Silva *et al.*, 2021; Polly *et al.*, 2022). Estudos feitos por Wu *et al.* (2021) mostram o aumento gradativo da prevalência de cepas de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) e *S. aureus* resistente à meticilina e vancomicina (VRSA e MRSA), na qual em 2020 foi registrado a maior prevalência dessas duas cepas.

Os custos associados às infecções causadas por *S. aureus* são incertos e, embora possam variar, estima-se que cheguem a valores significativos, oscilando de milhares a milhões de euros gastos anualmente no tratamento dessas infecções (Antonanzas; Lozano; Torres, 2015). Os fatores de virulência associados a esse patógeno incluem a capacidade de formar biofilmes e estruturas que facilitam a aderência e proteção das bactérias em superfícies, tornando-as mais resistentes aos tratamentos convencionais. Além disso, *S. aureus* é conhecida por produzir enzimas específicas que induzem efeitos citolíticos (Foster, 2009).

A espécie *S. epidermidis* é amplamente estudada dentro do grupo das coagulase negativas e é considerada um comensal que coloniza a pele humana desde o nascimento. Essa bactéria pode ser encontrada em diversas áreas da pele, incluindo regiões secas, úmidas, sebáceas e nos pés, desempenhando um papel bem estabelecido na promoção da imunidade e na manutenção da microbiota da pele (Nguyen *et al.*, 2017). Dados recentes indicam que o *S. epidermidis* pode também fazer parte da microbiota de outras partes do corpo, como as vias aéreas e o trato intestinal (Soeorg *et al.*, 2017).

Apesar de ser uma bactéria saprófita, *S. epidermidis* pode assumir o papel de um patógeno oportunista, podendo ocasionar complicações graves em neonatos, além de infectar dispositivos médicos (Nguyen *et al.*, 2017). As sépsis em recém-nascidos representam uma das principais complicações médicas nesta população e, em muitos casos, estão relacionadas a cepas de *S. epidermidis* (Dong; Speer, 2015). A taxa de mortalidade dessas sépsis varia de 1,9% a 4,8% em neonatos em geral, mas aumenta significativamente para 9,4% nos casos de recém-nascidos com baixo peso (Lee; Chang; Kim, 2015).

Essa espécie também apresenta cepas com resistência a antibióticos, o que a tornam um patógeno preocupante nos ambientes hospitalares, especialmente devido à resistência à meticilina (MRSE). Essas cepas geralmente são resistentes contra a maioria dos β-lactâmicos, resultando em elevados custos para o tratamento dessas infecções (Wang *et al.*, 2020).

Os principais fatores de virulência de *S. epidermidis* cerne em sua habilidade de criar biofilmes em superfícies de materiais implantados e em tecidos. Além disso, grande parte do êxito de sua patogenicidade advém da sua capacidade de evitar a resposta do sistema imunológico inato, o que pode culminar no desenvolvimento de doenças crônicas (Le; Park;

Otto, 2018).

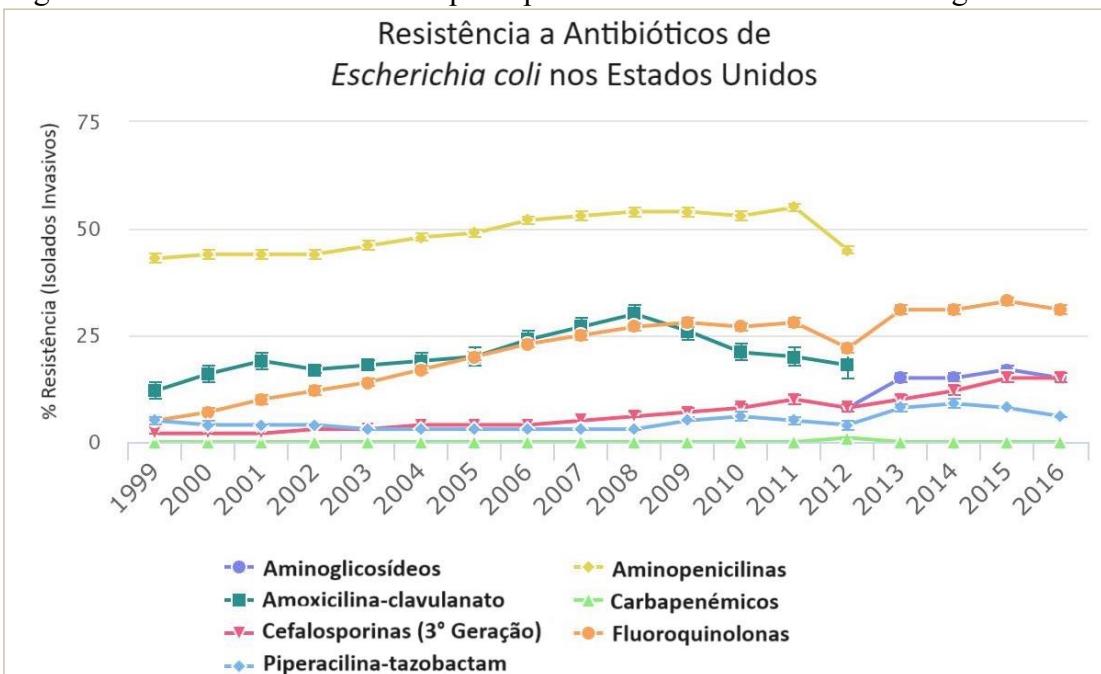
2.3.2 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria gram-negativa com forma de bastonete e faz parte da família Enterobacteriaceae. Esse microrganismo habita o trato gastrointestinal humano desde o nascimento, estabelecendo uma relação de benefício mútuo e coexistindo sem causar efeitos adversos. No entanto, em alguns casos, pode desencadear doenças em pacientes imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas (Poolman; Anderson, 2018). *E. coli* é uma das principais espécies frequentemente associadas a casos de bactеремia em países de elevado rendimento, superando em número as espécies tradicionalmente relacionadas a esse tipo de infecção, como o *S. aureus* (Poolman; Anderson, 2018).

As infecções não complicadas do trato urinário apresentam uma relevância substancial para a saúde, na qual 80% dessas infecções são atribuídas à *E. coli*, com impacto predominante na população feminina (Kang *et al.*, 2018). Além disso, essa bactéria é também responsável pela incidência de diarreia infecciosa, uma questão de saúde global, que afeta principalmente regiões menos desenvolvidas e resulta em mais de 157.000 óbitos anualmente (Madhavan; Sakellaris, 2015).

A aquisição de resistência por cepas de *E. coli* representa um desafio complexo, com implicações sérias para a saúde, incluindo riscos que podem alavancar as taxas de mortalidade. A crescente resistência dessas cepas às drogas disponíveis no mercado cria uma série de obstáculos para o tratamento das infecções (Trepanier *et al.*, 2017). Esse cenário é agravado pelas enterobactérias, que têm a capacidade de abrigar genes de resistência e transferi-los horizontalmente por meio de plasmídeos para outras bactérias, como a *E. coli*, acelerando consideravelmente o processo de aquisição de resistência em um curto espaço de tempo (Trepanier *et al.*, 2017). O aumento latente da resistência de *E. coli* ao longo dos anos pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Resistência de *E. coli* a principais classes de antibióticos ao longo dos anos



Fonte: <https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>.

Como salientado anteriormente, a *E. coli* é responsável por uma variedade de processos infecciosos, tanto no intestino como em outras partes do corpo. Para melhor classificar e facilitar a compreensão dos diferentes tipos de cepas dessa bactéria, ela foi subdividida em sete patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroaggregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* aderente-invasiva (AIEC). Todos esses patótipos estão associados a infecções intestinais, mas é importante notar que o EHEC está mais relacionado a distúrbios extraintestinais (Alegbeleye; Sant'ana, 2020).

Os fatores de virulência das diversas cepas *E. coli* são constituídos por moléculas específicas codificadas por genes que podem ser encontrados nos cromossomos, plasmídeos ou transposons. A virulência da *E. coli* é inerente e varia entre os diferentes patótipos, podendo ser classificada em quatro categorias principais: colonização, aptidão, toxinas e efetores (ALEGBELEYE; SINGLETON; SANT'ANA, 2018).

Os fatores de virulência relacionados à colonização geralmente estão associados a processos de adesão, fixação, agregação e formação de biofilmes. Os fatores de aptidão desempenham funções essenciais em processos de sinalização para a detecção de quorum sensing (QS) e na produção de proteínas em resposta a estresses. Outros fatores estão relacionados a toxinas, como o próprio nome sugere, exercem funções de toxicidade no organismo, incluindo toxinas notáveis como a shiga, ST-I e ST-II. Por fim, as ações efetoras

estão ligadas a processos que abrangem a evasão do sistema imunológico, a inibição da fagocitose e a indução da morte celular (PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN, 2021).

2.4 Biofilmes

Nas últimas décadas, os cientistas têm categorizado o estilo de vida bacteriano em dois principais tipos: o planctônico, no qual as bactérias se encontram como células únicas, flutuando de maneira independente, e o estilo de vida em forma de agregados, conhecido como biofilmes. Tradicionalmente, o termo biofilme sempre esteve associado a uma comunidade bacteriana desenvolvida sob uma superfície, tanto bióticas quanto abióticas. No entanto, pesquisas recentes indicam que esses agregados bacterianos também podem ser encontrados não aderidos a uma superfície. Então hoje, as infecções crônicas causadas por biofilmes são classificadas em dois tipos: aquelas associadas a uma superfície e aquelas não aderidas a uma superfície (Sauer *et al.*, 2022).

As infecções causadas por biofilmes, quando associadas a uma superfície, costumam estar relacionadas a dispositivos médicos, como próteses, cateteres e sistemas de ventilação. Por outro lado, as infecções que não estão vinculadas a superfícies geralmente afetam o trato respiratório, envolvendo a depuração mucociliar, ou se manifestam como infecções crônicas em tecidos moles, associadas a comorbidades (Lebeaux *et al.*, 2013). Atualmente, estima-se que cerca de 80% das infecções bacterianas se apresentem na forma de biofilmes. O tratamento dessas infecções é uma tarefa desafiadora, pois se iniciam com processos inflamatórios leves podendo evoluir para um estado crônico (VAN WOLFEREN; ORELL; ALBERS, 2018).

Atualmente, o tratamento de infecções relacionadas a biofilmes em dispositivos médicos é realizado de diferentes maneiras, especialmente visando a prevenção da formação desses biofilmes. Uma das estratégias é a incorporação de agentes anti-incrustantes e antimicrobianos nos dispositivos, a partir do uso de produtos químicos sintéticos e antibióticos, permitindo uma liberação controlada e localizada dos agentes antimicrobianos (Koo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). Quando os biofilmes já estão formados, a terapia mais comum é o uso de antibióticos. Embora essas comunidades bacterianas apresentem mecanismos de resistência bem desenvolvidos, os antibióticos ainda são amplamente utilizados para tratar essas infecções (Chen; Suh; Yang, 2018).

Os biofilmes também ocasionam danos significativos na indústria alimentar, podendo entrar em contato com os alimentos e chegar aos consumidores finais, sendo

responsáveis por cerca de 60% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (Han *et al.*, 2017; Galie *et al.*, 2018). Além disso, os biofilmes desempenham um papel importante no desenvolvimento de diversas doenças, algumas das quais potencialmente fatais, como a fibrose cística, otite média, feridas crônicas e osteomielite (Masters *et al.*, 2019).

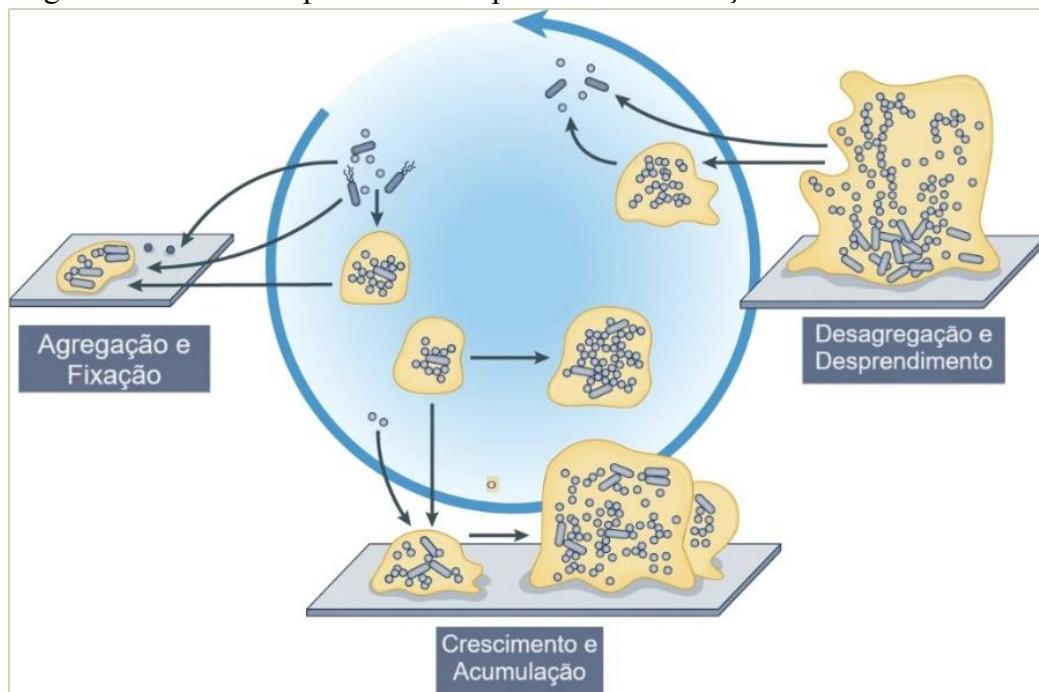
Essas comunidades microbianas possuem uma densa matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e substâncias insolúveis em água. A matriz, que corresponde cerca de 2/3 da massa do biofilme, desempenha diversas funções, incluindo a captura de materiais do ambiente externo, fornecendo nutrientes essenciais para o desenvolvimento do biofilme. A composição da matriz é influenciada pelas espécies microbianas que constituem o biofilme e pela sua fase de maturação (Choi *et al.*, 2020; Toyofuku; Nomura; Eberl, 2019; Pinto *et al.*, 2019).

Estudos indicam que o processo de formação de um biofilme segue uma organização altamente regulada, semelhante ao desenvolvimento de um embrião (Futo *et al.*, 2021). No entanto, o modelo tradicional de formação de biofilme, baseado na observação do processo *in vitro* em *P. aeruginosa*, não consegue abranger a complexidade das estruturas que os biofilmes podem formar em ambientes fora do laboratório, sejam eles industriais, naturais ou clínicos. As interações entre as bactérias e o ambiente são intrinsecamente dependentes do contexto, resultando em variações na sequência dos processos de fixação, crescimento, maturação e desprendimento (Sauer *et al.*, 2022).

O modelo proposto por Sauer *et al.* (2022) abrange uma ampla variedade de condições, incluindo ambientes *in vitro*, *in situ*, *in vivo*. Eles consideram o processo de formação de biofilmes como um sistema aberto, reconhecendo que essas comunidades podem ser encontradas em locais como o intestino e vias aéreas, onde há continuamente a entrada de microrganismos que podem incorporar ao agregado multicelular.

Esse modelo atual e abrangente da formação de biofilmes, independe do tipo de superfície de iniciação e do tipo de célula, seja ela planctônica ou agregada, pode ser mais bem compreendido na Figura 6. Nessa representação, dois anéis distintos são identificados: o anel interno descreve o processo de formação de biofilmes não aderidos a superfícies, enquanto os processos ocorridos fora desse anel estão relacionados às condições de células aderidas. É relevante ressaltar que esses dois fenótipos são mutuamente conversíveis, permitindo as bactérias ingressarem no modelo em qualquer ponto do processo (Sauer *et al.*, 2022).

Figura 6 – Modelo ampliado sobre o processo de formação de biofilme.



Fonte: Adaptado de Sauer *et al.*, (2022).

O processo se desdobra em três etapas distintas. A primeira, envolve a agregação e fixação, na qual as bactérias se unem umas às outras e se fixam em uma superfície, podendo estar em estado planctônico ou em forma de agregados. Nesse estágio, as bactérias aderem à superfície por meio de estruturas bacterianas, como fimbrias e lipopolissacarídeos (LPS), ao mesmo tempo em que iniciam a produção de matriz extracelular (Sauer *et al.*, 2022).

A segunda etapa, conhecida como crescimento e acumulação, está relacionada ao recrutamento ativo de células circundantes para se unirem à colônia do biofilme, contribuindo para o aumento/ expansão de sua massa e estrutura. Por fim, a terceira etapa é a desagregação e o desprendimento, na qual as bactérias se desprendem do biofilme, podendo ser na forma de agregados ou como células individuais (Sauer *et al.*, 2022).

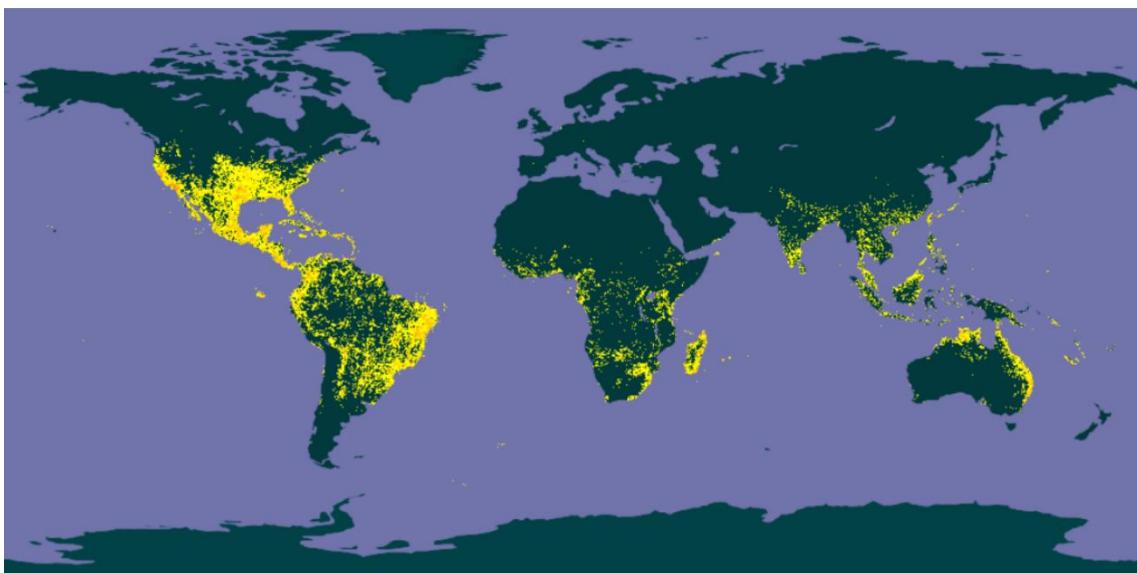
Os biofilmes apresentam mecanismos bem estabelecidos de resistência a medicamentos, podendo ser divididos em três categorias: tolerância física, envolvendo a produção excessiva de matriz extracelular, inibindo a ação de antimicrobianos; tolerância passiva, relacionada a enzimas presentes na substância polimérica extracelular (SPE) capazes de inativar fármacos; e tolerância fisiológica, na qual as células que ocupam as regiões mais internas do biofilme entram em um estado metabolicamente inativo, proporcionando resistência às drogas (Olwal *et al.*, 2019; Ciofu; Tolker-Nielsen, 2019; Soares *et al.*, 2019). Além disso, os biofilmes demonstram métodos de evasão do sistema imunológico, por meio de processos como a inibição da fagocitose (Penesyan *et al.*, 2021).

Outros fatores que influencia os desenvolvimentos dos biofilmes estão relacionados aos mecanismos de quorum sensing (QS). Durante o processo de formação dessas comunidades microbianas, as células planctónicas, ao atingirem uma certa densidade, adquirem a habilidade de viverem como uma entidade multicelular. Esse fenômeno envolve processos de comunicação entre as células pela produção de moléculas sinalizadoras, na qual denominamos de quorum sensing (Kalia, 2013). Os sinais gerados por essa comunicação desencadeiam modificações gênicas e fisiológicas, que estão relacionadas à formação do biofilme, nodulação, resistência antimicrobiana, virulência e dentre outros mecanismos (Koul *et al.*, 2016).

2.5 *Croton* spp.

O gênero *Croton* foi inicialmente descrito por Linnaeus em 1753, com apenas 13 espécies conhecidas na época (Van Ee; Berry, 2010). Ao longo das décadas, diversos pesquisadores se dedicaram ao estudo deste gênero, resultando na descoberta de novas espécies. Atualmente, *Croton* spp. Engloba mais de 1.400 espécies identificadas, distribuídas pelos dois hemisférios, conforme ilustrado na Figura 7 (GBIF, 2023).

Figura 7 – Registros georreferenciados de espécies de *Croton* ao redor do globo.



Fonte: <https://www.gbif.org/species/3057454>

As espécies pertencentes a este gênero consistem em arbustos, subarbustos ou árvores monoicas, seu indumento é composto por tricomas estrelados, dendríticos, fasciculados, lepidotos, simples, ou em estados intermediários que abrangem essas formas mencionadas. As folhas são alternadas, ocasionalmente opostas ou pseudoverticiladas no ápice dos ramos. As

inflorescências ocorrem terminalmente, sendo trisóides, contínuas ou descontínuas entre as címulas estaminadas e pistiladas. O fruto possui a forma de uma cápsula septicida-loculicida, geralmente de formato orbicular. As sementes são carunculadas e podem ser lisas ou rugosas (Silva *et al.*, 2010).

O Brasil é reconhecido como um dos países que abriga a maior diversidade de espécies pertencentes a esse gênero, contando com mais de 350 catalogações, das quais 252 são endêmicas (Carneiro-Torres *et al.*, 2017). Neste gênero, diversos autores têm documentado a presença de metabólitos secundários, como flavonoides, terpenos e terpenoides. Essa riqueza de compostos tem levado as espécies de *Croton* a serem amplamente reconhecidas por suas propriedades medicinais, sendo utilizadas no tratamento de diversas condições, como processos inflamatórios, reumáticos, diabetes, úlceras e dores abdominais, especialmente em países da África, Ásia e América do Sul (Abbas; Tahir, 2020).

O gênero *Croton* também é amplamente reconhecido por sua capacidade de produzir óleos essenciais. A literatura científica já reúne uma ampla variedade de relatos acerca das atividades desses compostos voláteis, englobando propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiparasitárias, antinociceptivas e outras (Ferreira *et al.*, 2020; Cândido *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2021). Os óleos essenciais de *Croton* spp. são frequentemente empregados na medicina tradicional, e suas propriedades farmacológicas são atribuídas aos seus metabólitos secundários, como os terpenos e terpenoides, que conferem a esse gênero um grande potencial no desenvolvimento de fármacos e terapias voltadas para processos infecciosos (Ferreira *et al.*, 2020).

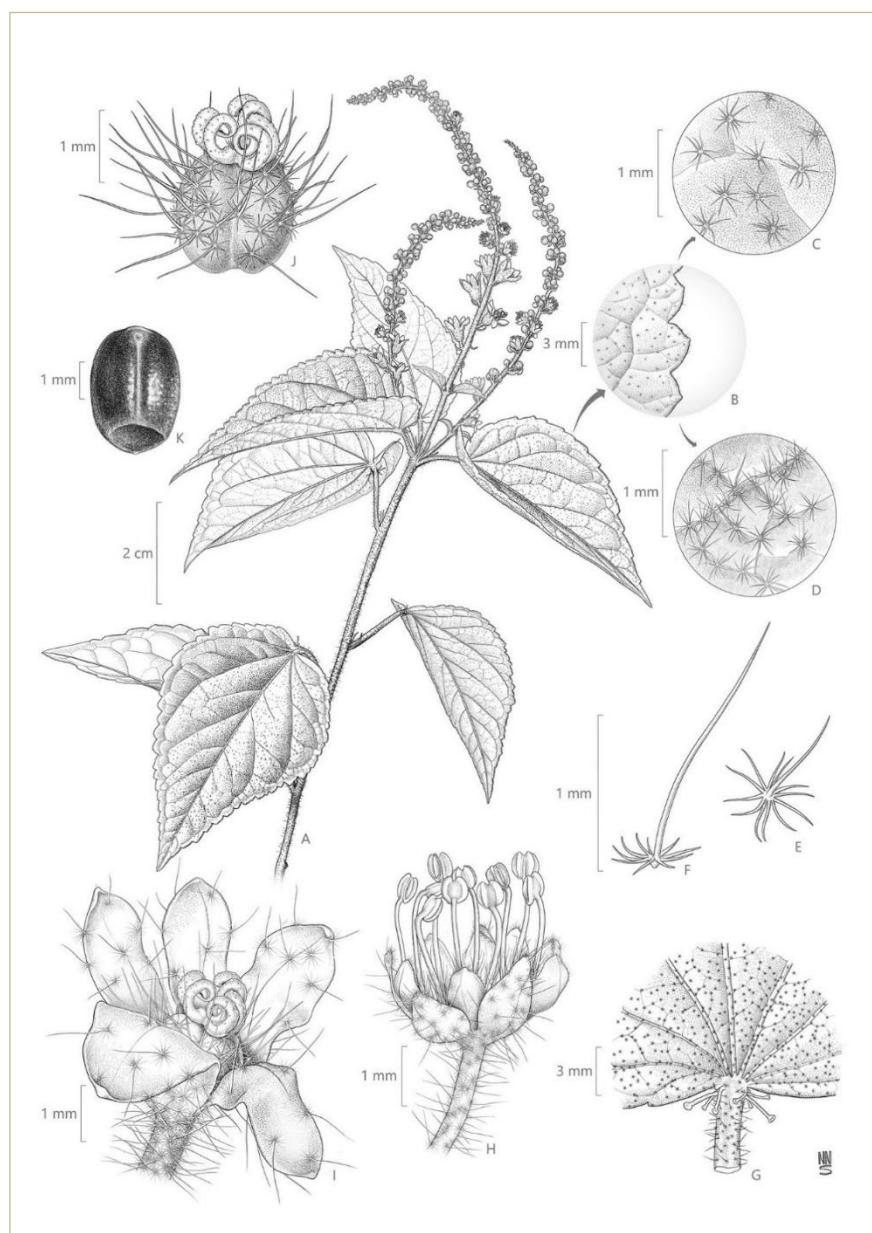
2.5.1 *Croton pluriglandulosus* Carn. -Torres & Riina.

C. pluriglandulosus é uma espécie recentemente identificada (2021) e, até o momento, poucas são as informações disponíveis na literatura sobre essa planta. Essa espécie é frequentemente encontrada em áreas de florestas secas e solos arenosos e está presente nos estados brasileiros do Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Paraíba e Sergipe (Riina *et al.*, 2021). As plantas são caracterizadas por arbustos monoicos que atingem aproximadamente 4 metros de altura. Elas possuem ramos jovens cobertos por tricomas estrelados longos e de coloração escura (Figura 8C), folhas ovais membranáceas e ligeiramente descoloridas. Um traço distintivo dessa espécie é a presença de 6 a 10 glândulas nectárias acropetioladas, sendo duas delas mais longas do que as demais (Figura 8G). Essas numerosas glândulas nectárias dão origem ao nome da espécie, que também é conhecida popularmente como marmeiro,

marmeiro branco e marmeiro sabiá (Riina *et al.*, 2021).

As pesquisas existentes estão predominantemente centradas na avaliação da atividade biológica do óleo essencial da planta, com ênfase em estudos que exploram suas propriedades antifúngicas e seu potencial de sinergia com medicamentos comerciais (Carvalho *et al.*, 2023; Vasconcelos *et al.*, 2022). Apesar da falta de estudos publicados, o *C. pluriglandulosus* oferece um vasto terreno para futuras investigações.

Figura 8 - *Croton pluriglandulosus* Carn.-Torres & Riina.



Fonte: Riina *et al.*, (2021). -A. Ramo florido. -B. Detalhe da margem da folha. -C. Tricomas na face adaxial da folha. -D. Tricomas mais densos na superfície abaxial da folha. -E. Tricoma estrelado. -F. Tricoma estrelado com braço central mais alongado. -G. Base da folha mostrando as múltiplas glândulas nectárias acropetiolares. -H. Flor estaminada. -I. Flor pistilada. -J. Desenvolvimento da cápsula. -K. Semente.

2.6 Óleos essenciais

A milhares de anos, os seres humanos têm usado óleos essenciais (OEs) como parte de sua vida cotidiana, aplicando-os em perfumes, temperos, na indústria de cosméticos e na medicina tradicional (Brnawi *et al.*, 2019). Essas substâncias, são caracterizadas como metabólitos secundários voláteis, que podem ser extraídas de várias partes das plantas, como flores, folhas, cascas e raízes. As plantas produzem esses compostos como resposta a estímulos ambientais, tais como o ataque de herbívoros, infecções fúngicas e situações de estresse abiótico (Yang *et al.*, 2018).

Os OEs são produzidos por diversas espécies amplamente distribuídas pelo mundo. A síntese de OE ocorre no citoplasma e nos plastídios das células vegetais. Embora esses compostos geralmente contenham dois ou três componentes químicos em maior quantidade, eles são, na realidade, complexas misturas de diversos grupos químicos, como terpenos e terpenoides (Stringaro; Colone; Angioletta, 2018). Diversas variáveis, como a localização geográfica, condições ambientais, período de colheita e procedimentos de extração e armazenamento, contribuem para a variação dos componentes dos OEs, inclusive mesmo se tratando de uma mesma espécie (García-Salinas *et al.*, 2018).

Como mencionado anteriormente, os terpenos são componentes majoritários na constituição da maioria dos óleos essenciais, representando aproximadamente 90% de composição (Dhifi *et al.*, 2016). Esses compostos são formados por unidades de isopreno (C_5H_8) e podem estar vinculados a cadeias cílicas ou abertas. Além disso, a classificação dos terpenos é determinada pelo número de unidades de isopreno presentes, podendo ser chamados de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e assim consequentemente. Exemplos de monoterpenos incluem o limoneno e o β -cariofileno (El Asbahani *et al.*, 2015).

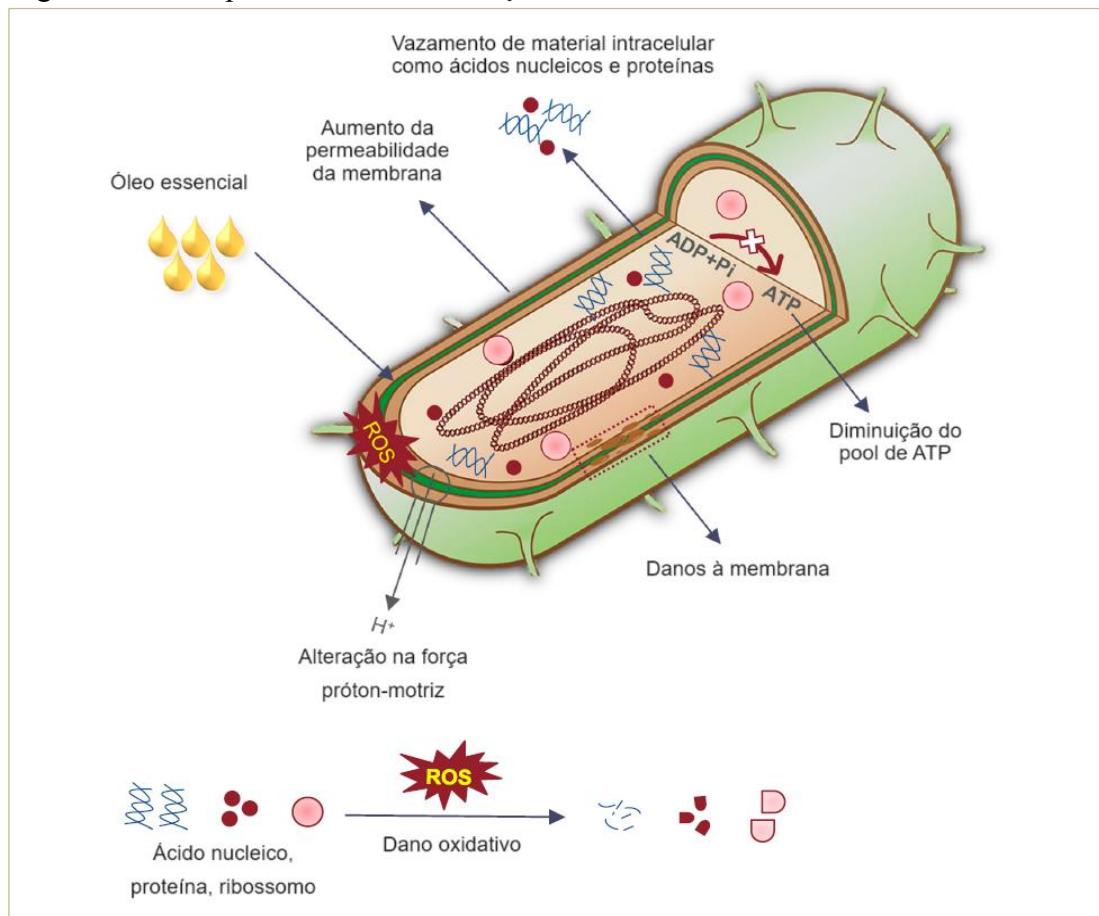
Os terpenoides, também presentes nos OEs, têm sua origem nas unidades de isopreno. No entanto, a principal distinção em relação aos terpenos é que as unidades de isopreno sofrem modificações e combinações, envolvendo processos como adições e remoções de grupos metil. Assim como os terpenos, os terpenoides são classificados como monoterpenoides, sesquiterpenoides ou diterpenoides, dependendo do número de unidades de isopreno. Exemplos notáveis incluem o linalol e a canfora (Bakkali *et al.*, 2018). Por fim, os fenóis consistem em compostos químicos que apresentam um grupo hidroxila diretamente ligado a um anel aromático. Exemplos notáveis são o timol, o eugenol e o carvacrol (Bassolé; Juliani, 2012).

Ao se abordar sobre a atividade biológica de um óleo essencial, é importante

ressaltar que ela não se limita exclusivamente ao seu principal constituinte. Em vez disso, essa atividade depende de uma interação complexa com os demais componentes presentes no óleo. Nessa perspectiva, a ação combinatória entre esses compostos desencadeia uma variedade de mecanismos de ação que se complementam, agindo diretamente nos microrganismos, em vez de se restringirem a um único modo de ação específico (Tariq *et al.*, 2019). Atualmente, inúmeros estudos já reconhecem os óleos essenciais como potenciais agentes antimicrobianos (Alsaraf *et al.*, 2020; Smigielski *et al.*, 2018; Purkait *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais está intrinsecamente ligado aos processos de desestabilização da membrana (Figura 9). Isso acontece devido à natureza lipofílica das membranas, que permite a penetração dos OEs e sua acumulação entre a bicamada lipídica. Essa acumulação resulta na desestabilização e na degradação das diversas camadas da membrana, por meio da inativação de mecanismos enzimáticos e da interferência nos processos de transporte através da membrana (Angane *et al.*, 2022).

Figura 9 – Principais mecanismos de ação antibacteriano de óleos essenciais.



Fonte: Angane *et al.*, (2022).

Esses eventos culminam na quebra da integridade da bicamada, aumentando sua permeabilidade aos agentes antimicrobianos e perturbando a função celular. Isso, por sua vez, leva a vazamentos de líquido intracelular que contém componentes vitais para o funcionamento celular. Essas perturbações também afetam a força próton-motriz (PMF) e, consequentemente, levam a uma depleção de ATP (Pathania *et al.*, 2018). A perda de componentes intracelulares é tolerável até certo ponto. No entanto, um contato prolongado entre os óleos essenciais e os microrganismos resulta em perdas irreparáveis que levam à morte celular (Ju *et al.*, 2019).

Entretanto é importante enfatizar que a atividade antibacteriana de um óleo essencial não depende unicamente de seus componentes, mas varia com base nas diferentes cepas às quais é exposto (Al-Maqtari *et al.*, 2021). Um exemplo notável dessa variação se manifesta ao considerar as diferenças entre bactérias gram-positivas e gram-negativas, onde a presença da membrana externa da parede celular em gram-negativas age como uma barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos (Bazargani e Rohloff, 2016). Por outro lado, em bactérias gram-positivas, existem extremidades lipofílicas decorrentes do ácido lipoteicóico, tornando-as mais suscetíveis à penetração de óleos essenciais (Chouhan *et al.*, 2017).

Essa variabilidade pode ser observada na prática em diversos estudos ao longo do tempo, os quais relatam a maior sensibilidade das bactérias gram-positivas aos óleos essenciais (Vidács *et al.*, 2018; Bazargani e Rohloff, 2016). No entanto, em algumas situações, essa dinâmica pode se inverter, com maior sensibilidade das bactérias gram-negativas (Sabo e Knezevic, 2019). Portanto, é sempre válido avaliar os óleos essenciais e seus componentes diante de diferentes tipos de cepas bacterianas (Sales *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a composição química, a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial extraído de folhas de *Croton pluriglandulosus* sobre bactérias de interesse clínico.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas de *C. pluriglandulosus*;
- Analisar por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) a composição do óleo essencial de *C. pluriglandulosus*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* sobre as cepas de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*; e Gram-negativa *Escherichia coli*;
- Avaliar a atividade do óleo essencial sobre a inibição da formação biofilmes de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*;
- Avaliar a atividade do óleo essencial sobre biofilmes pré-formados de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*;
- Analisar por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) modificações morfológicas e estruturais em biofilmes de *S. aureus* e *E. coli*.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal

A matéria vegetal foi coletada na trilha do Pelado, região da Serra do Lima localizada no município de Patu/RN, de acordo com as seguintes coordenadas geográficas: 6°06'30"S 37°37'20"O, abrangendo uma área de 319.129 km². As áreas de coleta foram previamente identificadas, e as análises taxonômicas realizadas pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática Vegetal (LESV) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), utilizando como referência a literatura de APG IV (2016).

4.2 Extração do óleo essencial

Após a coleta, as folhas foram levadas para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (LFBP) localizado na UERN, para então serem submetidas a extração do óleo essencial através do processo de hidrodestilação com o auxílio do aparelho de Clevenger (Figura 10), proposto por Oliveira *et al.* (2012), com modificações. A massa foliar fresca foi inserida em um balão volumétrico de 5 L, com adição de 2 L de água destilada.

Figura 10 - Aparelho de Clevenger.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o processo de extração, o óleo foi separado da água e desidratado por meio de um processo de filtração e evaporação com sulfato de sódio anidro e éter. Posterior ao processo de extração, o óleo foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenados em refrigeradores a 4 °C para as subsequentes análises.

4.3 Determinação da composição química do óleo essencial de *Croton pluriglandulosus*

A análise da composição química do OE foi conduzida através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) utilizando um sistema Hewlett-Packard Modelo 5971 e um capilar de sílica fundida DB-5 não polar com dimensões de 30 mm x 0,25 mm de diâmetro interno e uma espessura de filme de 0,25 µm. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com uma taxa de fluxo de 1 ml/min e uma proporção de divisão de 1/1. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 250 °C e 200 °C, respectivamente. A programação da coluna ocorreu em duas etapas de rampa, iniciando a partir de 35 °C e aumentando a uma taxa de 4 °C por minuto até chegar a 180 °C. Em seguida, houve uma segunda etapa de rampa de 180 °C para 250 °C, a uma taxa de 10 °C por minuto. Durante o procedimento de análise, os espectros foram gravados na faixa de massa de 30 a 450 m/z.

Para a identificação dos componentes individuais, os espectros obtidos foram comparados com aqueles presentes na base de dados do espectrômetro de massas, que inclui a biblioteca de Wiley L-built MS. Além disso, os índices de retenção foram empregados como parte do processo de pré-seleção dos componentes, auxiliando na identificação dos compostos presentes no OE de *C. pluriglandulosus* (OCp).

4.4 Microrganismos

No presente estudo foram utilizadas cepas padrões obtidas a partir do acervo da American Type Culture Collection (ATCC), sendo elas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303. Além dessas, também foi utilizado um isolado clínico, a cepa *Staphylococcus aureus* JKD 6008. Detalhes das características das cepas podem ser vistas na Tabela 1.

Tabela 1 – Cepas utilizadas para os testes antimicrobianos.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Sensibilidade a meticilina.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	Resistencia a meticilina (MRSA).
<i>Staphylococcus aureus</i> JKD 6008	Resistencia a meticilina (MRSA) e resistência intermediária a vancomicina (VISA).
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Possui aplicações na bioinformática, teste em alimentos e controle de qualidade.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	Produtora de adesina polissacarídica e resistente a meticilina (MRSE).
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	Produtora de aspartato aminotransferase.

Fonte: www.atcc.org.

4.5 Condições de cultura

As condições de crescimento das cepas bacterianas seguiram o protocolo proposto pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2015), com algumas modificações. Inicialmente, as cepas armazenadas no ultra freezer (-80 °C) em soluções de Caldo de Soja Triptona (TSB) contendo glicerol a 20%, foram estriadas em placas de Petri contendo meio Mueller Hinton Ágar (MHA) e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de crescimento, foram selecionadas 3 a 5 colônias isoladas das placas, para serem inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio Mueller Hinton Caldo (MHB). Esses tubos foram novamente incubados nas mesmas condições mencionadas anteriormente, por um período de 24 horas.

Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos tipo falcon de 50 ml e submetidas a uma centrifugação a 8.603 G a 4 °C por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e as bactérias ressuspensas em um novo meio MHB (5 ml). Posteriormente, com o auxílio de um espectrofotômetro (Amersham Biosciences), a concentração das bactérias foi ajustada a 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml), em uma densidade óptica (D.O.) de 620 nm com o uso de curvas de calibrações previamente realizadas para cada cepa testada.

4.6 Solubilização e diluição do óleo essencial

A solubilização do óleo de *Croton pluriglandulosus* (OCp) seguiu as diretrizes de padronização do CLSI (2015) com modificações. Inicialmente, o óleo foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. e agitado em vórtex por alguns segundos. Em seguida, foi adicionado MHB de forma a alcançar concentrações finais de 8% de DMSO e 20 mg/ml de OCp.

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

Para determinar a atividade antibacteriana do óleo essencial, os ensaios de microdiluição em caldo foram conduzidos em placas de poliestireno de 96 poços de fundo "U" de acordo com as diretrizes do CLSI (2017), com modificações propostas por Vale *et al.* (2021). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), todos os poços da linha "A" foram preenchidos com 200 µl da solução do OCp na concentração inicial de 20 mg/ml. Em seguida, 100 µl de meio MHB foram adicionados a todos os poços restantes. A diluição na base dois foi conduzida utilizando 100 µl da solução dos poços da linha A e diluído seriadamente até os poços da linha G, deixando todos com um volume final de 100 µl, para obter concentrações que variem de 20 mg/ml a 0,3125 mg/ml.

Em seguida, 100 µl de uma suspensão bacteriana, previamente ajustada para a concentração de 1×10^6 UFC/ml, foi adicionada à placa. Isso resultou na redução pela metade das concentrações, tanto do óleo essencial, quanto da suspensão bacteriana e do DMSO. Como resultado, as concentrações finais de OCp variaram de 10 a 0,15625 mg/ml, e a suspensão bacteriana obteve uma concentração final de 5×10^5 UFC/ml, em um volume total de 200 µL. As placas então foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente foi mensurada a densidade óptica dos poços da placa de microtitulação a 620 nm utilizando leitor de microplacas (Spectramax).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a concentração que inibe visivelmente o crescimento bacteriano. Quanto a Concentração Bactericida Mínima (CBM), 24 horas após a incubação, foram retirados 10 µL dos poços em que não houve crescimento bacteriano e inoculados em placas de MHA. Essas placas de Petri foram incubadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Após 24 horas, a menor concentração que

não apresentou crescimento visível de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foi considerada como a CBM.

4.8 Avaliação da atividade antibiofilme

Os ensaios de atividade antibiofilme foram conduzidos em placas de poliestireno de 96 de fundo chato e baseado em testes de microdiluição seriada, coloração com cristal violeta (CV) e contagem de UFCs de acordo com Stepanović *et al.* (2000), com modificações propostas por Vale *et al.* (2021). Todo o processo de montagem de placas ocorreu semelhante aos processos utilizados nos ensaios de CIM, entretanto a concentração bacteriana final nos ensaios de biofilmes foi de 1×10^6 UFC/ml e os meios utilizados para o crescimento bacteriano foram o Caldo de Soja Triptona (TSB) e Soja Triptona Ágar (TSA).

4.8.1 *Quantificação da biomassa bacteriana*

Para quantificar a biomassa dos biofilmes, foi empregado o método de coloração utilizando cristal violeta (CV). Inicialmente, os biofilmes foram submetidos a três lavagens com água destilada estéril, com o intuito de remover as bactérias fracamente aderidas. Em seguida, foram fixados com 200 μ l de metanol a 99% por 5 minutos. Posteriormente, o metanol foi removido, e os biofilmes foram corados com 200 μ l de CV a 1% por 5 minutos. Após a etapa de coloração, a fim de eliminar o excesso de corante, os poços foram submetidos a três lavagens com água destilada e o corante foi solubilizado pela adição de 200 μ l de ácido acético a 33%. As placas foram lidas em um leitor de microplacas (Spectramax) a uma densidade óptica de 590 nm.

4.8.2 *Determinação do número de células viáveis*

A quantificação do número de células viáveis após o tratamento com OCp foi realizada por meio do ensaio de determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Após o período de exposição das bactérias ao composto durante 24 horas, as placas de 96 poços foram lavadas duas vezes com água destilada estéril para remover as células fracamente aderidas. Em seguida, 200 μ l de água destilada estéril foi adicionada a todos os poços, e a placa submetida a um banho ultrassônico utilizando um aparelho Cristófoli/EQM-CF por 8 minutos. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais das amostras, as quais foram plaqueadas

em meio TSA e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. O número de UFC foi expresso em Log10 UFC/ml

4.8.3 Ensaio da ação do OCp em biofilmes pré-formado

Os ensaios com biofilmes pré-formados foram conduzidos em placas de poliestireno de 96 poços. Cada poço dessas placas foi preenchido com 200 µl de uma suspensão bacteriana na concentração de 1×10^6 UFC/ml e incubado a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os poços lavados duas vezes com PBS (Fosfato 10 mM; NaCl 150 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,2 – 7,4) e então adicionado 100 µL de meio TSB (controle negativo) e 100 µL de OCp previamente solubilizado em TSB com 4% de DMSO, em concentrações que variaram de 10 a 0,15625 mg/ml. As placas então foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As análises subsequentes das placas incluíram a aplicação dos métodos de coloração com cristal violeta e determinação do número de células viáveis. Essas etapas seguiram os mesmos procedimentos que foram empregados nos ensaios de inibição da formação do biofilme.

4.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas, seguindo a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2014), com algumas adaptações. As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e *Escherichia coli* ATCC 11303, para avaliação da inibição da formação de biofilmes seguindo as mesmas metodologias já mencionadas. No entanto, foram utilizadas lamínulas de vidro (Olen, K5-2020) e placas de 24 poços para o crescimento bacteriano. Durante o experimento, o OCp foi analisado na presença e na ausência das cepas bacterianas, em concentrações correspondentes à CIM e a $\frac{1}{2}$ CIM. Para as cepas que não apresentaram CIM, foram utilizadas concentrações de 10 e 5 mg/ml para o ensaio.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS para remover as células fracamente aderidas, e os biofilmes desidratados com etanol, seguindo as etapas de imersão em etanol a 70% por 10 minutos, 95% por 10 minutos e 100% por 20 minutos. Posteriormente, as placas foram secas em um dessecador, e as lamínulas contendo os biofilmes depositadas em suportes de alumínio. Essas amostras passaram pelo processo de metalização com partículas de ouro e, posteriormente, visualizadas através do MEV (Quanta 450 FEG, FEI, Waltham, MA, EUA).

4.8.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

A análise utilizando Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) seguiu o procedimento descrito por Castelo Branco *et al.* (2016), com modificações. As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e *Escherichia coli* ATCC 11303. Elas foram analisadas quanto a ação do OCp em biofilmes pré-formados, seguindo as metodologias previamente descritas. No que se refere a cultura das cepas, estas foram cultivadas em lamínulas de vidro do modelo Olen (K5-2020) utilizando placas de 24 poços. Durante as etapas experimentais, as bactérias foram analisadas na presença e na ausência do composto (OCp), aplicado na concentração da CIM. Para as cepas que não apresentaram CIM, foi utilizada a concentração de 10 mg/ml para o ensaio.

Após o período de incubação, as placas foram submetidas a uma lavagem com PBS duas vezes e, em seguida, foram coradas utilizando o Kit de fluorescentes LIVE/DEAD (Invitrogen, EUA). Posteriormente as lamínulas foram lavadas novamente com PBS, a fim de remover o excesso de corante, e então levadas ao Microscópio Confocal Nikon C2, onde foram analisadas em dois comprimentos de onda distintos. Inicialmente, a excitação ocorreu a 488 nm, permitindo a identificação do fluoróforo SYTO9, que realça as células viáveis, emitindo uma fluorescência na cor verde. Posteriormente, foi utilizado um comprimento de onda a 561 nm, com a finalidade de identificar a presença de iodeto de propídio. Este composto é crucial para detectar células que estejam mortas ou que apresentem danos em sua membrana, emitindo uma fluorescência de cor vermelha ao interagir com os ácidos nucleicos.

4.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata com pelo menos 3 repetições independentes. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o aplicativo GraphPad Prism® versão 7.0 para Microsoft Windows. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), identificada diferença significativa, as médias foram submetidas ao teste de comparação múltipla Post-hoc de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da composição do óleo essencial de *Croton pluriglandulosus*

Através da análise por GC-MS foi possível a identificação de aproximadamente 97% dos componentes presentes no OCp. Entre esses componentes, destacam-se o monoterpeno eucaliptol, representando 25,63% do total, seguido pelo sesquiterpeno espatulenol, com 14,77%, e o terpeno α -Pineno, com 14,26%. Esses três compostos foram os constituintes majoritários do óleo essencial, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* Carn. -Torres & Riina

CONSTITUINTES	IR	%
1. α-Pineno	7.577	14,26
2. β -Felandreno	8.888	0,98
3. Biciclo[3.1.1]heptano, 6,6-dimetil-2-metil	8.967	12,34
4. β -Mirceno	9.525	0,91
5. Ciclohexano, 1-metileno-4-(1-metilenotenil)	9.901	0,89
6. <i>p</i> -Cimeno	10.638	7,84
7. Ciclohexeno, 1-metil-5-(1-metilenotenil)	10.779	8,30
8. Eucaliptol	10.862	25,63
9. 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-	13.353	1,17
10. Terpinen-4-ol	16.080	2,50
11. 2-Ciclohexen-1-ona, 4-(1-metiletil)-	16.405	3,89
12. α -Terpineol	16.567	3,62
13. β -cariofileno	24.205	2,32
14. Aromandendreno	24.813	1,48
15. Naftaleno, decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1 metiletenil)-, [4aR-(4aa,7a,8a β)]-	26.282	0,59
16. Espatulenol	29.015	14,77
17. Óxido de cariofileno	29.170	7,35
Total		97,85

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Determinação da CIMs e CBMs

No que diz respeito a atividade antibacteriana, OCp foram observados valores de Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) apenas contra as cepas da espécie *S. aureus*. Como pode ser observado na Tabela 3, os valores de CIM e CBM variaram entre 10 e 5 mg/ml.

Tabela 3 - Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs) do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Óleo essencial de <i>C. pluriglandulosus</i> (mg/ml)		
CEPAS	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	10	10
<i>S. aureus</i> JKD 6008	5	5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10	10
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 11303	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Avaliação da atividade de OCp sobre a formação de biofilmes

Os efeitos da ação de OCp sobre a formação dos biofilmes para três cepas de *S. aureus* estão representados na Figura 11. Foi observada uma redução significativa na biomassa total dos biofilmes de todas as cepas bacterianas em todas as concentrações testadas de OCp, com exceção da cepa *S. aureus* ATCC 25923, onde o óleo não causou redução significativa na concentração de 0,3125 mg/ml (Fig. 11a).

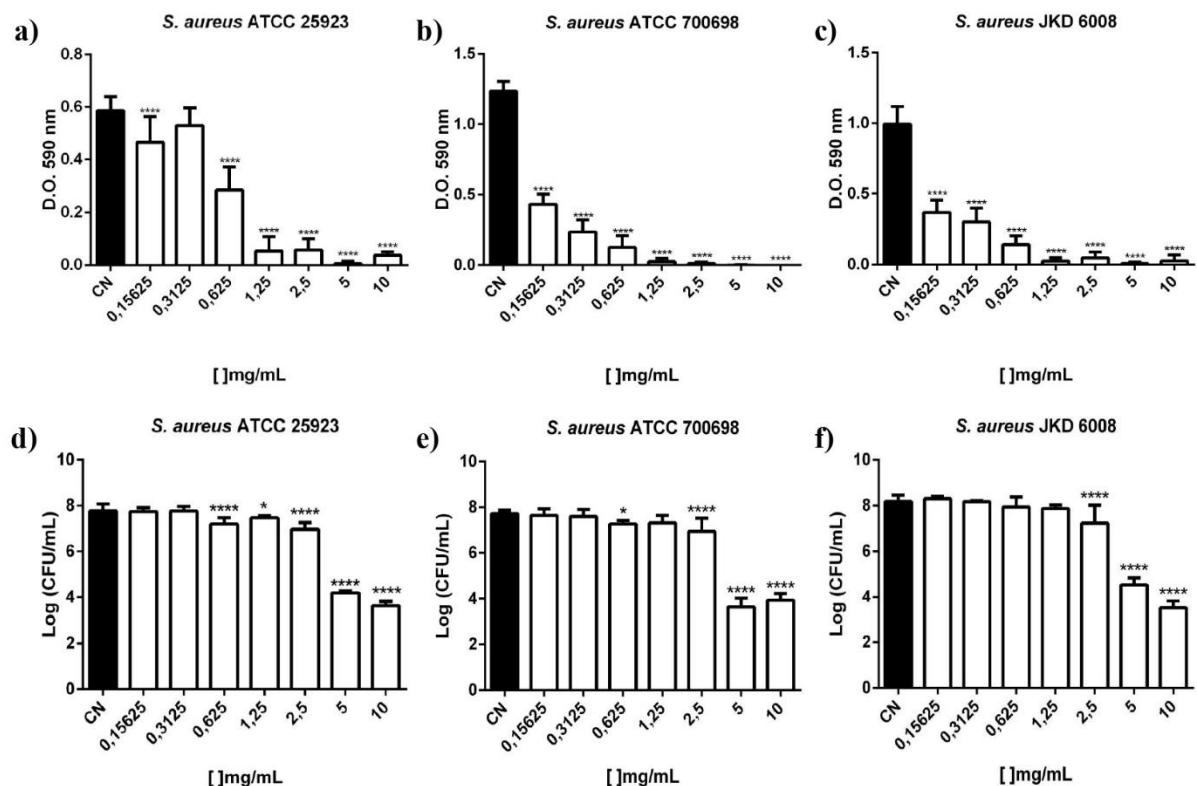
Para o biofilme da cepa *S. aureus* ATCC 25923, as concentrações de 10, 5 e 2,5 mg/ml resultaram em uma porcentagem de inibição de 89%, 100% e 90%, respectivamente (Figura 11a). Em relação ao biofilme de *S. aureus* ATCC 700698, observou-se uma redução de 99% para as concentrações de 10 e 5 mg/ml (Figura 11b). No caso de *S. aureus* JKD 6008, as inibições foram de 97%, 99% e 91% nas concentrações de 10, 5 e 2,5 mg/ml, respectivamente (Figura 11c).

No que diz respeito ao número de células viáveis dos biofilmes, todas as cepas apresentaram uma redução significativa quando tratadas com as três maiores concentrações de OCp. Para o biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 a concentração de 10 mg/ml reduziu o número de UFC em 4,0 logs (Fig. 11d), já na concentração de 5 mg/ml houve uma redução de UFC em 3,6 logs. Além disso, essa cepa exibiu diminuição significativa dos logs de UFC nas concentrações de 1,25 e 0,625 mg/ml quando comparada com o controle.

Nos estudos sobre biofilmes da espécie *S. aureus* ATCC 700698, o OCp induziu a diminuição de UFC em 3,8 logs na concentração de 10 mg/ml e em 4,0 logs na concentração de 5 mg/ml (Fig. 11e), também houve redução significativa na concentração de 0,625 mg/ml de OCp. Com relação aos estudos sobre biofilmes de *S. aureus* JKD 6008, OCp causou uma

diminuição em 4,7 logs na concentração de 10 mg/ml e em 3,6 logs na concentração de 5 mg/ml (Fig. 11f).

Figura 11 – Efeito do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* sobre a formação de biofilmes de diferentes cepas de *S. aureus*



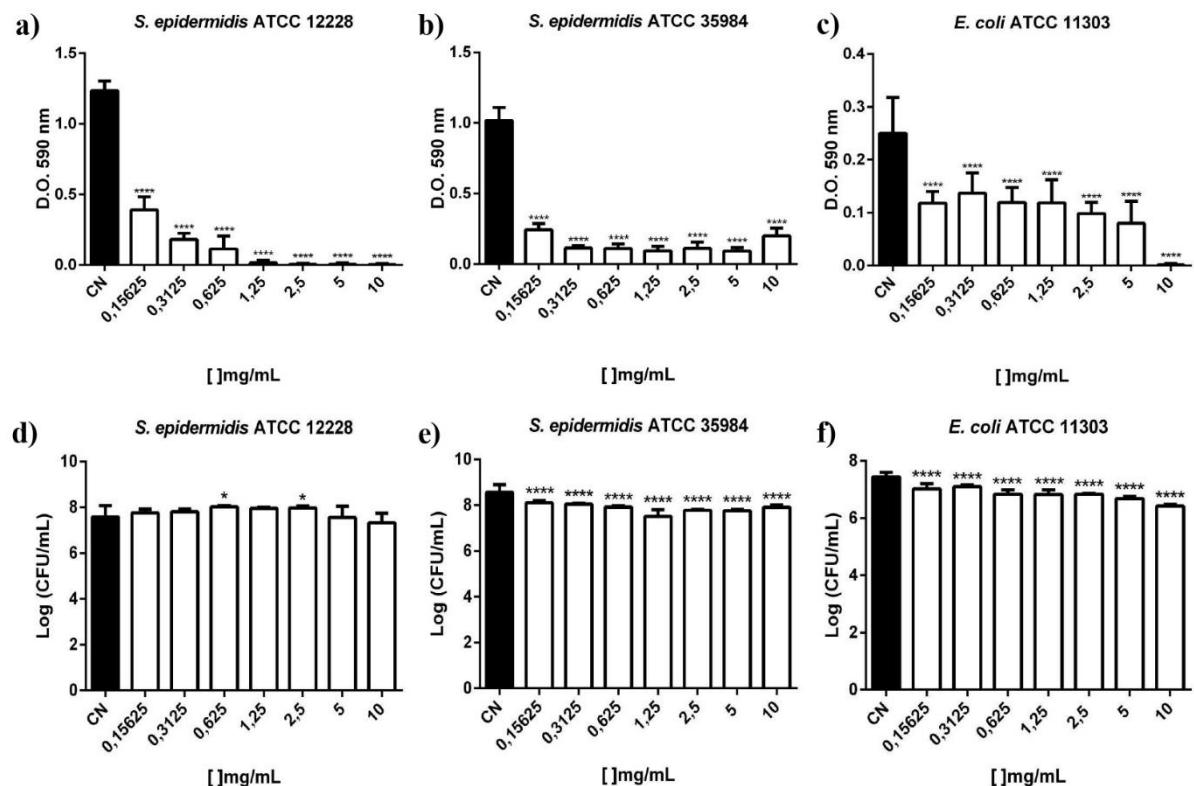
Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa total (A, B, C) e número de células viáveis (D, E, F) dos biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* JKD 6008 na presença do óleo de *Croton pluriglandulosus*. As barras de erro indicam o desvio padrão (DP). *p < 0,05 em comparação ao grupo controle e ***p < 0,0001 em comparação ao grupo controle.

As análises dos biofilmes das cepas de *S. epidermidis* e *E. coli* estão representadas na Figura 12. Os resultados revelaram uma redução significativa da biomassa total dos biofilmes em todas as concentrações testadas de OCp sobre todas as cepas. Para o biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228 houve uma porcentagem de inibição de 92% quando tratada com 10 mg/ml de OCp, 89% em 5 mg/ml e 84% em 2,5 mg/ml (Fig. 12a). Além disso, a redução da biomassa do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 foi de 76% quando tratado com 10 mg/ml, 83% em 5 mg/ml e 89% em 2,5 mg/ml (Fig. 12b). Por fim, para o biofilme de *E. coli* ATCC 11303 as porcentagens de inibição foram de 95%, 82%, 77% para os tratamentos com 10, 5 e 2,5 mg/ml de OCp, respectivamente (Fig. 12c).

No que diz respeito ao número de células viáveis nos biofilmes, observa-se que *S.*

epidermidis ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303 apresentaram reduções significativas em todas as concentrações testadas, com reduções de 1 log nas concentrações de 1,25 e 10 mg/ml, respectivamente (Fig. 12e-f). Quanto a *S. epidermidis* ATCC 12228, somente as concentrações de 2,5 e 0,625 mg/ml foram significativas; no entanto, houve um aumento no número de células viáveis nessas concentrações (Fig. 12d).

Figura 12 - Efeito do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* sobre a formação de biofilmes de cepas de *S. epidermidis* e *E. coli*.



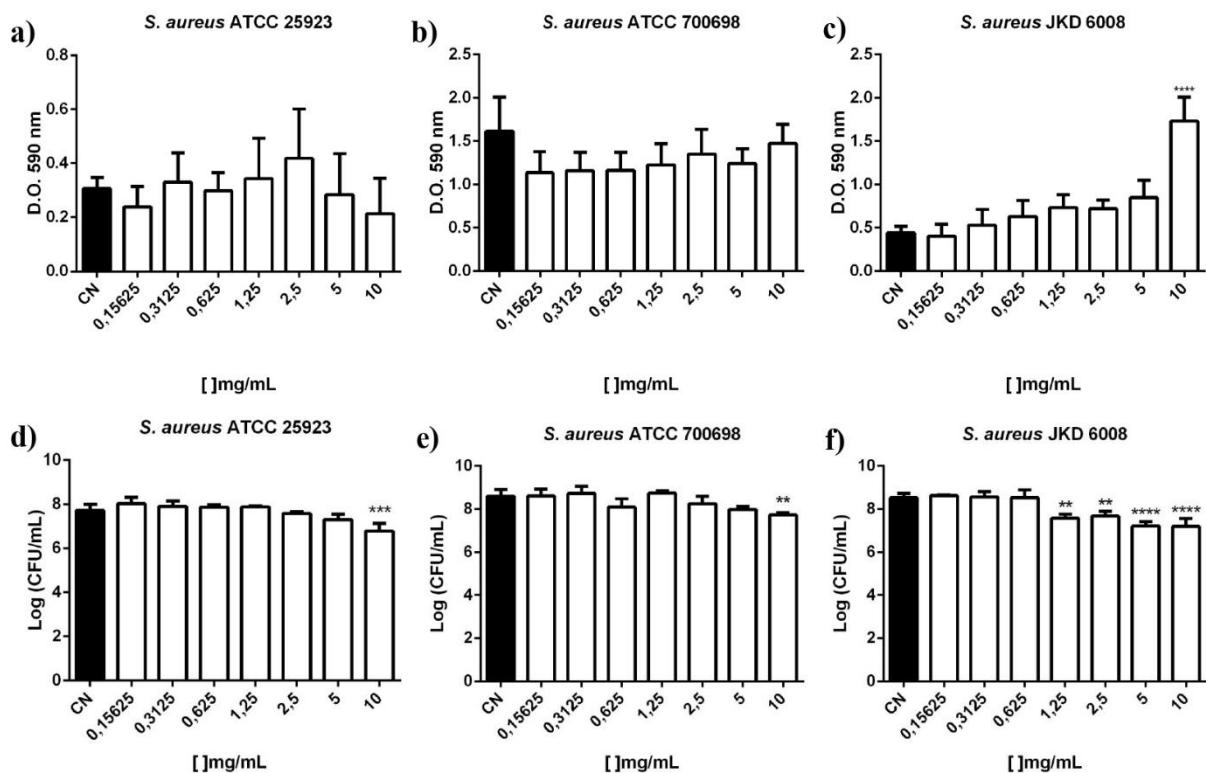
Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa total (A, B, C) e número de células viáveis (D, E, F) dos biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303 na presença do óleo de *Croton pluriglandulosus*. As barras de erro indicam o desvio padrão (DP). *p < 0,05 em comparação ao grupo controle e ****p < 0,0001 em comparação ao grupo controle.

5.4 Avaliação da atividade de OCp sobre biofilmes pré-formados

Em relação à atividade do OCp em biofilmes pré-formados para as diferentes estirpes de *S. aureus*, podemos observar na Figura 13 que não houve reduções significativas da biomassa total em nenhuma das concentrações testadas. É válido destacar que, para a estirpe de *S. aureus* JKD 6008, houve um aumento significativo da biomassa na concentração de 10 mg/ml. No entanto, houve reduções significativas no número de unidades formadoras de colônia para todas as cepas testadas. O biofilme de *S. aureus* ATCC 25923, apresentou uma

redução significativa de 0,9 log na concentração de 10 mg/ml de OCp (Fig. 13d). Para o biofilme de *S. aureus* ATCC 700698, houve uma redução significativa de 0,8 log na concentração de 10 mg/ml (Fig. 13e), enquanto para o biofilme de *S. aureus* JKD 6008, as reduções foram de 1,3 log para 10 mg/ml, 1,3 log para 5 mg/ml, 0,8 log para 2,5 mg/ml e 0,9 log na concentração de 1,25 mg/ml (Fig. 13f).

Figura 13 – Efeito do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* sobre biofilmes pré-formados de diferentes cepas de *S. aureus*



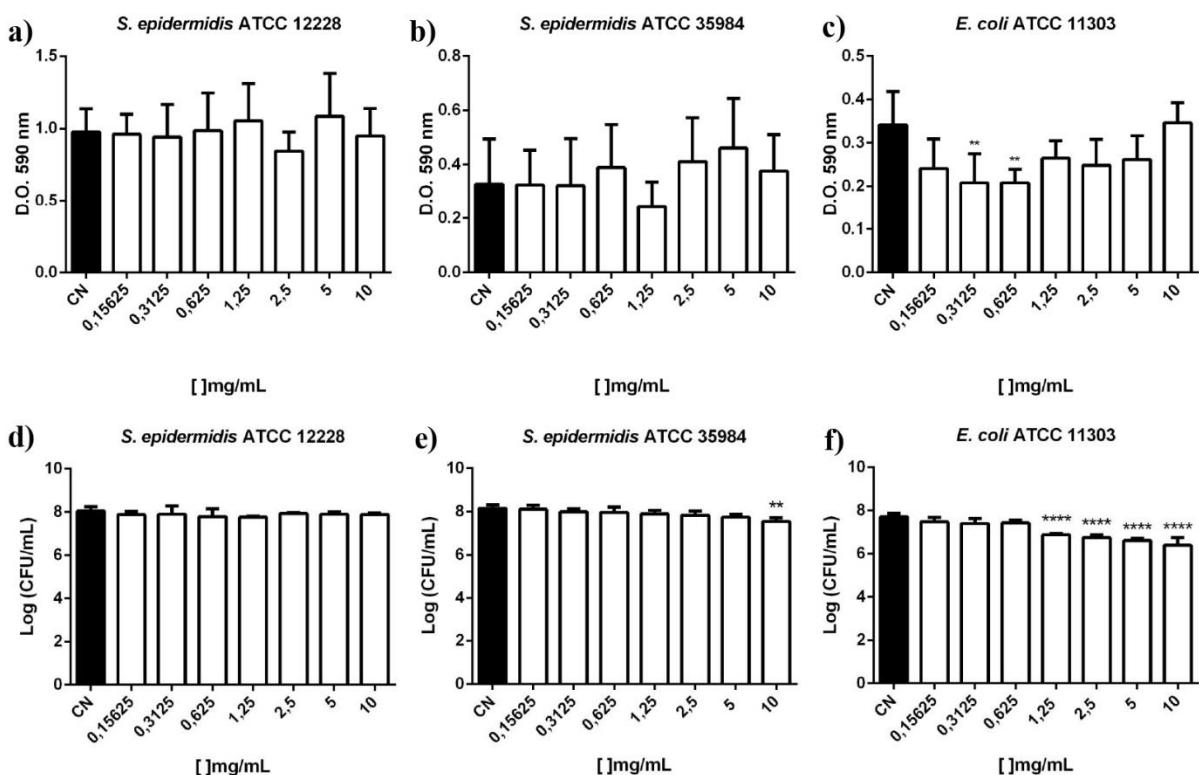
Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa total (A, B, C) e número de células viáveis (D, E, F) dos biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* JKD 6008 na presença do óleo de *Croton pluriglandulosus*. As barras de erro indicam o desvio padrão (DP). **p < 0,01 em comparação ao grupo controle, ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle e ****p < 0,0001 em comparação ao grupo controle.

As análises da ação do OCp sobre os biofilmes pré-formados das cepas de *S. epidermidis* e *E. coli* podem ser vistas na Figura 14. Em relação a redução da biomassa total, não foram observadas reduções significativas para as cepas de *S. epidermidis* em todas as concentrações testadas. No entanto, para a cepa de *E. coli* 11303, houve uma redução significativa de aproximadamente 39% da biomassa nas concentrações de 0,625 mg/ml e 0,3125 mg/ml (Fig. 14c).

Em relação ao número de células viáveis, observou-se que para o biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228 não houve reduções significativas em nenhuma das concentrações

testadas (Fig. 14d). Por outro lado, o biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou uma redução em 0,6 log na concentração de 10 mg/ml (Fig. 14e). Quanto ao biofilme de *E. coli* ATCC 11303 foram observadas reduções significativas de 1,3 a 0,8 log entre as concentrações de 10 a 1,25 mg/ml (Fig. 14f).

Figura 14 – Efeito do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* sobre biofilmes pré-formados de cepas de *S. epidermidis* e *E. coli*.



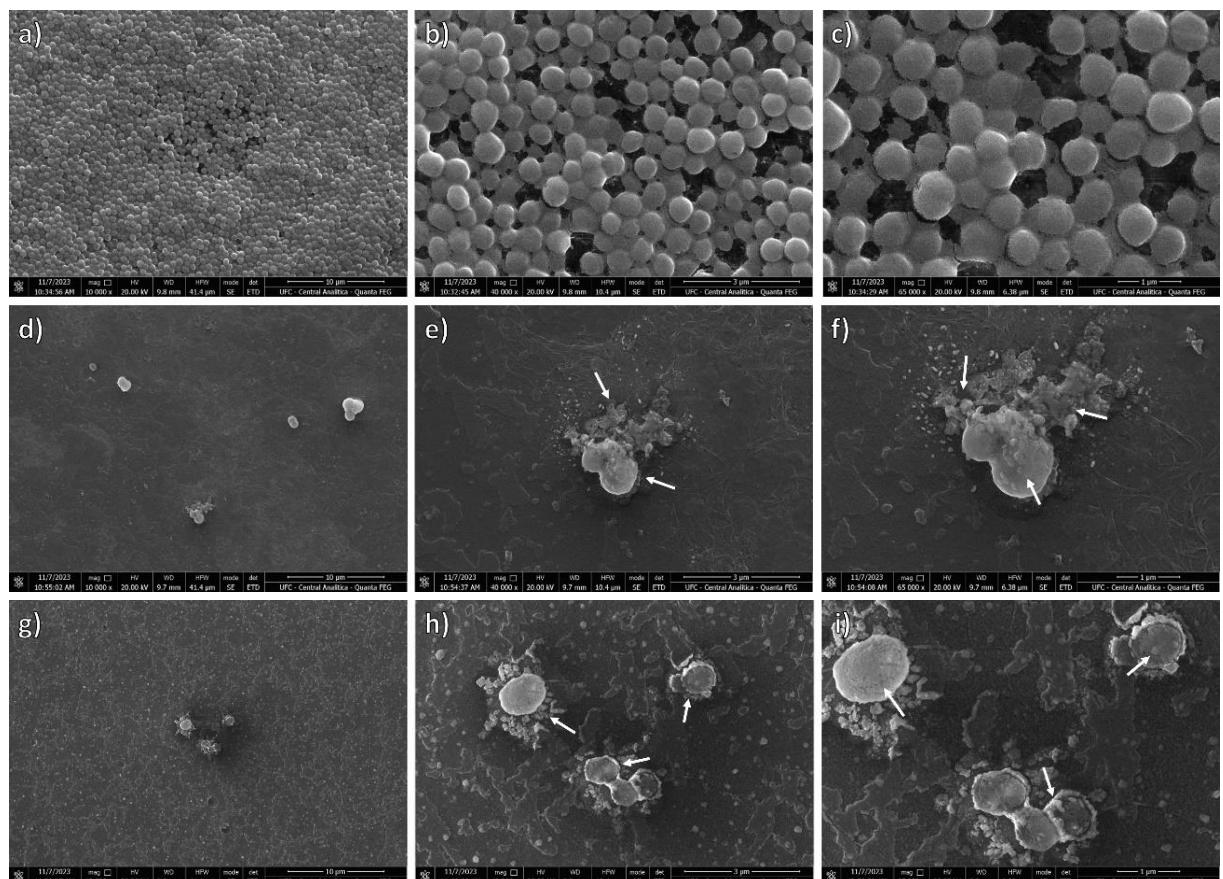
Fonte: Elaborada pelo autor. Quantificação de biomassa total (A, B, C) e número de células viáveis (D, E, F) dos biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303 na presença do óleo de *Croton pluriglandulosus*. As barras de erro indicam o desvio padrão (DP). **p < 0,01 em comparação ao grupo controle e ****p < 0,0001 em comparação ao grupo controle.

5.5 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As eletromicrografias obtidas a partir dos biofilmes da cepa *S. aureus* ATCC 700698, tratado com 10 e 5 mg/ml e não tratado com OCp podem ser observadas na Figura 13. Nas eletromicrografias dos biofilmes não tratados com OCp (Figura 15a-c), é evidente a regularidade morfológica do biofilme, com a presença de cocos agrupados, como frequentemente é observado em cepas do gênero *Staphylococcus*, além de uma alta densidade celular. No entanto, nos biofilmes tratados com óleo na concentração de 5 mg/ml (Figura 15d-f), é evidente uma redução significativa nos aglomerados celulares, além de danos estruturais

na morfologia e topologia bacteriana, incluindo um possível extravasamento de material intracelular por danos causados na membrana. O mesmo padrão é observado nos biofilmes tratados com 10 mg/ml de OCp (Figura 15g-i), com uma diminuição significativa dos aglomerados celulares e modificações na morfologia e topologia celular, além de um aumento significativo das dimensões celulares.

Figura 15 – Eletromicrografias da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 700698.

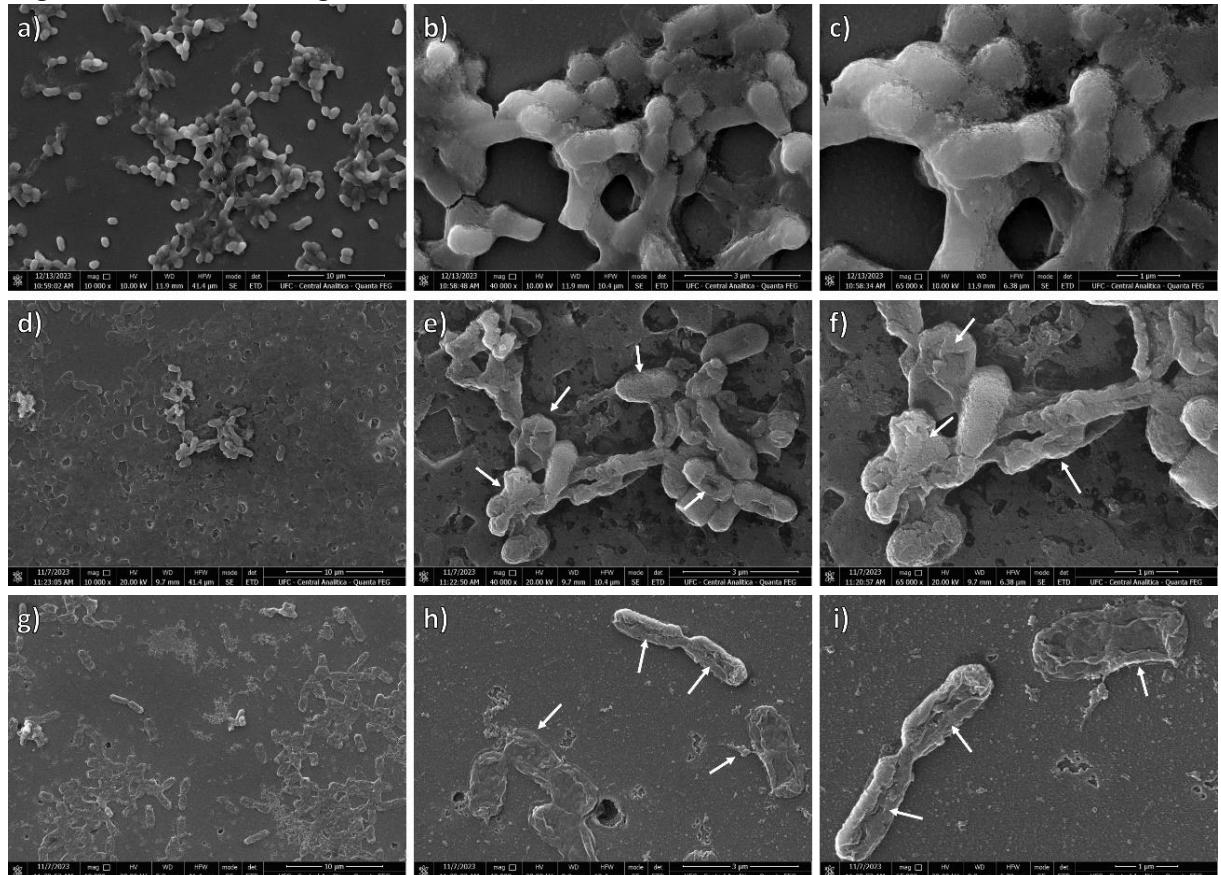


Fonte: Elaborada pelo autor. Eletromicrografias de biofilmes não tratados com OCp (a, b, c); tratados com 5 mg/ml de OCp (d, e, f) e tratados com 10 mg/ml de OCp (g, h, i). Magnificação: $\times 10.000$, $\times 40.000$ e $\times 65.000$. As setas brancas indicam alterações nas estruturas bacterianas.

As eletromicrografias do biofilme de *E. coli* ATCC 11303, tratado com 10 e 5 mg/ml e não tratado com OCp podem ser observadas na Figura 16. Nas micrografias da bactéria não tratada com OCp (Fig. 16a-c), é evidente a regularidade morfológica das células bacterianas com o formato cilíndrico de bacilos, além de uma alta densidade celular. Por outro lado, os biofilmes tratados com 5 mg/ml de OCp, observa-se uma redução significativa dos aglomerados celulares, juntamente com danos na topologia celular, também é notável o extravasamento de líquido intracelular, provavelmente por danos causados na membrana (Fig. 16d-f). Em relação

as micrografias dos biofilmes tratados com 10 mg/ml do OCp pode-se observar reduções na densidade celular, modificações na morfologia e consequente extravasamento de líquido intracelular, assim como é visto no tratamento com 5 mg/ml (Fig 16g-i). No entanto, para este último, os danos na superfície celular são mais evidentes.

Figura 16 – Eletromicrografias da formação de biofilme de *Escherichia coli* ATCC 11303.



Fonte: Elaborada pelo autor. Eletromicrografias de biofilmes não tratados com OCp (a, b, c); tratados com 5 mg/ml de OCp (d, e, f) e tratados com 10 mg/ml de OCp (g, h, i). Magnificação: $\times 10.000$, $\times 40.000$ e $\times 65.000$. As setas brancas indicam alterações nas estruturas bacterianas.

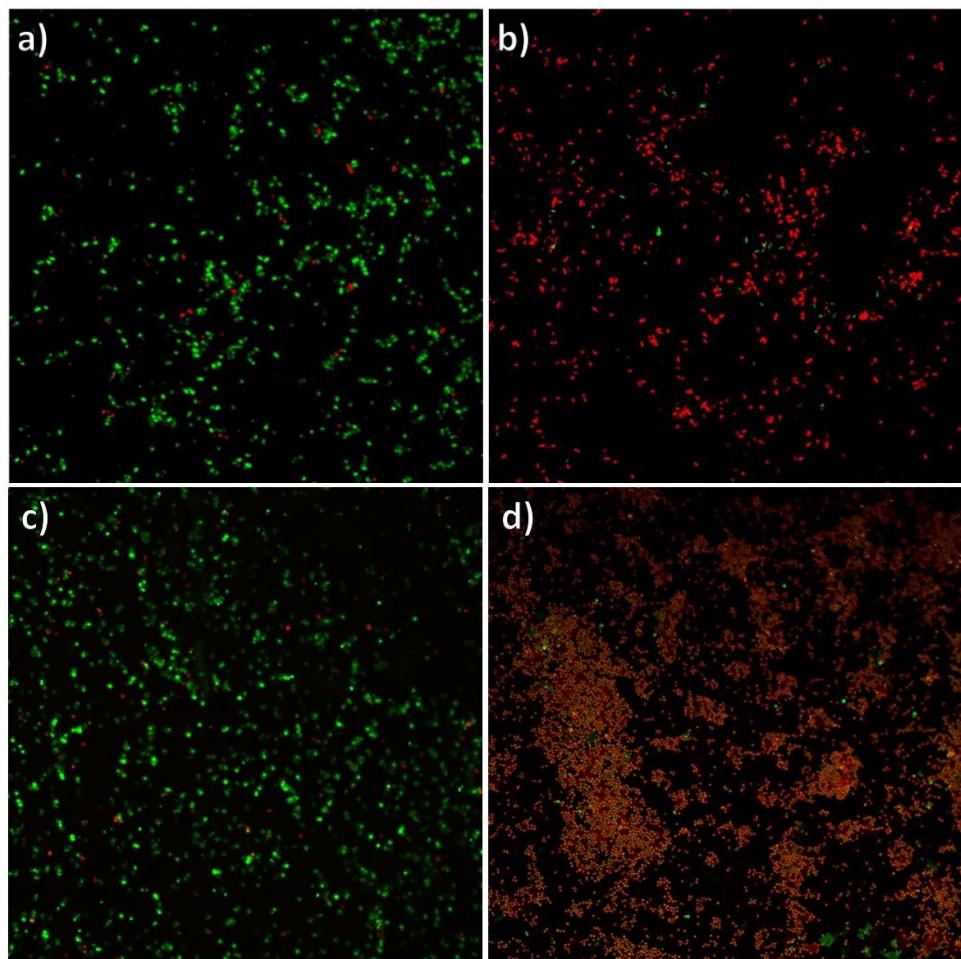
5.6 Análise de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

As imagens obtidas dos biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *E. coli* tratados com 10 mg/ml e não tratados com OCp podem ser vistos na Figura 17. Nas imagens é possível observar as células vivas apresentarem-se com a fluorescência verde (coradas com SYTO 9), enquanto as células mortas aparecem com fluorescência vermelha (coradas com iodeto de propídio). A Figura 17a apresenta a fluorescência referente a cepa *E. coli* ATCC 11303, sendo possível observar uma grande quantidade de células vivas presente no biofilme pré-formado não tratado. Por outro lado, na Figura 17b, que representa o tratamento com 10 mg/ml de OCp,

observa-se uma considerável redução no número de células viáveis e um aumento das células mortas, indicado pela fluorescência vermelha. Esses resultados reafirmam a diminuição do número de células viáveis que podem ser observadas nas análises de UFC realizadas para o biofilme desta cepa (Fig. 14f).

A Figura 17c corresponde ao biofilme pré-formado não tratado da cepa *S. aureus* ATCC 700698, sendo perceptível uma alta densidade de células vivas. Por outro lado, na Figura 17d, observa-se o biofilme tratado com 10 mg/ml de OCp, a densidade celular é ainda maior do que no tratamento sem o composto. No entanto, é notório a presença equiparável de células vivas e mortas sobrepostas uma sobre as outras, sugerindo uma redução de células viáveis presentes no biofilme. Esses resultados são ratificados pelas análises de enumeração do número de células viáveis dos biofilmes pré-formado (Fig. 13e), que revela uma diminuição significativa no número de UFCs na concentração de 10 mg/ml de OCp.

Figura 17 – Micrografias de biofilmes pré-formados de *Escherichia coli* ATCC 11303 e *Staphylococcus aureus* ATCC 700698



Fonte: Elaborada pelo autor. Micrografias de biofilmes pré-formados de *Escherichia coli* ATCC 11303 não tratados com OCp (a) e tratados com 10 mg/ml de OCp (b) e micrografias de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 não tratados com OCp (c) e tratados com 10 mg/ml de OCp (d). Magnificação: $\times 45$.

6 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são compostos provenientes do metabolismo secundário e são produzidos por diversas espécies vegetais. Em sua constituição, estão presentes diversos compostos químicos voláteis, como os terpenos (Stringaro; Colone; Angioletta, 2018). Atualmente, a literatura apresenta poucos estudos que avaliem os compostos presentes no OE de *C. pluriglandulosus*. No entanto, estudos de Carvalho *et al.* (2023), ao analisarem a composição do OE de *C. pluriglandulosus*, observaram que os compostos majoritários diferem dos encontrados no presente estudo, sendo estes a elmicina (25,77%), seguida de biciclogermacreno (9,37%) e cariofileno (8,99%). Já análises feitas por Vasconcelos *et al.* (2022) demonstraram que os componentes majoritários do OE para esta mesma espécie foram eucaliptol (17,41%), metileugenol (16,06%) e elmicina (15,99%).

Ainda que o OE do estudo de Vasconcelos *et al.* (2022) apresente o mesmo constituinte majoritário, todos os três óleos divergem em sua composição. Essas variações na composição dos óleos essenciais de uma mesma espécie são esperadas, tendo em vista que, na literatura existem diversos relatos de constituições diferentes para o óleo de uma mesma espécie de *Croton*. Essas mudanças na composição são influenciadas por vários fatores, como temperatura, incidência solar, época do ano, tipo de solo, localização geográfica, clima, estágio de desenvolvimento da planta, método de coleta e extração, e características genéticas intrínsecas de cada população (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017).

Entretanto, é uma ocorrência comum na literatura que os principais compostos identificados neste estudo também sejam encontrados nos óleos essenciais de espécies pertencentes ao gênero *Croton*. Análises realizadas por Medeiros *et al.* (2017) demonstraram que o principal constituinte volátil do OE de *C. grewioides* foi o α -pineno, representando 47,43% da composição total. Estudos feitos por García-Díaz *et al.* (2022) demonstraram que a composição do OE de *C. linearis* incluía o α -pineno como um de seus constituintes majoritários, com uma porcentagem de 11,1%.

Pesquisas realizadas por Vidal *et al.* (2016) demonstram que o OE de *C. rhamnifoloides* possui o espatulenol como constituinte majoritário, representando 22,46% da sua composição. De forma semelhante, estudos feitos por Morais *et al.* (2019) mostraram que o espatulenol é um dos principais componentes do *C. argyrophyllumoides* e *C. jacobinensis*, com porcentagens de 42,54% e 15,41%, respectivamente. Além disso, estudos recentes de Nunes *et al.* (2023) identificaram os mesmos compostos majoritários no OE de *C. blanchetianus*, porém em porcentagens diferentes: eucaliptol (20,97%), espatulenol (14,73%) e α -pineno (10,21%).

Dentre os compostos presentes no OCp, o eucaliptol foi o que apresentou a maior concentração. O composto é caracterizado como um monoterpeno amplamente presente nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais, especialmente no gênero *Croton*, e é bem conhecido por sua atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Morais *et al.*, 2019). O espatulenol, por sua vez, é um sesquiterpeno que possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, já relatadas na literatura (Nascimento *et al.*, 2018). O α -pineno é um monoterpeno também muito encontrado em espécies vegetais. Embora estudos de Freitas *et al.* (2020) não tenham demonstrado atividade antimicrobiana para esse composto, outros estudos, como os de Aćimović *et al.* (2017) e Ramdani *et al.* (2013), indicam que ele possui atividade antimicrobiana.

As análises da atividade antibacteriana do OCp demonstraram que o óleo apresenta CIM e CBM apenas para as cepas *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* JKD 6008 e *S. aureus* ATCC 25923, não sendo observada a inibição completa do crescimento bacteriano de *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303. Na literatura, não há relatos da atividade do OCp contra as espécies bacterianas utilizadas neste estudo. No entanto, Vasconcelos *et al.* (2022) demonstraram que o OE de *C. pluriglandulosus* apresentou CIM de 16 mg/ml para as seguintes cepas: *Streptococcus mutans* UA 159, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 e *Streptococcus sanguinis* ATCC 15300, concentração maior do que as encontradas no presente estudo.

Alguns estudos apresentam valores de CIM e CBM semelhantes aos encontrados para OCp, mas para outras espécies de *Croton*. Por exemplo, Siqueira *et al.* (2021) relataram que o OE de *C. tetradenius* apresentou CIM para *E. coli* ATCC 25922 em concentrações que variaram de 2,8 a 5,6 mg/ml e para *S. aureus* ATCC 25923 com concentrações de CIM entre 2,8 e 11,3 mg/ml. Essas variações se devem ao fato de a análise ter focado em dois genótipos da mesma espécie de *C. tetradenius*. Outras pesquisas, como a de Rocha *et al.* (2021), demonstraram que a CIM e CBM para o OE de *C. tetradenius* para cepas de *S. aureus* foram de 4 mg/ml. Para outra espécie analisada, *C. pulegioidorous*, os valores de CIM e CBM foram de 8 mg/ml, assemelhando-se aos valores obtidos no presente estudo. Além disso, análises de Valarezo *et al.* (2021) mostraram que o OE de *C. ferrugineus* apresentou uma CIM superior a 2,5 mg/ml para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Estudos de Nunes *et al.* (2023) demonstraram que o óleo essencial de *C. blanchetianus* apresentou CIM de 0,78 mg/ml para as cepas *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, e CBM de 1,56 mg/ml. Para a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, a CIM e a CBM foram de 1,56 mg/ml e 6,25 mg/ml, respectivamente. Para *E.*

coli ATCC 11303, a CIM foi de 1,56 mg/ml e a CBM de 3,12 mg/ml. Essas divergências na atividade antibacteriana dos óleos essenciais do gênero *Croton* podem ser atribuídas ao fato de que esses óleos são misturas complexas com variações na sua constituição química. Mesmo que um constituinte majoritário apresente efeito antimicrobiano comprovado, a combinação dos componentes do óleo pode resultar em respostas sinérgicas e/ou antagônicas (Valarezo *et al.*, 2021).

Foi possível observar que o OCp não foi eficaz em inibir o crescimento bacteriano da *E. coli* ATCC 11303, o que é algo comumente encontrado na literatura para OE de espécies de *Croton*. Resultados de Vale *et al.* (2021) são semelhantes aos deste estudo, mostrando que o OE de *C. piahuensis* obteve atividade bactericida apenas contra cepas de *S. aureus* e não apresentou efeito contra *E. coli* ATCC 11303. Estudos de Oliveira *et al.* (2022), demonstram que o OE de *C. canduplicatus* apresentou uma CIM de 256 µg/ml e CBM de 512 µg/ml para *S. aureus* ATCC 25923 e para *S. aureus* ATCC 33591, a CIM foi de 512 µg/ml e a CBM de 1024 µg/ml, enquanto para *E. coli* ATCC 25922, não houve atividade inibitória. Pesquisas realizadas por Araujo *et al.* (2017) mostram que o OE de *C. heliotropifolius* não apresentou CIM e CBM para a cepa de *E. coli* ATCC 94863, mas apresentou uma CIM de 500 µg/ml para *S. aureus* ATCC 6538, porém, sem efeito bactericida em nenhuma das concentrações testadas.

É possível observar que as bactérias gram-negativas são menos suscetíveis a ação dos óleos essenciais das espécies do gênero *Croton*, ao contrário das gram-positivas, que são mais sensíveis. Esses resultados são observados em diversos estudos (Daouda *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2022). A principal justificativa cerne na presença da membrana externa das bactérias gram-negativas, que atua como uma barreira contra os agentes microbianos que têm como alvo a membrana celular. Isso inibe a ação da maioria dos OEs, cujo mecanismo de ação geralmente envolve interação e danos à membrana dos microrganismos (Vale *et al.*, 2021).

As análises de formação de biofilme tratados com OCp demonstraram uma redução significativa da biomassa em todas as cepas bacterianas testadas, mesmo que, conforme já mencionado, não tenha sido observada atividade contra as células planctônicas de *S. epidermidis* e *E. coli*. Para as espécies de *S. aureus* avaliadas, estas apresentaram reduções da biomassa mesmo em concentrações sub-inibitórias do OCp.

Os resultados obtidos nas análises de formação de biofilme são comparáveis aos observados nos ensaios com células planctônicas, nos quais não foram encontrados CIM e CBM para as cepas de *S. epidermidis* e *E. coli*. Esse padrão se reflete na redução do número de UFCs, na qual essas cepas apresentaram reduções menores em comparação com as cepas de *S. aureus*,

que apresentaram CIM e CBM. Embora os resultados não sejam diretamente análogos devido as diferenças nas atividades metabólicas das células em estado planctônico e de biofilme, observa-se que o processo de formação do biofilme ainda é inibido. Isso se correlaciona com os dados de CIM e CBM, pois no procedimento experimental, o OCp é adicionado antes da formação do biofilme nas placas de poliestireno. Dessa forma, ele é capaz de atuar diretamente nas células planctônicas e interferir no processo de formação do biofilme.

No entanto, em todas as espécies bacterianas estudadas, observamos reduções significativas na biomassa nos protocolos com biofilmes. Esse resultado é interessante, pois a redução da biomassa representa uma possível diminuição na matriz polimérica extracelular, que é um fator importante para a sobrevivência e resistência do biofilme (Gupta *et al.*, 2016).

Na literatura, não há relatos sobre a ação do óleo essencial de *C. pluriglandulosus* isoladamente contra biofilmes bacterianos. Os estudos registrados com essa espécie, como o de Vasconcelos *et al.* (2022), avaliaram o óleo essencial de *C. pluriglandulosus* em combinação com clorexidina. Portanto, este estudo é primeiro a analisar o OCp de forma isolada contra a formação de biofilmes bacterianos. Neste estudo de Vasconcelos *et al.* (2022), foi observado que, para a cepa *S. mutans* UA 159, não houve redução da biomassa, mas houve uma diminuição no número de UFCs. Em contraste, as cepas *S. salivarius* ATCC 7073 e *S. mutans* ATCC 25175 apresentaram reduções na biomassa, mas não tiveram reduções significativas nas UFCs.

Existem relatos de outros estudos que avaliaram o OE de outras espécies de *Croton*. Nunes *et al.* (2022) demonstraram que o OE de *C. blanchetianus* reduziu significativamente a biomassa das cepas *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303 em concentrações variando de 50 a 0,78 mg/ml, concentrações cinco vezes maiores do que as avaliadas no presente estudo. Contudo, mesmo em concentrações menores, o OCp apresentou reduções semelhantes as observadas no estudo de Nunes *et al.* (2022). Nesse estudo, também foi relatado a diminuição no número de UFCs das cepas *S. aureus* ATCC 700698 e ATCC 25923, com reduções de 2 a 11 log em comparação com o controle. As cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303 apresentaram reduções de 1 a 8 log. A partir disso, podemos inferir que, assim como os resultados do OCp, o óleo de *C. blanchetianus* reduziu mais o número de UFCs das cepas de *S. aureus*. Estas observações possivelmente se devem à composição dos óleos, que, segundo análises de GC-MS, apresentaram os mesmos constituintes majoritários, embora em porcentagens diferentes.

Vale *et al.* (2021) demonstraram que o OE de *C. piauhiensis* inibiu significativamente a formação do biofilme de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698

e *E. coli* ATCC 11303 em todas as concentrações testadas (5 a 0,07% v/v). Entretanto, para os biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 12228, a redução só foi significativa nas concentrações de 5% a 1%. Os autores também mostraram que o OE de *C. piauiensis* reduziu significativamente o número de células viáveis, cerca de 1 a 4 log para os biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303. Já para o biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228, houve redução de 1 log nas duas maiores concentrações testadas (5% e 2,5%). Esses resultados se assemelham aos do presente estudo, pois, mesmo em concentrações diferentes, pode-se observar que a redução do número de UFCs foi mais significativa para cepas de *S. aureus* e *E. coli* do que para *S. epidermidis*, assim como observado com o OCp.

A capacidade de redução da biomassa bacteriana é atribuída a características hidrofóbicas dos OEs, que podem se difundir pela parede das células bacterianas, causando danos e alterando a permeabilidade da membrana (Vale *et al.*, 2021). Além disso, os componentes dos OEs podem atravessar a membrana celular, levando a danos na estrutura bacteriana, como a redução do potencial de membrana, lise celular e perda de íons, seguida de depleção de ATP (Angane *et al.*, 2022). Esses danos na membrana bacteriana são evidenciados pelas eletromicrografias das cepas de *S. aureus* e *E. coli*, que mostram deformidades na morfologia padrão das células bacterianas, danos claros na superfície bacteriana e vazamento de líquido intracelular. Isso sugere que a ação do OCp ocorre diretamente na membrana, assim como observado em outros óleos essenciais mencionados na literatura.

As alterações na membrana são visíveis nas eletromicrografias tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli*, mesmo que esta última não tenha apresentado CIM e CBM. No entanto, houve reduções significativas na sua biomassa e no número de células viáveis nas concentrações de 10 e 5 mg/ml, o que é consistente com as imagens obtidas, pois uma parte das células foram afetadas pelo OCp. Além disso, nas imagens é possível observar um aumento das dimensões celulares. Esse processo está frequentemente associado à divisão celular, na qual, devido à ausência de membrana, a célula acaba sofrendo lise.

É importante destacar que os estudos conduzidos por Vale *et al.* (2021) não registraram atividade bactericida nas cepas de *S. epidermidis* e *E. coli*. No entanto, eles observaram ação antibiofilme, similar aos resultados encontrados no estudo com o OCp. Outros trabalhos também relatam a falta de atividade contra células planctônicas, mas destacaram a eficácia na ação contra biofilmes. Por exemplo, os estudos de Kavanaugh e Ribbeck (2012) analisaram o efeito do OE de *Thymus vulgaris* em biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, demonstrando sua efetividade na inibição da formação de biofilme, embora não tenha apresentado ação contra células planctônicas. Essa capacidade de combater biofilmes sem afetar

o desenvolvimento de células planctônicas é altamente promissora, uma vez que pode prevenir o surgimento de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos (Vale *et al.*, 2021).

As análises de OCp com biofilmes maduros demonstraram que não houve redução na biomassa, exceto para a *E. coli* ATCC 11303, que apresentou uma redução significativa de cerca de 39% da biomassa. Quanto à redução das UFCs, todas as cepas tiveram diminuições no número de log, exceto *S. epidermidis* 12228.

Atualmente, existem poucos estudos que relacionam a atividade de OE do gênero *Croton* com a inibição de biofilmes maduros. No entanto, estudos de Oliveira *et al.* (2022) mostraram que o OE de *C. canduplicatus* reduziu a biomassa de biofilmes maduros em 32% para *S. aureus* ATCC 25923 e em 27% para *S. aureus* ATCC 33591. Estudos de Firmino *et al.* (2019) demonstraram que o ICB4, um diterpeno isolado do OE de *C. blanchetianus*, apresentou uma redução de 71,2% na biomassa de *S. parasanguinis* ATCC 903 e uma redução de 1,76 log na concentração de 125 µg/ml. O ICB4 também foi avaliado contra *S. mutans* ATCC 700610, resultando em uma redução de 75% da biomassa do biofilme, mas com uma redução de apenas 0,8 log na concentração de 125 µg/ml. Pode-se observar que, mesmo com reduções significativas na biomassa, os valores de redução de UFCs são relativamente semelhantes e próximos aos obtidos com o OCp.

Estudos de Vale *et al.* (2019) avaliaram a ação do OE de *Vitex gardneriana* contra biofilmes pré-formados de cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 10145. Observou-se uma diminuição da biomassa de *S. aureus* nas concentrações de 2,5 a 0,625% (v/v), mas essa diminuição não foi observada para *P. aeruginosa*. Em relação as UFCs, *S. aureus* apresentou reduções significativas apenas nas concentrações de 2,5% e 1,25%, enquanto *P. aeruginosa* não apresentou redução em nenhuma das concentrações testadas.

Análises recentes de Lopes *et al.* (2024) demonstraram a atividade do OE de *Lippia grata* contra biofilmes maduros de *S. aureus* ATCC 25923, em que não houve reduções significativas da biomassa nos estudos dessa cepa. Entretanto, para *S. aureus* ATCC 700698 e JKD 6008, os biofilmes apresentaram reduções significativas na biomassa em concentrações de 10 a 2,5 mg/ml. Em relação ao número de unidades formadoras de colônias (UFC), os biofilmes de todas as cepas de *S. aureus* tratadas tiveram uma redução de aproximadamente 2 log. Comparando esses resultados com os do OCp, observa-se uma semelhança nas reduções de log nos estudos de UFC, apesar do OCp não ter obtido reduções de biomassa como o OE de *L. grata*.

Pesquisas de Melo *et al.* (2019) analisaram o OE de *Ocimum gratissimum* contra biofilmes maduros de cepas multirresistentes de *S. aureus* (5B) e *E. coli* (P12). Observou-se

uma redução significativa tanto da biomassa quanto do número de UFCs, sendo essa redução ainda maior para a cepa de *E. coli*, com uma diminuição de 8 log, e de 4 log para *S. aureus* na concentração de 1 mg/ml. Estudos de Jardak *et al.* (2017) demonstraram que o OE de *Rosmarinus officinalis* foi capaz de inibir o biofilme pré-formado de *S. epidermidis* S61 em 67,53% na concentração de 50 µl/ml e 29,05% na concentração de 12,5 µl/ml. Os autores destacam que esses resultados para biofilmes maduros são inferiores aos obtidos na formação do biofilme, o que também foi observado com o OCp.

Como foi observado, houve uma redução na atividade antibiofilme do OCp para os biofilmes maduros. No entanto, essas reduções são esperadas, pois, quando os microrganismos se encontram nesse estado, podem ser até 1000 vezes mais resistentes do que na sua forma planctônica (Karygianni *et al.*, 2014). Nessas comunidades, eles exibem tolerância/resistência a múltiplas drogas e conseguem sobreviver em ambientes hostis, contornando as pressões seletivas (Olwal *et al.*, 2019). Atualmente, sabe-se que a própria atividade metabólica das células presentes nos biofilmes é variada: na superfície, há uma maior atividade, enquanto nas regiões mais interna a atividade é menor, o que dificulta a ação de antimicrobianos (Soares *et al.*, 2019).

Mesmo sem a redução da biomassa, observou-se que a concentração de 10 mg/ml de OCp reduziu significativamente o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) para quase todas as cepas. Essas reduções foram confirmadas pelas análises de microscopia confocal, que mostraram um aumento visível no número de células bacterianas mortas em comparação com o controle. No entanto, ainda é possível observar células bacterianas vivas nos biofilmes maduros de *E. coli*, o que corrobora com os dados das células planctônicas onde OCp não apresentou CIM e CBM. Além disso, a microscopia confocal revelou um aumento da densidade bacteriana, principalmente para a cepa de *S. aureus* ATCC 700698. Isso pode ter sido causado pelo aumento de estresse no biofilme, levando a uma maior produção de EPS e, consequentemente, a um aumento da biomassa. Isso pode justificar os altos valores de biomassa observados, principalmente para a cepa *S. aureus* JKD 6008 em 10 mg/ml, mas ainda assim houve reduções em seu número de UFCs.

A atividade antibacteriana e antibiofilme descrita neste estudo está estreitamente relacionada com a composição do OCp e a interação entre seus compostos. O eucaliptol (1,8-cineol) foi identificado como o composto majoritário presente no OCp. Este composto, amplamente estudado e com vários relatos na literatura sobre sua atividade antimicrobiana, é conhecido (assim como a maioria dos terpenos) pela sua capacidade de permeabilizar a membrana e danificar a estrutura bacteriana (Angane *et al.*, 2022). Ademais, estudos de

Packiavathy *et al.* (2012) demonstraram que vários terpenos, incluindo o eucaliptol, têm a capacidade de bloquear receptores que recebem sinais de vários autoindutores, inibindo a via de quorum sensing, que é crucial para o processo de formação do biofilme.

Diversos estudos relatam os mecanismos antimicrobianos do eucaliptol. Moo *et al.* (2021) avaliaram diversos mecanismos de ação do eucaliptol em *Klebsiella pneumoniae*. Nesses estudos, constatou-se que o eucaliptol afetou significativamente a membrana bacteriana, aumentando sua carga superficial, o que indica uma perda de lipopolissacarídeos na membrana e, consequentemente, um aumento na permeabilidade da membrana. Esse aumento na permeabilidade prejudica as funções da cadeia respiratória, resultando em uma diminuição dos níveis de ATP. Os estudos também relataram a liberação de conteúdo intracelular, como ácidos nucleicos e proteínas, para o ambiente extracelular.

O eucaliptol é um composto conhecido há bastante tempo e com propriedades terapêuticas bem estabelecidas. Existem registros na Alemanha do seu uso em cápsulas contendo 100 ou 200 mg, sendo comumente utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias como distúrbios respiratórios, resfriados, bronquites, asma e sinusite (Juergens *et al.*, 2003). A administração oral desse terpeno é bem compreendida: ele é absorvido no intestino delgado e metabolizado pelo fígado. Sua disponibilidade sistêmica ocorre pela corrente sanguínea, podendo também atingir o sistema brônquio e ser exalado pelas vias aéreas, o que permite que seus benefícios se estendam ao sistema respiratório como um todo (Beauchamp; Kirsch; Buettner, 2010).

Estudos de Hriouech *et al.* (2020) demonstraram que o eucaliptol possui uma atividade bacteriana mais fraca em comparação com antibióticos comuns. No entanto, o efeito combinado do terpeno com antibióticos como gentamicina e amoxicilina reduziu significativamente a CIM dos fármacos, evidenciando a atividade sinérgica do eucaliptol e seu potencial uso em combinações terapêuticas. O 1,8-cineol é considerado bastante seguro e bem tolerado em doses terapêuticas normais. Contudo, seu uso excessivo, seja por ingestão oral, inalação ou aplicação na pele, pode causar efeitos de toxicidade aguda (Colalto, 2020).

Os terpenos são compostos naturais considerados relativamente seguros, porém, são capazes de alterar a fluidez da membrana e atravessá-las, podendo levar a morte celular (Baser e Buchbauer, 2015). Além disso, há relatos na literatura de que os monoterpenos podem apresentar propriedades hepatotóxicas, embora tenha sido registrado apenas em modelos animais (Zárybnický *et al.*, 2018). Contudo, estudos de Rodrigues *et al.* (2015) mostraram que o α -pineno apresentou baixa toxicidade contra eritrócitos humanos, com uma HC50 de 233,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, esses dados sugerem possíveis aplicações seguras para o OCp, tendo em vista a baixa

toxicidade de um dos seus constituintes.

Podemos conjecturar usos tópicos promissores do OE de *C. pluriglandulosus*, reforçado por diversas pesquisas na literatura. Estudos de Mohammed *et al.* (2022) demonstraram que uma pomada contendo eucaliptol auxiliou no processo de cicatrização de feridas em ratos, reduzindo o processo inflamatório. Análises de Bulhões *et al.* (2022) mostraram que o OE de *L. gracilis*, em pomada (10%), acelera a cicatrização de lesões cutâneas e reduz a inflamação em feridas em ratos. Estudos de Tadele *et al.* (2009) demonstraram que uma formulação tópica de OE de *Thymus vulgaris* a 1% (p/v) em bases hidrofilicas foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* e *S. aureus* em níveis comparáveis a produtos antimicrobianos comerciais. Pesquisas de Oladimeji *et al.* (2015) demonstraram que uma pomada à base de OE de *Lippia multiflora* (10%) em uma base de gordura de lã hidratante apresentou eficácia na inibição de bactérias causadoras de infecções na pele, como *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Além do uso potencial em pomadas, há também a possibilidade de utilizar o OE de *C. pluriglandulosus* em filmes e revestimentos comestíveis. Muitos óleos essenciais são empregados na composição desses filmes para conferir propriedades antimicrobianas e melhorar outros aspectos físico-químicos. Um exemplo disso é visto nos estudos de Vahedikia *et al.* (2019), que demonstraram que um filme de zeína combinado com nanopartículas de quitosana e OE de canela apresentou potencial antibacteriano contra *S. aureus* e *E. coli*. Esse filme resultou em uma embalagem natural alimentícia promissora, com boas características físicas, estruturais e antibacterianas.

Estudos promissores têm avaliado o uso de OEs em curativos. Lemnaru *et al.* (2023) investigaram a incorporação dos OEs de noz-moscada e agulha de abeto em curativos a base de celulose bacteriana. No estudo, os autores observaram que os compostos voláteis dos OEs foram liberados pelas membranas dos curativos. Eles demonstraram que as propriedades antiaderentes dessas membranas são eficazes no tratamento de infecções cutâneas causadas por cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* 25922.

Gheorghita *et al.* (2022) analisaram a atividade de OEs de erva-doce, hortelã-pimenta, pinho e tomilho incorporados em matrizes poliméricas a base de polivinílico/polivinilpirrolidona (PVA/PVP) para serem usados como curativos no tratamento de úlceras de pressão. Os curativos demonstraram alta eficiência, especialmente na atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, além de não apresentarem toxicidade ou alterações morfológicas nas células de fibroblastos. Esses curativos representam uma alternativa aos disponíveis no mercado, que são limitados a absorver

exsudatos de feridas abertas. A proposta dos autores visa não apenas auxiliar na cicatrização, mas também liberar compostos importantes no combate de infecções.

Estudos realizados por Lamarra *et al.* (2020) avaliaram o uso de emulsões a base de quitosana funcionalizadas com óleo essencial de *Myrocarpus fastigiatus* e PVA. O curativo demonstrou eficácia antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. epidermidis* e promoveu a regeneração celular após 24 horas de contato, sem apresentar citotoxicidade para células HaCaT. Com base nesses resultados, os autores concluíram que o curativo é útil para o tratamento de queimaduras superficiais e feridas leves, devido a sua capacidade de liberação controlada do óleo essencial de *Myrocarpus fastigiatus*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *C. pluriglandulosus* apresentou como principal componente o eucaliptol. Em relação a sua atividade antimicrobiana, foi demonstrado efeitos bactericidas e bacteriostáticos apenas contra as cepas de *S. aureus*. No entanto, as análises da atividade antibiofilme revelaram que o OCp foi capaz de reduzir a biomassa de todas as cepas avaliadas nesse estudo em quase todas as concentrações testadas. Além disso, o OCp também diminuiu a viabilidade celular das cepas sendo as mais notáveis observadas em *S. aureus*. Esses dados são corroborados pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, que evidenciaram danos estruturais nas células bacterianas.

No que diz respeito a atividade antibiofilme dos biofilmes maduros, houve uma diminuição na eficácia do OCp, pois não foram observadas reduções significativas na biomassa para nenhuma cepa e em nenhuma concentração testada, com exceção de *E. coli* ATCC 11303. Por outro lado, a viabilidade celular foi reduzida em quase todas as cepas de *Staphylococcus*, na maior concentração de 10 mg/ml, com a exceção de *S. epidermidis* ATCC 12228, que não apresentou redução no número de UFC. Contudo, os dados que demonstram a redução da viabilidade celular do biofilme maduro são corroborados pelos dados das imagens de microscopia confocal. Essas imagens revelam um aumento no número de células mortas na presença do OCp, evidenciando sua ação sobre a membrana celular. Esse mecanismo é observado tanto pelo MEV quanto pelo MCVL.

Esses resultados demonstram que o OCp é um composto natural promissor para o tratamento de infecções causados por biofilmes bacterianos das espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Futuramente, o OCp pode ser incorporado em pomadas ou curativos para o tratamento de infecções ou feridas, devido à sua capacidade de reduzir a viabilidade celular bacteriana, especialmente em cepas de *S. aureus*. Além disso, pode ser empregado para a composição de filmes a fim de reduzir processos de contaminação em alimentos. No entanto, são necessários novos estudos para analisar essas premissas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Ali Taher; SALIH, Hind Abdallah; HASSAN, Bassam A. Review of Beta lactams. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 26, n. 01, p. 1863-1881, 2022.
- ABBAS, Muhammad SA; TAHIR, Muhammad Aslam. Ecological and Phytochemical Significance of Croton bonplandianum (Bail). **Asian Journal of Research in Botany**, v. 4, n. 2, p. 26-32, 2020.
- AĆIMOVIĆ, Milica G. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Angelica archangelica root essential oil. **Natural product communications**, v. 12, n. 2, p. 1934578X1701200216, 2017.
- ALEGBELEYE, Oluwadara O.; SANT'ANA, Anderson S. Pathogen subtyping tools for risk assessment and management of produce-borne outbreaks. **Current opinion in food science**, v. 32, p. 83-89, 2020.
- ALEGBELEYE, Oluwadara Oluwaseun; SINGLETON, Ian; SANT'ANA, Anderson S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. **Food microbiology**, v. 73, p. 177-208, 2018.
- ALMAGOR, Jonatan *et al.* The impact of antibiotic use on transmission of resistant bacteria in hospitals: Insights from an agent-based model. **PLoS one**, v. 13, n. 5, p. e0197111, 2018.
- AL-MAQTARI, Qais Ali *et al.* Application of essential oils as preservatives in food systems: challenges and future prospectives—a review. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-38, 2021.
- ALSARAF, Shahad *et al.* Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 1021-1028, 2020.
- ANGANE, Manasweeta *et al.* Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 464, 2022.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP *et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- ANTONANZAS, Fernando; LOZANO, Carmen; TORRES, Carmen. Economic features of antibiotic resistance: the case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmacoconomics**, v. 33, p. 285-325, 2015.
- ARAUJO, Floricea M. *et al.* Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial crops and products**, v. 105, p. 203-206, 2017.
- ASLAM, Bilal *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, p. 1645-1658, 2018.
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical**

toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALLESTERO, Jaqueline Garcia de Almeida *et al.* Management of multidrug-resistant tuberculosis: main recommendations of the Brazilian guidelines. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, p. e20190290, 2020.

Baser, K.H.C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2015). **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**, Second Edition (2nd ed.). CRC Press.

BASSOLÉ, Imaël Henri Nestor; JULIANI, H. Rodolfo. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BAZARGANI, Mitra Mohammadi; ROHLOFF, Jens. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food control**, v. 61, p. 156-164, 2016.

BEAUCHAMP, J.; KIRSCH, F.; BUETTNER, A. Real-time breath gas analysis for pharmacokinetics: monitoring exhaled breath by on-line proton-transfer-reaction mass spectrometry after ingestion of eucalyptol-containing capsules. **Journal of breath research**, v. 4, n. 2, p. 026006, 2010.

BENGTSSON-PALME, Johan; KRISTIANSSON, Erik; LARSSON, DG Joakim. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 1, p. fux053, 2018.

BENNETT, John E.; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J. (Ed.). Mandell, Douglas y Bennett. **Enfermedades infecciosas**. Principios y práctica. Elsevier Health Sciences, 2020.

BLAIR, Jessica MA *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BOTELHO, João; GROSSO, Filipa; PEIXE, Luísa. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 100640, 2019.

BRNAWI, Wafaa I. *et al.* Antimicrobial activity of leaf and bark cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in broth system and on celery. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 3, p. e13888, 2019.

CÂNDIDO, A. C. S. *et al.* Composição química e fitotoxicidade dos óleos essenciais de *Croton doctoris* S. Moore (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021.

CARNEIRO-TORRES, Daniela Santos; DA SILVA, Otávio Luís Marques; CORDEIRO, Inês. Flora da Bahia: *Euphorbia* (Euphorbiaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 17, 2017.

CARVALHO, Rayara JP, *et al.* Antimicrobial Activity the Essential Oil from *Croton pluriglandulosus* Carn. Leaves against Microorganisms of Clinical Interest. **J. Fungi** 2023, 9, 756.

CENTELEGHE, Isabella *et al.* Dual species dry surface biofilms; *Bacillus* species impact on *Staphylococcus aureus* survival and surface disinfection. **Journal of Applied Microbiology**,

v. 133, n. 2, p. 1130-1140, 2022.

CHANG, C.-W.; LIN, M.-H. Optimization of PMA-qPCR for *Staphylococcus aureus* and determination of viable bacteria in indoor air. **Indoor Air**, v. 28, n. 1, p. 64-72, 2018.

CHEN, LIANG; SUH, Byoung In; YANG, Jie. Antibacterial dental restorative materials: A review. **Am J Dent**, v. 31, n. Sp Is B, p. 6B-12B, 2018.

CHOI, Seong Yeol *et al.* *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 2, p. 705-713, 2020.

CHOUHAN, Sonam; SHARMA, Kanika; GULERIA, Sanjay. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CIOFU, Oana; TOLKER-NIELSEN, Tim. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 913, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method for Dilution Antibacterial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**: Approved Standard – 10th ed., M07-A10, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: Approved Standard - 27th ed., M100, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

COLALTO, Cristiano. Volatile molecules for COVID-19: A possible pharmacological strategy?. **Drug Development Research**, v. 81, n. 8, p. 950-968, 2020.

Croton L. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/3057454>>. Acesso em: 28 out. 2023.

DA FRANCA RODRIGUES, Klinger Antonio *et al.* *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.

DAOUDA, Touré *et al.* Terpenes, antibacterial and modulatory antibiotic activity of essential oils from *Croton hirtus* L'Hér.(Euphorbiaceae) from Ivory Coast. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 4, p. 607-616, 2014.

DE MEDEIROS, Vivianne Marcelino *et al.* Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewioides*. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 468-471, 2017.

DHIFI, Wissal *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DIGIANDOMENICO, Antonio; SELLMAN, Bret R. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation?. **Current opinion in microbiology**, v. 27, p. 78-85, 2015.

DO NASCIMENTO, Kamilla Felipe *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol.

Journal of ethnopharmacology, v. 210, p. 351-358, 2018.

DO VALE, Jean Parcelli Costa *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of *Vitex gardneriana schauer* leaves's essential oil. **Microbial pathogenesis**, v. 135, p. 103608, 2019.

DO VALE, Jean Parcelli Costa *et al.* Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Potential of Essential Oil from *Croton piauhiensis* Müll. Arg. **Current Microbiology**, v. 78, p. 1926-1938, 2021.

DODDS, David R. Antibiotic resistance: A current epilogue. **Biochemical pharmacology**, v. 134, p. 139-146, 2017.

DONG, Ying; SPEER, Christian P. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 100, n. 3, p. F257-F263, 2015.

DURAND, Guillaume André; RAOULT, Didier; DUBOURG, Grégory. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 4, p. 371-382, 2019.

EL ASBAHANI, A. *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. *Trop Doct* 2020;30:114–6.

FERREIRA, M. J. G.; DIAS, F. G. B.; SANTOS, S. M. dos; MENEZES, R. C. de S.; SILVA, L. M. R. da; FIGUEIREDO, E. A. T. de. Evaluation of medicinal plants as potential food antimicrobial additives. **Research, Society and Development, [S. l.]**, v. 9, n. 5, p. e153953295, 2020.

FIRMINO, Nairley C. Sá *et al.* Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral Streptococci biofilms. **Industrial crops and products**, v. 131, p. 371-377, 2019.

FLEMMING, Hans-Curt; WUERTZ, Stefan. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247-260, 2019.

FOSTER, Timothy J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Veterinary dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 456-470, 2009.

FREITAS, Priscilla Ramos *et al.* GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112106, 2020.

FRIEDRICH, Alex W. Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: the way to go. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 169, p. 25-30, 2019.

FRIERI, Marianne; KUMAR, Krishan; BOUTIN, Anthony. Antibiotic resistance. **Journal of infection and public health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.

- FUTO, Momir *et al.* Embryo-like features in developing *Bacillus subtilis* biofilms. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 1, p. 31-47, 2021.
- GALY, A. *et al.* La peste: mise au point et actualités. **La Revue de Médecine Interne**, v. 39, n. 11, p. 863-868, 2018.
- GARCÍA-DÍAZ, Jesús *et al.* Chemical composition and in vitro and in silico antileishmanial evaluation of the essential oil from *Croton linearis* Jacq. stems. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1712, 2022.
- GARCÍA-SALINAS, Sara *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de diferentes componentes de origem natural presentes em óleos essenciais. **Moléculas**, v. 23, n. 6, pág. 1399, 2018.
- GAYNES, Robert. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 5, p. 849, 2017.
- GHEORGHITA, Daniela *et al.* Essential oils as antimicrobial active substances in wound dressings. **Materials**, v. 15, n. 19, p. 6923, 2022.
- GOLKAR, Zhabiz; BAGASRA, Omar; PACE, Donald Gene. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, p. 129-136, 2014.
- GOULD, Kate. Antibiotics: from prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572-575, 2016.
- Guimarães AS, Carvalho WRG. Desinformação, Negacionismo e Automedicação: a relação da população com as drogas “milagrosas” em meio à pandemia da COVID-19. **Interamerican Journal of Medicine and Health**, v. 3, 2020.
- GUPTA, Priya *et al.* Biofilm, pathogenesis, and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of microbiology**, v. 198, p. 1-15, 2016.
- HOLMES, Alison H. *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.
- HOOPER, David C.; JACOBY, George A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12-31, 2015.
- HRIOUECH, Soukayna *et al.* The antistaphylococcal activity of amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, and 1, 8-cineole alone or in combination and their efficacy through a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.
- JARDAK, Marwa *et al.* Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. **Lipids in health and disease**, v. 16, p. 1-10, 2017.
- JAYACHANDRAN, Sadaksharam. Pre-antibiotics era to post-antibiotic era. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 30, n. 2, p. 100-101, 2018.

- JU, Jian *et al.* Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 22-32, 2019.
- JUERGENS, Uwe R. *et al.* Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory medicine**, v. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.
- KALIA, Vipin Chandra. Quorum sensing inhibitors: an overview. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 224-245, 2013.
- KANG, Cheol-In *et al.* Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. **Infection & chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 67, 2018.
- KARYGIANNI, Lamprini *et al.* Antimicrobial photoactivation of in situ oral biofilms by visible light plus water-filtered infrared A and tetrahydroporphyrin-tetratosylate (THPTS). **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 145, 2021.
- KAUR, Gurpreet *et al.* Prevalence and in vitro susceptibility pattern of MRSA, VRSA, VISA isolates from various clinical samples in tertiary care hospital. 2022.
- KAVANAUGH, Nicole L.; RIBBECK, Katharina. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4057-4061, 2012.
- KELLERMAN, R. D.; RAKEL, D.; CONN, H. F. **Conn's current therapy 2022**. Philadelphia, Pa: Elsevier, 2022.
- KLEIN, Eili Y. *et al.* Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 15, p. E3463-E3470, 2018.
- KONG, Hoi-Kuan *et al.* Fine-tuning carbapenem resistance by reducing porin permeability of bacteria activated in the selection process of conjugation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15248, 2018.
- KOO, Hyun *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740-755, 2017.
- KOSMIDIS, Christos . Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 40, n. 3, p. 204-209, 2012.
- KOUL, Shikha *et al.* Potential emergence of multi-quorum sensing inhibitor resistant (MQSIR) bacteria. **Indian journal of microbiology**, v. 56, p. 1-18, 2016.
- LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 10.1128/cmrr.00020-18, 2018.
- LAMARRA, J. *et al.* Biomaterial-based dressings as vehicle for chitosan-encapsulated cabreuva essential oil: Cytotoxicity and regenerative activity. **Reactive and Functional Polymers**, v. 156, p. 104728, 2020.

- LE, Katherine Y.; PARK, Matthew D.; OTTO, Michael. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 359, 2018.
- LEBEAUX, David *et al.* From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, 2013.
- LEE, Soon Min; CHANG, Meayoung; KIM, Ki-Soo. Blood culture proven early onset sepsis and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants in Korea. **Journal of Korean medical science**, v. 30, n. Suppl 1, p. S67-S74, 2015.
- LEITE, Tiago Rodrigues *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *Croton limae*. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 2015-2019, 2017.
- LEMNARU, Georgiana-Madalina *et al.* Antimicrobial Wound Dressings based on Bacterial Cellulose and Independently Loaded with Nutmeg and Fir Needle Essential Oils. **Polymers**, v. 15, n. 17, p. 3629, 2023.
- LI, Xi *et al.* Recent developments in smart antibacterial surfaces to inhibit biofilm formation and bacterial infections. **Journal of materials chemistry b**, v. 6, n. 26, p. 4274-4292, 2018.
- LOOMBA, Poonam Sood; TANEJA, Juhi; MISHRA, Bibhabati. Methicillin and vancomycin resistant *S. aureus* in hospitalized patients. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 275, 2010.
- LOPES, Anderson Paulo Rodrigues *et al.* *Lippia grata* Essential Oil Acts Synergistically with Ampicillin Against *Staphylococcus aureus* and its Biofilm. **Current Microbiology**, v. 81, n. 7, p. 1-12, 2024.
- LV, Luchao *et al.* Emergence of a plasmid-encoded resistance-nodulation-division efflux pump conferring resistance to multiple drugs, including tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae*. **MBio**, v. 11, n. 2, p. 10.1128/mbio. 02930-19, 2020.
- MADHAVAN, TP Vipin; SAKELLARIS, Harry. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Advances in applied microbiology**, v. 90, p. 155-197, 2015.
- MAHMOUD, Mansour Adam *et al.* Community pharmacists' perspectives about reasons behind antibiotics dispensing without prescription: a qualitative study. **Biomedical Research**, v. 29, n. 21, p. 3792-3796, 2018.
- MANCUSO, Giuseppe *et al.* Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.
- MARC, Clémence *et al.* Inappropriate prescription of antibiotics in pediatric practice: Analysis of the prescriptions in primary care. **Journal of Child Health Care**, v. 20, n. 4, p. 530-536, 2016.
- MASTERS, Elysia A. *et al.* Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". **Bone research**, v. 7, n. 1, p. 20, 2019.
- MELANDER, Roberta J.; BASAK, Akash K.; MELANDER, Christian. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. **Natural product reports**, v.

37, n. 11, p. 1454-1477, 2020.

MELO, Ramaiana Soares *et al.* Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3864, 2019.

MOGHADDAM, Mohammad; MEHDIZADEH, Leila. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: **Soft chemistry and food fermentation**. Academic Press, 2017. p. 379-419.

MOHAMMED, Hamdoon A. *et al.* Topical eucalyptol ointment accelerates wound healing and exerts antioxidant and anti-inflammatory effects in rats' skin burn model. **Journal of Oleo Science**, v. 71, n. 12, p. 1777-1788, 2022.

MOHR, Kathrin I. History of antibiotics research. **How to Overcome the Antibiotic Crisis: Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives**, p. 237-272, 2016.

MOO, Chew-Li *et al.* Antimicrobial activity and mode of action of 1, 8-cineol against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 20824, 2021.

MORAIS, Selene M. *et al.* Essential oils from *Croton* species: Chemical composition, in vitro and in silico antileishmanial evaluation, antioxidant and cytotoxicity activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2404-2412, 2019.

MUHAMMAD, Musa Hassan *et al.* Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 928, 2020.

NADIMPALLI, Maya L. *et al.* Face mask use and persistence of livestock-associated *Staphylococcus aureus* nasal carriage among industrial hog operation workers and household contacts, USA. **Environmental health perspectives**, v. 126, n. 12, p. 127005, 2018.

NELSON, Richard E. *et al.* National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. Supplement_1, p. S17-S26, 2021.

NEPAL, Gaurav; BHATTA, Shekhar. Self-medication with antibiotics in WHO Southeast Asian Region: a systematic review. **Cureus**, v. 10, n. 4, 2018.

NGUYEN, Thuan H.; PARK, Matthew D.; OTTO, Michael. Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 90, 2017.

NICOLAOU, Kyriacos C.; RIGOL, Stephan. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153-184, 2018.

NORI, Priya *et al.* Bacterial and fungal coinfections in COVID-19 patients hospitalized during the New York City pandemic surge. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 42, n. 1, p. 84-88, 2021.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 1, 2003.

- OLADIMEJI, Francis Abiodun *et al.* Evaluation of topical antimicrobial ointment formulations of essential oil of lippia multiflora moldenke. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 12, n. 5, p. 135-144, 2015.
- OLIVEIRA, A. R. M. F. *et al.* Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**. v. 30, p. 155-159, 2012.
- OLIVEIRA, Genil Dantas de *et al.* Synergistic and antibiofilm effects of the essential oil from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 1, p. 55, 2022.
- OLWAL, Charles Ochieng'; ANG'IENDA, Paul Oyieng'; OCHIEL, Daniel Otieno. Alternative sigma factor B (σ B) and catalase enzyme contribute to *Staphylococcus epidermidis* biofilm's tolerance against physico-chemical disinfection. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5355, 2019.
- PACKIAVATHY, Issac Abraham Sybiya Vasantha *et al.* Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 85-92, 2012.
- PAKBIN, Babak; BRÜCK, Wolfram M.; ROSSEN, John WA. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021.
- PAPA, Rosanna *et al.* A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*. **Microbial pathogenesis**, v. 63, p. 44-53, 2013.
- PARRA-FLORES, Miguel *et al.* Incidence of catheter-related infection incidence and risk factors in patients on total parenteral nutrition in a third level hospital. **Cir Cir**, v. 85, n. 2, p. 104-108, 2017.
- PATHANIA, Ruhi *et al.* Essential oil nanoemulsions and their antimicrobial and food applications. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 6, n. 3, p. 626-643, 2018.
- PENESYAN, Anahit *et al.* Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, p. 80, 2021.
- PICKERING, Amy C. *et al.* Evolutionary and functional analysis of coagulase positivity among the *Staphylococci*. **Msphere**, v. 6, n. 4, p. e00381-21, 2021.
- PINTO, Maria *et al.* The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0217165, 2019.
- PLACKETT, Benjamin. Why big pharma has abandoned antibiotics. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. S50-S50, 2020.
- POLLY, Matheus *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-

resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. **American journal of infection control**, v. 50, n. 1, p. 32-38, 2022.

POOLMAN, Jan T.; ANDERSON, Annaliesa S. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 7, p. 607-618, 2018.

PURKAIT, S. *et al.* Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. **Archives of microbiology**, v. 202, p. 1439-1448, 2020.

QIN, Shangshang *et al.* Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5332-5339, 2012.

RAMDANI, Messaoud *et al.* Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 11, p. 022-028, 2013.

REZAEI, N. **Encyclopedia Of Infection And Immunity**. S.L.: Elsevier, 2022.

RIBEIRO DA CUNHA, Bernardo; FONSECA, Luís P.; CALADO, Cecília RC. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go?. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 45, 2019.

RIINA, Ricarda *et al.* The Neotropical Croton sect. Geiseleria (Euphorbiaceae): Classification Update, Phylogenetic Framework, and Seven New Species from South America1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 106, n. 1, p. 111-166, 2021.

ROCHA, Renan Rhonalty *et al.* Comparative study of the chemical composition, antibacterial activity and synergic effects of the essential oils of *Croton tetradenius baill.* and *C. pulegioidorus baill.* against *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104934, 2021.

RONQUILLO, Manuel Gonzalez; HERNANDEZ, Juan Carlos Angeles. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. **Food control**, v. 72, p. 255-267, 2017.

SABO, Verica Aleksic; KNEZEVIC, Petar. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. **Industrial crops and products**, v. 132, p. 413-429, 2019.

SALES, A. *et al.* Evaluation of the antimicrobial effects of essential oil of *reseda lutea L.* on pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*. **Arch Clin Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 1-6, 2017.

SAUER, Karin *et al.* The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608-620, 2022.

SILVA, D. L. *et al.* Fungal and bacterial coinfections increase mortality of severely ill COVID-19 patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 113, p. 145-154, 2021.

SILVA, Juliana Santos et al. Sinopse das espécies de *Croton L.*(Euphorbiaceae) no estado de

Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 441-453, 2010.

SIQUEIRA, Ingrid Borges *et al.* In vitro antibacterial activity of essential oils of *Croton tetradenius* Baill. from the Brazilian Caatinga Biome and its synergistic effect with ciprofloxacin and meropenem. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 24, n. 1, p. 12-21, 2021.

SMIGIELSKI, K. *et al.* Biological properties and chemical composition of essential oils from flowers and aerial parts of lavender (*Lavandula angustifolia*). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 5, p. 1303-1314, 2018.

SOARES, Anaïs *et al.* Understanding ciprofloxacin failure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: persister cells survive matrix disruption. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2603, 2019.

SOEORG, Hiie *et al.* Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in neonatal intensive care units. **Apmis**, v. 125, n. 1, p. 63-73, 2017.

SREEJA, M. K. *et al.* Antibiotic resistance-reasons and the most common resistant pathogens-A review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 10, n. 6, p. 1886-1890, 2017.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods.**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

STRINGARO, Annarita; COLONE, Marisa; ANGIOLELLA, Letizia. Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. **Medicines**, v. 5, n. 4, p. 112, 2018.

SUBRAMANIAM, Girish; GIRISH, Meenakshi. Antibiotic resistance—A cause for reemergence of infections. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 11, p. 937-944, 2020.

TACCONELLI, Evelina *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

TADELE, Ashenif *et al.* Antimicrobial activity of topical formulations containing *Thymus vulgaris* essential oil on major pathogens causing skin diseases. **Ethiopian Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p. 103-110, 2009.

TAN, Siang Yong; TATSUMURA, Yvonne. Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin. **Singapore medical journal**, v. 56, n. 7, p. 366, 2015.

TARIQ, Saika *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 134, p. 103580, 2019.

TAVARES, Wilson R.; SECA, Ana ML. Inula L. secondary metabolites against oxidative stress-related human diseases. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 122, 2019.

TREPANIER, Pascale *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK: a national study (EuSCAPE-UK) on prevalence, incidence, laboratory detection methods and

infection control measures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 2, p. 596-603, 2017.

UDDIN, Tanvir Mahtab *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

VAHEDIKIA, Nooshin *et al.* Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 25-32, 2019.

VALAREZO, Eduardo *et al.* Chemical constituents of the essential oil from Ecuadorian endemic species *Croton ferrugineus* and its antimicrobial, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4608, 2021.

VAN EE, Benjamin; BERRY, Paul E. Typification notes for *Croton* (Euphorbiaceae). **Harvard Papers in Botany**, v. 15, n. 1, p. 73-84, 2010.

VAN HARTEN, Roel M. *et al.* Multidrug-resistant enterococcal infections: new compounds, novel antimicrobial therapies?. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 467-479, 2017.

VAN WOLFEREN, Marleen; ORELL, Alvaro; ALBERS, Sonja-Verena. Archaeal biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 699-713, 2018.

VASCONCELOS, Brendda Miranda *et al.* Enhancement of chlorhexidine activity against planktonic and biofilm forms of oral streptococci by two *Croton* spp. essential oils from the caatinga biome. **Biofouling**, v. 38, n. 10, p. 984-993, 2022.

VASCONCELOS, Mayron A. *et al.* Effect of a casbane diterpene isolated from *Croton nepetaefolius* on the prevention and control of biofilms formed by bacteria and *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 499-509, 2014.

VENTOLA, C. Lee. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

VESTERGAARD, Martin; FREES, Dorte; INGMER, Hanne. Antibiotic resistance and the MRSA problem. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec. gpp3-0057-2018, 2019.

VIANCELLI, Aline *et al.* Contamination by pathogenic multidrug resistant bacteria on interior surfaces of ambulances. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e48111225925-e48111225925, 2022.

VIDÁCS, Anita *et al.* Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p. 257-262, 2018.

VIDAL, Cinara Soares *et al.* Chemical composition, antibacterial and modulatory action of the essential oil of *Croton rhamnifoloides* leaves Pax and Hoffman. **Biosci. j.(Online)**, p. 1632-1643, 2016.

WANG, Jiaxing *et al.* Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to

staphylococcus: New insight into the antimicrobial action of silver. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 32699, 2016.

WANG, Yingying *et al.* Environmental contamination prevalence, antimicrobial resistance and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from secondary schools in Guangzhou, China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, p. 623, 2020.

WHO. **Ten threats to global health in 2019**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>>.

WU, Qianxing *et al.* Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, p. 1-13, 2021.

YANG, Li *et al.* Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

ZÁRYBNICKÝ, Tomáš *et al.* Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. **Archives of Toxicology**, v. 92, p. 1-13, 2018.

ZHAO, Renxin *et al.* Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics. **Water Research**, v. 151, p. 388-402, 2019.