



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARIA EDUARDA LIMA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E SINERGISMO DO ÓLEO
ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *Croton conduplicatus* COM
CEFALOSPORINAS FRENTE A CEPAS CLÍNICAS DE MRSA**

**CAMPINA GRANDE
2025**

MARIA EDUARDA LIMA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E SINERGISMO DO ÓLEO
ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *Croton conduplicatus* COM
CEFALOSPORINAS FRENTE A CEPAS CLÍNICAS DE MRSA**

Dissertação apresentada à Coordenação de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos

Linha de pesquisa: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Raianny Vieira da Rocha

**CAMPINA GRANDE
2025**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

- O48a Oliveira, Maria Eduarda Lima.
Avaliação da atividade antibacteriana e sinergismo do óleo essencial obtido das folhas de *Croton conduplicatus* com cefalosporinas frente a cepas clínicas de MRSA [manuscrito] / Maria Eduarda Lima Oliveira. - 2025.
78 f. : il. color.
- Digitado.
- Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2025.
- "Orientação : Prof. Dra. Wilma Raianny Vieira da Rocha, Laboratório de Análises Clínicas - CCBS".
1. Eucaliptiol. 2. Sinergismo. 3. MRSA. I. Título
21. ed. CDD 615

MARIA EDUARDA LIMA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E SINERGISMO DO ÓLEO
ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE CROTON CONDUPPLICATUS COM
CEFALOSPORINAS FRENTE A CEPAS CLÍNICAS DE MRSA

Dissertação apresentada à
Coordenação do Curso de Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestra
em Ciências Farmacêuticas

Linha de Pesquisa: Obtenção e
avaliação da atividade biológica de
produtos naturais.

Aprovada em: 09/05/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Dayanne Tomaz Casimiro da Silva** (***.049.714-**), em **25/06/2025 21:38:09** com chave **d53b4996522511f0ad1d06adb0a3afce**.
- **Wilma Raianny Vieira da Rocha** (***.762.494-**), em **25/06/2025 19:29:42** com chave **e3962766521311f09dc21a1c3150b54b**.
- **Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos** (***.911.674-**), em **25/06/2025 21:01:31** com chave **b71d3262522011f0b73906adb0a3afce**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 27/06/2025

Código de Autenticação: 10a9f0



À minha eterna tia Fátima (in memoriam), cuja trajetória me ensinou que a educação é legado e liberdade. E à minha mãe, Nilvana, presença constante e firme, que nunca permitiu que eu me afastasse do propósito. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Cada passo até aqui foi marcado por propósito, perseverança e fé — sinais de que a jornada foi guiada por algo maior. Reconheço que cada etapa desta caminhada foi sustentada por graça e esforço, e afirmo com gratidão: até aqui, o Senhor me ajudou.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Wilma Raianny, pela generosa entrega ao longo desta caminhada. Em muitos momentos, mesmo quando o tempo pedia descanso, ela se fez presença — atenta, firme e gentil — oferecendo não apenas orientação acadêmica, mas cuidado genuíno. Foi além do papel de educadora: tornou-se apoio, referência e amiga. Sua dedicação, sabedoria e humanidade marcaram profundamente esta jornada, e o exemplo que carrego da profissional e da mulher que és me inspira a seguir com mais coragem, mais propósito e leveza. Agradeço, com todo o amor que me habita, à minha família — alicerce de cada conquista. Aos meus pais, Nilvana e Edmar, minha rocha e fortaleza, que me sustentaram com amor incondicional e foram presença em todos os momentos. São vocês a razão pela qual busco voos altos, certos de que meus passos seguem impulsionados pelo que aprendi ao lado de vocês. Às minhas irmãs, Débora e Carmem, que me inspiram diariamente, mulheres íntegras, determinadas, cuja presença me ensinou o valor da força, da dignidade e da independência. E à pequena Mariah, minha doce sobrinha, pelo desejo de ser exemplo, farol e abrigo. Ao meu amor, Tiago Pinto, minha gratidão mais terna. Obrigada por me acolher com compreensão nos dias difíceis e celebrar comigo cada pequena conquista. Tê-lo ao meu lado fez essa caminhada mais doce e possível. Este caminho é meu mas foi trilhado com todos vocês — por isso, ele também lhes pertence.

Devo reconhecer a presença constante, ainda que agora silenciosa, da minha tia Fátima (*in memoriam*), cuja história é, para mim, um verdadeiro legado de coragem e transformação. Mulher de origem simples, partiu de sua terra natal carregando apenas o desejo íntimo de romper os limites que a cercavam. Em uma realidade onde o estudo pouco era valorizado, ela escolheu a educação como caminho de libertação — para si e para os seus. Sozinha, construiu uma trajetória admirável: graduou-se, tornou-se mestre, doutora e professora universitária. Mas seu maior título foi a humanidade com que viveu: sua integridade, sua gentileza e sua bondade seguem sendo, para mim, lições eternas. Me ensinou com o exemplo, que o conhecimento não apenas muda destinos, mas também ilumina caminhos. Foi ela quem acendeu em mim o desejo de ir além, de me qualificar, de honrar, com meus passos, o solo que ela desbravou antes de mim.

Agradeço à minha doce Tia Maria, pelo amor dedicado e por cada oração feita com carinho; ao meu cunhado Caio Araújo pela amizade e apoio; aos meus amigos próximos, que sempre me estimularam com palavras de incentivo; ao meu afilhado Lucas que me é exemplo pelo entusiasmo na descoberta; a minha tia Patrícia (*in memoriam*) por ter sido exemplo de disciplina e força; aos colegas de mestrado, em especial, minha amiga Kaline Araújo que foi um verdadeiro presente e aos profissionais do LAC, pelo suporte ao longo da jornada. A cada um de vocês, ofereço minha mais sincera e eterna gratidão.

Por fim, agradeço aos professores do PPGCF-UEPB por todos os ensinamentos compartilhados e à banca examinadora Dayanne Casimiro, Luanne Eugênia e Katharina Porto pela disponibilidade em enriquecer e abrilhantar ainda mais este trabalho.

“Sei porém que só andando é que se aprende a
andar e – milagre – se anda”.

Clarice Lispector

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Croton conduplicatus* (OECC) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo variantes resistentes à meticilina (MRSA), além de avaliar a interação do OECC com antibióticos da classe das cefalosporinas e sua citotoxicidade em hemácias. Para isso, as folhas foram coletadas, secas e moídas, e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. A composição química do OECC foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Seis cepas de *S. aureus* foram testadas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do OECC e de antibióticos (cefepime, ceftazidima e ceftriaxona) pelo método de microdiluição em caldo. A interação entre OECC e antibióticos foi avaliada pelo teste *checkerboard*, calculando o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). A CIM foi determinada conforme as diretrizes do CLSI (2017), com concentrações variando de 2.048 a 4 µg/mL para os antibióticos e de 1.024 a 512 µg/mL para o OECC. A CBM foi estabelecida por subcultivo em ágar Mueller-Hinton a partir dos poços sem crescimento visível. O ensaio de combinação (*checkerboard*) avaliou a interação entre o OECC e os antibióticos, determinando o ICIF. Valores de $ICIF \leq 0,5$ indicaram sinergismo, entre 0,5 e 4 indicaram indiferença, e > 4 sugeriram antagonismo, conforme a classificação de Lorian (2005). A citotoxicidade foi avaliada por meio da hemólise em hemácias de carneiro, medida por espectrofotometria. Os resultados mostraram que o OECC possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e MRSA, apresentando sinergismo quando combinado com cefalosporinas, o que permite a redução das concentrações dos antibióticos. Além disso, o óleo apresentou baixa citotoxicidade em hemácias, sugerindo seu potencial uso como agente adjuvante no tratamento de infecções bacterianas resistentes. Este estudo contribui para o entendimento de como os óleos essenciais podem ser utilizados no tratamento de infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por cepas resistentes. A combinação de óleos essenciais com antibióticos pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a resistência bacteriana e melhorar os resultados terapêuticos, mas mais pesquisas são necessárias para otimizar o uso clínico dessa abordagem.

Palavras- chave: eucaliptiol; sinergismo; MRSA.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the antimicrobial activity of the essential oil from *Croton conduplicatus* leaves (OECC) against *Staphylococcus aureus* strains, including methicillin-resistant variants (MRSA), as well as to evaluate the interaction of OECC with cephalosporin-class antibiotics and its cytotoxicity on erythrocytes. For this purpose, the leaves were collected, dried, and ground, and the essential oil was extracted by hydrodistillation. The chemical composition of OECC was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Six *S. aureus* strains were tested to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of OECC and antibiotics (cefepime, ceftazidime, and ceftriaxone) using the broth microdilution method. The interaction between OECC and antibiotics was evaluated by the checkerboard assay, calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). MIC determinations followed CLSI guidelines (2017), with concentrations ranging from 2,048 to 4 µg/mL for antibiotics and from 1,024 to 512 µg/mL for OECC. MBC was established by subculturing on Mueller-Hinton agar from wells without visible growth. The checkerboard assay determined FICI values where ≤ 0.5 indicated synergy, between 0.5 and 4 indicated indifference, and > 4 suggested antagonism, according to Lorian's classification (2005). Cytotoxicity was evaluated by measuring hemolysis in sheep erythrocytes via spectrophotometry. Results showed that OECC exhibits antimicrobial activity against *S. aureus* and MRSA, demonstrating synergy when combined with cephalosporins, which allows for reduced antibiotic concentrations. Additionally, the oil showed low cytotoxicity in erythrocytes, suggesting its potential use as an adjuvant agent in treating resistant bacterial infections. This study contributes to the understanding of how essential oils can be used in treating bacterial infections, especially those caused by resistant strains. The combination of essential oils with antibiotics may be an effective strategy to reduce bacterial resistance and improve therapeutic outcomes, but further research is necessary to optimize clinical use of this approach.

Keywords: eucalyptol; synergism; MRSA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturas químicas de monoterpenos	20
Figura 2 - Distribuição geográfica da família <i>Euphorbiaceae</i> no Brasil.....	22
Figura 3 - Folhas da planta <i>Croton conduplicatus</i>	23
Figura 4 - Imagem microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> (cocos)	27
Figura 5 - Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência do <i>Staphylococcus aureus</i> à metilicina	29
Figura 6 - Localização do município de Irecê, Bahia, Brasil	34
Figura 7 - Óleo essencial extraído das folhas de <i>Croton conduplicatus</i> armazenados em frascos de vidro.....	35
Figura 8 - Crescimento da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 em Agar Manitol Salgado (AMS)	37
Figura 9 - Diluição seriada para o inóculo de trabalho	38
Figura 10 - Perfil dos isobogramas com os possíveis efeitos das associações: A (Aditivo), B (Sinérgico) e C (Antagônico).....	41
Figura 11 - Cromatograma de íons totais obtido por GC-MS do óleo essencial de <i>Croton conduplicatus</i>	42
Figura 12 - Estrutura química dos monoterpenos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de <i>Croton conduplicatus</i>	47
Figura 13 - <i>Checkerboard</i> da combinação entre OECC e cefepime em concentrações subinibitórias diante da cepa <i>S. aureus</i> P357... ..	53
Figura 14 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa P357 indicando sinergismo	56
Figura 15 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa <i>S. aureus</i> L16 indicando sinergismo.....	63
Figura 16 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 indicando sinergismo... ..	63
Figura 17 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 indicando sinergismo... ..	64
Figura 18 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa <i>S. aureus</i> LL01 indicando sinergismo	64

Figura 19 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa <i>S. aureus</i> OXA01 indicando sinergismo.....	65
Figura 20 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa <i>S. aureus</i> L16 indicando sinergismo.....	65
Figura 21 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 indicando sinergismo.....	66
Figura 22 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 indicando sinergismo.....	66
Figura 23 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa <i>S. aureus</i> LL01 indicando sinergismo.....	67
Figura 24 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa <i>S. aureus</i> P357 indicando sinergismo.....	67
Figura 25 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa <i>S. aureus</i> OXA01 indicando sinergismo.....	68
Figura 26 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa <i>S. aureus</i> L16 indicando sinergismo.....	68
Figura 27 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 indicando sinergismo.....	69
Figura 28 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa <i>S. aureus</i> LL01 indicando sinergismo.....	69
Figura 29 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 indicando sinergismo.....	70
Figura 30 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa <i>S. aureus</i> P357 indicando sinergismo.....	70
Figura 31 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa <i>S. aureus</i> OXA01 indicando sinergismo.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química das folhas do OECC analisada por CG-MS.....	44
Tabela 2 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antibióticos ceftriaxona (CRO), cefepime (CPM), cefazolina (CAZ) e do óleo essencial de <i>Croton conduplicatus</i> (OECC), frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (µg/mL)	48
Tabela 3 - Efeito sinérgico do OECC em combinação com cefalosporinas diante de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	54
Tabela 4 – Atividade hemolítica do óleo essencial de <i>Croton conduplicatus</i> (OECC) em hemácias de carneiro desfibrinado, em diferentes concentrações.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BRCast	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CA-MRSA	Community-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
CRO	Ceftriaxona
CPM	Cefepime
CFZ	Cefazolina
DMSO	Dimetilsulfóxido (solvente utilizado)
EUCast	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HCA-MRSA	Healthcare-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
mecA	Gene responsável pela resistência à meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
OECC	Óleo Essencial de <i>Croton conduplicatus</i>
PBP2a	Penicillin-Binding Protein 2a
pH	Potencial Hidrogeniônico
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
α	Alfa
β	Beta
μm	Micrômetro
ug/mL	Microgramas por mililitro (unidade de concentração)
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: papel dos monoterpenos e avaliação frente a antibióticos.....	18
3.1.1 Óleos essenciais	18
3.1.2 Monoterpenos.....	19
3.1.3 Monoterpenos como adjuvantes terapêuticos em combinações com antibióticos.....	21
3.2 Gênero <i>Croton</i>	22
3.2.1 Características e aspectos gerais	22
3.2.2 Composição química e propriedades biológicas	22
3.2.3 “Quebra-faca”: potencialidades farmacológicas de <i>croton conduplicatus</i>	24
3.3 Contexto epidemiológico do MRSA: uma análise global, nacional e regional.....	25
3.4 Características microbiológicas e clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (MRSA)	26
3.4.1 Aspectos gerais e patogenicidade de MRSA	26
3.4.2 Mecanismos de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.4.3 Significado clínico da detecção de cepas de mrsa	29
3.4.4 Fundamentos históricos da evolução de MRSA	30
3.5 Cepas clínicas e ATCC: diferenças e implicações para a pesquisa antimicrobiana resistência microbiana: fatores contribuintes e perspectivas para o futuro da terapia antimicrobiana.....	32
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Origem do óleo essencial das folhas de <i>Croton conduplicatus</i>	34
4.1.1 Coleta do material vegetal.....	35
4.1.2 Obtenção do óleo essencial das folhas de <i>Croton conduplicatus</i>	35
4.1.3 Caracterização do óleo essencial de <i>Croton conduplicatus</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	36
4.2 Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Croton conduplicatus</i> diante de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilicina	36
4.2.1 Microrganismos e meios de cultura.....	36
4.2.2 Preparo dos inóculos microbianos.....	37
4.2.3 Preparo das soluções teste do oec e agentes antimicrobianos	38
4.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (cim) e bactericida mínima (CBM).....	38
4.2.5 Ensaio de combinação do óleo essencial das folhas de <i>croton conduplicatus</i> e cefalosporinas (checkerboard)	39
4.3 Ensaio de citotoxicidade em hemácias.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.2	Caracterização do óleo essencial das folhas de <i>Croton conduplicatus</i>	43
5.3	Concentração inibitória mínima e bactericida mínima do OECC	48
5.4	Efeito da combinação do OECC com as cefalosporinas	54
5.4	Citotoxicidade do OECC em hemácias de carneiro.....	60
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICE A - ISOBOLOGRAMAS DAS COMBINAÇÕES DE OECC COM	
	ANTIBIÓTICOS FRENTE A CEPAS DE S. Aureus	63

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido amplamente estudadas por seu potencial terapêutico, especialmente no combate a infecções microbianas. Nesse contexto, *Croton conduplicatus* (*Euphorbiaceae*) destaca-se por sua rica composição fitoquímica, sendo fonte de metabólitos secundários com propriedades biológicas, como a atividade antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2023). O óleo essencial de suas folhas contém compostos majoritários como eucaliptol (13,15%), p-cimeno (10,68%) e o sesquiterpeno cariofileno (9,73%), conhecidos por sua ação contra diversos microrganismos, inclusive cepas resistentes. A presença desses bioativos justifica o interesse em investigar o potencial antimicrobiano da espécie (SANTOS *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2022). Os óleos essenciais de *C. conduplicatus*, compostos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos, já demonstraram efeitos inibitórios sobre microrganismos patogênicos, sendo uma alternativa promissora frente à crescente resistência bacteriana (ALMEIDA *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

A resistência bacteriana a antibióticos representa uma das maiores ameaças à saúde pública global, comprometendo a eficácia dos tratamentos e elevando as taxas de morbidade e mortalidade. Entre os microrganismos de maior relevância clínica, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) se destaca como um patógeno multirresistente, responsável por infecções graves, especialmente em ambientes hospitalares e em pacientes imunocomprometidos. O desenvolvimento da resistência do *S. aureus* aos antibióticos iniciou-se logo após a introdução da penicilina na década de 1940, com cepas que produziam penicilinase, enzima que inativa a penicilina. Em 1961, a primeira cepa resistente à meticilina foi identificada, mediada pela presença do gene *mecA*, que codifica a proteína PBP2a, alterando a afinidade da célula bacteriana pelos antibióticos beta-lactâmicos, como a oxacilina (PRAZAK *et al.*, 2020). Desde então, a disseminação de MRSA tem sido um obstáculo contínuo para os profissionais de saúde, devido à sua resistência a múltiplas classes de antibióticos, o que reduz as opções terapêuticas disponíveis (ZHANG *et al.*, 2021).

A resistência do MRSA é agravada por sua capacidade de formar biofilmes, estruturas que conferem proteção adicional contra antimicrobianos e favorecem a persistência da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2020). Além disso, enquanto anteriormente era restrito a infecções hospitalares, o aumento das infecções comunitárias associadas ao MRSA tem ampliado a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, os óleos essenciais extraídos de *C. conduplicatus* surgem como uma abordagem promissora para o combate a infecções

bacterianas resistentes, especialmente devido à sua capacidade de atuar sinergicamente com antibióticos convencionais, potencializando seus efeitos e reduzindo a pressão seletiva que favorece o desenvolvimento da resistência (LIMA *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2021).

Além do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais, a importância de testar cepas clínicas deve ser enfatizada. Muitos estudos anteriores se basearam exclusivamente no uso de cepas padronizadas ATCC (*American Type Culture Collection*), que, apesar de serem amplamente utilizadas para a reprodutibilidade dos testes, podem não refletir com precisão a diversidade genética e os perfis de resistência encontrados em isolados clínicos reais. Dessa forma, a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a cepas clínicas de MRSA permite uma análise mais realista da eficácia desses compostos e seu potencial de aplicação na prática clínica (FENG *et al.*, 2022).

O método de *checkerboard*, amplamente utilizado para avaliar interações sinérgicas entre antibióticos e compostos naturais, possibilita a determinação de combinações eficazes para o tratamento de infecções bacterianas resistentes (EUCAST, 2023). Assim, a combinação de antibióticos com fitoconstituintes pode não apenas melhorar a eficácia antimicrobiana, mas também reduzir a formação de biofilmes e a resistência cruzada, ampliando o espectro antimicrobiano e prevenindo o surgimento de novas cepas resistentes (ROZATTO, 2012).

Portanto, a resistência do *S. aureus* e, em particular, a disseminação de cepas de MRSA, representa um desafio contínuo para a saúde pública global. A utilização de óleos essenciais derivados de *C. conduplicatus*, a avaliação de sua atividade antimicrobiana contra cepas clínicas e a exploração de interações sinérgicas entre compostos naturais e antibióticos convencionais representam estratégias inovadoras e promissoras para o desenvolvimento de novas terapias. Essas abordagens podem não apenas superar as limitações dos tratamentos atuais, mas também oferecer soluções sustentáveis e acessíveis no combate às infecções bacterianas resistentes, contribuindo para a redução da carga de doenças associadas à resistência antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido das folhas de *Croton conduplicatus* (OECC) frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

2.2 Objetivos específicos

- Obter o óleo essencial das folhas de *Croton conduplicatus* (OECC);
- Caracterizar quimicamente o óleo essencial extraído das folhas de *Croton conduplicatus* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Verificar os compostos majoritários presentes no OECC;
- Determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do óleo essencial obtido das folhas de *Croton conduplicatus* (OECC) contra cepas clínicas de MRSA;
- Avaliar o efeito sinérgico *in vitro* da combinação do OECC com as cefalosporinas de diferentes classes: ceftriaxona, ceftazidima e cefepime frente a cepas clínicas de MRSA por meio do método *checkerboard*;
- Observar a reversão da resistência para sensibilidade das cepas clínicas de MRSA quando tratados *in vitro* pela combinação de OECC e cefalosporinas em concentrações subinibitórias;
- Avaliar o potencial citotóxico do OECC e das combinações do OECC com as cefalosporinas em concentração subinibitória diante de eritrócitos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: papel dos monoterpenos e avaliação frente a antibióticos

3.1.1 Óleos essenciais

O conceito de óleo essencial foi introduzido no século XVI por Paracelso, um médico e alquimista suíço, que o descreveu como a "quinta essência" de uma planta, sendo a parte mais efetiva de uma droga. Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, cascas ou até mesmo de plantas inteiras, como ervas medicinais e especiarias. Quimicamente, são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, muitos dos quais são voláteis e responsáveis pela produção de aromas e sabores característicos.

As propriedades terapêuticas associadas às plantas medicinais são, em grande parte, atribuídas aos óleos essenciais (OE) que em sua forma líquida à temperatura ambiente, geralmente são incolores ou ligeiramente claros e não se misturam com água. A extração dos óleos pode ser feita por métodos como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico ou utilizando solventes orgânicos e gorduras. O óleo obtido de cada planta reflete as características químicas e biológicas desta espécie. Mesmo que diferentes óleos apresentem compostos semelhantes, as diferenças nas quantidades podem fazer com que cada óleo tenha propriedades distintas, tanto químicas quanto biológicas (TROMBETTA *et al.*, 2005; EDRIS, 2007).

Os óleos essenciais têm sido amplamente usados ao longo dos séculos em indústrias de alimentos, cosméticos e perfumaria, além de sua aplicação medicinal, o que tem impulsionado a busca por substâncias biologicamente ativas com eficácia comprovada, especialmente no combate a microrganismos. Outro ponto relevante é que, por serem substâncias naturais e biodegradáveis, os óleos essenciais geralmente apresentam baixa toxicidade para mamíferos e têm a capacidade de atuar sobre múltiplas moléculas-alvo simultaneamente. Isso faz com que eles sejam consideradas alternativas promissoras frente aos medicamentos sintéticos, sendo fundamentais na pesquisa de novos fármacos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A caracterização química dos óleos essenciais pode ser realizada por técnicas como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo que alguns óleos podem conter mais de 60 compostos diferentes. Os compostos majoritários podem representar mais de 85% da composição total do óleo, enquanto outros componentes aparecem em quantidades

muito pequenas. No entanto, a proporção desses compostos não está necessariamente relacionada à intensidade de sua atividade farmacológica, e algumas substâncias minoritárias podem ser cruciais para a ação de outros compostos (GALINDO *et al.*, 2010). Entre as atividades atribuídas aos óleos essenciais, destacam-se as propriedades fitoterápicas, antivirais, antissépticas, nutricionais e antifúngicas. A ação bacteriostática e/ou bactericida dos óleos essenciais é principalmente mediada por compostos terpenóides (BURT, 2004). Vale ressaltar que a composição e a eficácia de um óleo essencial podem ser influenciadas por diversos fatores, como o método de extração, as características próprias da planta e as condições ambientais em que ela cresce (SILVA *et al.*, 2011).

3.1.2 Monoterpenos

Há um número extenso de relatos referente à ação inibitória de microrganismos associados a extratos e óleos de plantas. Nesse contexto, a procura por novos fármacos antimicrobianos é fomentada principalmente no tocante à identificação da composição de monoterpenos, visto que, a presença destes constituintes em diversos estudos comprovam o potencial antibacteriano, sendo explicado principalmente devido aos compostos voláteis encontrados em óleos essenciais de diversas plantas que apresentam atividade antimicrobiana por meio de múltiplos mecanismos, como devido à sua estrutura lipofílica e propriedades fenólicas. Devido à sua lipofilicidade, os monoterpenos se incorporam nas membranas celulares bacterianas, alterando sua permeabilidade e fluidez. Isso resulta em danos estruturais que afetam a função da membrana, levando à perda de íons essenciais e moléculas intracelulares, comprometendo a integridade celular e podendo causar morte bacteriana (HELANDER *et al.*, 2005).

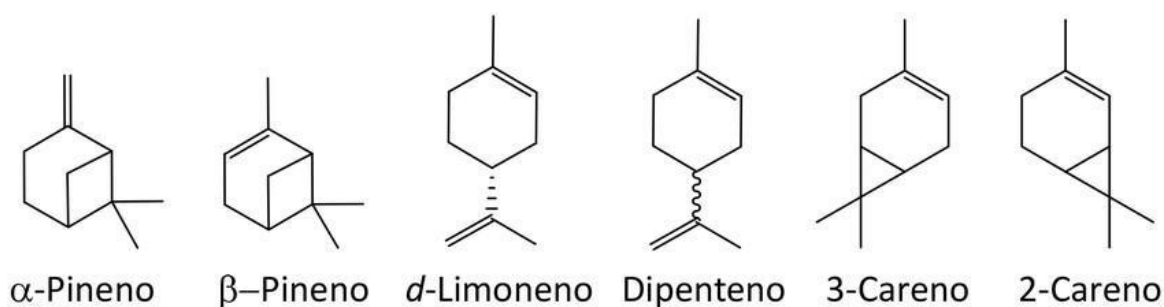
Alguns monoterpenos, como o carvacrol, demonstraram interferir na síntese de proteínas e ácidos nucleicos bacterianos, prejudicando processos vitais para a sobrevivência e multiplicação das bactérias; o linalol pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro das células bacterianas, levando ao estresse oxidativo e danos a componentes celulares essenciais, como lipídios, proteínas e DNA, resultando em morte celular. O linalol pode afetar o potencial de membrana das células bacterianas, despolarizando-a e interferindo no metabolismo celular, incluindo a cadeia respiratória, o que leva à disfunção energética e morte celular (BURT, 2004). Estudos indicam que monoterpenos podem atuar sinergicamente com antibióticos tradicionais, como as cefalosporinas, potencializando sua eficácia contra cepas

resistentes, como MRSA (MESTRA *et al.*, 2020). Esses mecanismos tornam os monoterpenos promissores como agentes antimicrobianos naturais, especialmente no combate a cepas resistentes a antibióticos convencionais.

Os monoterpenos são compostos químicos derivados do isopreno, com 10 átomos de carbono, e são responsáveis pelas propriedades terapêuticas de muitos óleos essenciais. Eles podem ser classificados em dois grupos principais: os monoterpenos hidrocarbonetos, como o limoneno e o pineno, encontrados em frutas cítricas e coníferas, e os monoterpenos oxigenados, como o linalol, carvacrol e citronelal, que contêm grupos funcionais de oxigênio e são responsáveis por várias propriedades terapêuticas (MESTRA *et al.*, 2020). Na figura 1, é possível observar suas diferentes estruturas químicas.

Estudos recentes têm demonstrado que esses compostos possuem forte atividade antimicrobiana. Por exemplo, linalol tem mostrado ação contra *Candida* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2021), enquanto citronelal tem propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* (OLIVEIRA *et al.*, 2019). O carvacrol, presente no orégano, também tem se mostrado eficaz contra *Salmonella* e *Escherichia coli* (SILVA *et al.*, 2020).

Figura 1 - Estruturas químicas de monoterpenos



Fonte: SILVA *et al.* (2021)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica essencial para identificar e quantificar os monoterpenos presentes nos óleos essenciais. Estudos como o de Ferreira *et al.* (2021) utilizaram GC-MS para identificar monoterpenos como 1,8-cineol, que apresenta forte atividade antimicrobiana contra patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Essas técnicas permitem um mapeamento preciso da composição química e da eficácia terapêutica dos óleos essenciais.

3.1.3 *Monoterpenos como adjuvantes terapêuticos em combinações com antibióticos*

A crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem impulsionado a pesquisa por alternativas terapêuticas mais eficazes. Uma estratégia promissora é a combinação de monoterpenos com antibióticos, visando potencializar a ação antimicrobiana e superar a resistência. Estudos recentes têm investigado o efeito sinérgico entre monoterpenos e antibióticos, observando que tais combinações podem expandir o espectro antimicrobiano e prevenir o surgimento de resistência bacteriana (LIMA *et al.*, 2021).

SILVA *et al.* (2023) analisou a associação de óleos voláteis com antibióticos, observando que combinações específicas podem melhorar a atividade contra patógenos resistentes. No entanto, enfatizou-se que nem todas as combinações resultam em sinergismo, sendo crucial estudar as interações específicas para identificar associações eficazes (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Além disso, uma pesquisa investigou a atividade sinérgica do citral, um monoterpeno, em combinação com antimicrobianos convencionais contra *Enterococcus faecalis* multirresistentes. Os resultados indicaram que o citral apresentou efeito sinérgico com certos antibióticos, sugerindo seu potencial como adjuvante terapêutico (RODRIGUES *et al.*, 2021). Isso reforça a ideia de que, quando combinados de forma adequada, os monoterpenos podem aumentar a eficácia dos antibióticos contra cepas resistentes.

Estudos como o de Silva *et al.* (2020) mostraram que o carvacrol e o timol, monoterpenos encontrados no orégano, quando associados a antibióticos, podem agir sinergicamente contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esses resultados sugerem que monoterpenos não só apresentam ação antimicrobiana por si só, mas também podem atuar como moduladores da resistência bacteriana quando usados em combinação com antibióticos tradicionais.

Esses estudos ressaltam a importância de investigar as interações entre monoterpenos e antibióticos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra patógenos resistentes, com abordagem inovadora para combater infecções bacterianas, desde que estudos aprofundados sejam realizados para identificar combinações sinérgicas e seguras.

3.2 GÊNERO *Croton*

3.2.1 *Características e aspectos gerais*

O gênero *Croton* compreende aproximadamente 1.300 espécies, entre árvores, arbustos e ervas, localizadas em regiões subtropicais e tropicais. No Brasil, existem cerca de 350 espécies, com maior concentração na região Nordeste, onde há aproximadamente 110 espécies. O estado de Pernambuco corresponde a cerca de 24% da família *Euphorbiaceae*, totalizando 35 espécies de *Croton*, com a maioria presente no bioma Caatinga, como enfatizado na Figura 2 (SILVA *et al.*, 2021). Esse gênero é conhecido por sua notável diversidade química, incluindo diterpenos, alcalóides, saponinas, quinonas e compostos fenólicos. Devido a essas propriedades biológicas, espécies de *Croton* são amplamente utilizadas na medicina popular em diversas regiões da América do Sul, África e sul da Ásia (LIMA *et al.*, 2019).

Figura 2 – Distribuição geográfica da família *Euphorbiaceae* no Brasil.



Fonte: PEREIRA-SILVA (2020)

3.2.2 *Composição química e propriedades biológicas*

No Sertão de Pernambuco, onde a vegetação predominante é a Caatinga, diversos estudos destacaram os efeitos biológicos das espécies do gênero *Croton*. Estas, apresentam importantes características químicas, como a presença de ácidos graxos essenciais (linoleico e linolênico), taninos, vitamina E e açúcares redutores (SANTOS *et al.*, 2020). Apesar da

Caatinga ser um bioma reconhecido por suas plantas medicinais, ainda há uma necessidade de aprofundar as investigações sobre as potencialidades fitoquímicas e biológicas desse gênero, especialmente devido à diversidade química e às diversas atividades farmacológicas que apresenta (ALMEIDA *et al.*, 2022).

Figura 3 - Folhas da planta *Croton conduplicatus*



Fonte: INATURALIST (2023)

Diversas espécies têm sido objeto de estudos devido às suas atividades biológicas. Dentre essas, destacam-se as atividades anticancerígena, antiespasmódica, larvicida e antifúngica. Estudos demonstraram que substâncias isoladas de algumas espécies de *Croton* possuem potencial anticancerígeno (FERREIRA *et al.*, 2019). Além disso, extratos de *Croton bonplandianus* exibiram atividade antiespasmódica, sugerindo seu uso potencial no tratamento de distúrbios gastrointestinais (MENDES *et al.*, 2020). Essa mesma espécie também mostrou atividade larvicida, indicando um possível papel no controle de vetores de doenças, bem como atividade antifúngica a partir do látex fresco (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Com relação à atividade antimicrobiana, diversos estudos investigaram o potencial dos óleos essenciais de *Croton*. Essas pesquisas demonstram que os óleos apresentam atividade contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BARBOSA *et al.*, 2023).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais de *Croton* ainda não é completamente elucidado, mas algumas pesquisas sugerem que esses compostos atuam na desestabilização da membrana celular bacteriana, aumentando a permeabilidade celular e inibindo enzimas essenciais para a sobrevivência microbiana (MARTINS *et al.*, 2023). Esses mecanismos explicam, em parte, a eficácia observada contra diversas cepas bacterianas, inclusive aquelas resistentes a múltiplos fármacos.

De maneira geral, o gênero *Croton* apresenta um vasto potencial terapêutico devido à sua diversidade química e às múltiplas atividades biológicas demonstradas. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor os mecanismos de ação e explorar as aplicações clínicas dessas espécies, especialmente no combate a microrganismos patogênicos resistentes.

3.2.3 “Quebra-faca”: potencialidades farmacológicas de *Croton conduplicatus*

A planta *Croton conduplicatus* (*Euphorbiaceae*) é uma planta medicinal brasileira, endêmica do bioma Caatinga, popularmente conhecida como “quebra-faca”. Suas folhas e casca do caule tem odor forte e característico, sendo considerado uma planta aromática. Na análise produzida por Junior e colaboradores (2013), o óleo essencial de *Croton conduplicatus* (OECC) resulta em um óleo incolor com odor característico, apresentando 48 picos distintos, dos quais 38 foram identificados correspondendo a 90,5% de sua composição química. Os sesquiterpenos (E-) cariofileno (13,72%), óxido de cariofileno (13,15%) e o monoterpene cânfora (8,25%) foram considerados os principais constituintes do óleo essencial.

O método *checkerboard* baseia-se na microdiluição em caldo, onde os antimicrobianos são testados em diferentes concentrações dispostas em uma matriz de 96 poços, permitindo avaliar sua interação de maneira quantitativa (EUCAST, 2023). A introdução do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) trouxe maior precisão à análise, estabelecendo critérios objetivos para classificar interações como sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$), indiferentes ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônicas ($ICIF > 4$) (BRCAST, 2023).

A consolidação da metodologia se deu com os avanços na microbiologia clínica e farmacologia, especialmente com os estudos que buscavam compreender o efeito sinérgico entre antibióticos e a necessidade de otimizar tratamentos para infecções resistentes (ROZATTO, 2012). O desenvolvimento da técnica foi motivado pelo aumento da resistência de patógenos hospitalares, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*, levando pesquisadores a explorar combinações de antibióticos como uma estratégia para contornar a ineficácia de monoterapias (NAFIS *et al.*, 2019).

A principal vantagem do método *checkerboard* é sua capacidade de avaliar múltiplas combinações de concentrações em um único experimento, fornecendo dados detalhados sobre a interação entre agentes antimicrobianos. Essa abordagem tem sido amplamente empregada na

pesquisa de novos fármacos e no estudo da associação de antibióticos com compostos naturais, como óleos essenciais e flavonóides, visando potencializar a atividade antimicrobiana e reduzir a necessidade de doses elevadas de antibióticos (MEDEIROS, 2012). No entanto, o método apresenta algumas limitações. Sua execução pode ser complexa, exigindo um grande número de diluições e manipulações. Além disso, fatores como a escolha do meio de cultura, o tempo de incubação e a estabilidade dos compostos podem influenciar os resultados, exigindo padronização rigorosa para garantir a reprodutibilidade (LIMA *et al.*, 2018). Outra limitação é que o *checkerboard* avalia apenas a inibição do crescimento bacteriano, sendo necessário complementar a análise com testes bactericidas, como a concentração bactericida mínima (CBM) (SILVA *et al.*, 2020).

Apesar dessas restrições, continua sendo uma ferramenta essencial na microbiologia clínica e farmacêutica, permitindo a identificação de combinações antimicrobianas mais eficazes e contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate à resistência bacteriana.

3.3 Contexto epidemiológico do mrsa: uma análise global, nacional e regional

O aumento da resistência aos antibióticos tem gerado uma grande preocupação com as opções terapêuticas limitadas, resultando em taxas de mortalidade mais elevadas. Globalmente, o MRSA representa uma ameaça crescente à saúde pública e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é responsável por infecções em mais de 50% dos pacientes em unidades de terapia intensiva em muitos países desenvolvidos (WHO, 2020). Além disso, estudos de vigilância mundial indicam uma alta taxa de resistência a múltiplos antibióticos, o que dificulta o tratamento adequado (FRIERI *et al.*, 2017).

No Brasil, o MRSA é responsável por uma grande proporção das infecções nosocomiais, com dados mostrando que cerca de 50% das infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* são causadas por cepas resistentes à metilina (GUILHERME *et al.*, 2021). A disseminação do MRSA está frequentemente associada a práticas inadequadas de prescrição de antibióticos, falta de medidas de controle de infecção em hospitais e automedicação (SANTOS *et al.*, 2020). Um estudo realizado em 2021 indicou que a prevalência de MRSA nas unidades de terapia intensiva

do Brasil é de aproximadamente 30%, variando conforme a região e o tipo de hospital (SIQUEIRA *et al.*, 2021).

Analisando de maneira isolada a região Nordeste do país, nota-se o enfrentamento de desafios significativos, embora os dados sejam mais limitados em comparação com outras regiões. Um estudo realizado em hospitais da Bahia mostrou que a taxa de MRSA hospitalar é de aproximadamente 40%, com predominância em pacientes com comorbidades e aqueles submetidos a procedimentos invasivos (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Em Pernambuco, um levantamento apontou que a resistência à meticilina é detectada em até 35% das amostras de *S. aureus* coletadas de pacientes hospitalizados (MOURA *et al.*, 2020).

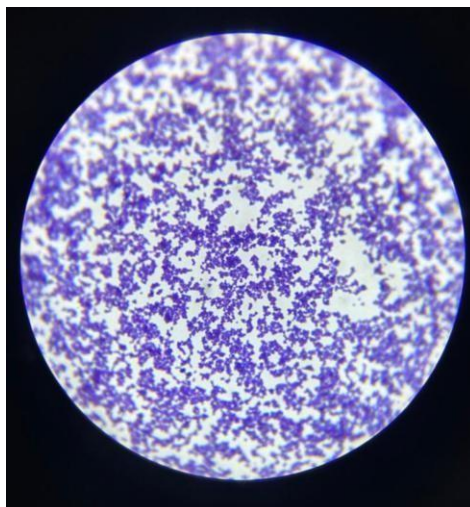
3.4 Características microbiológicas e clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

3.4.1 Aspectos gerais e patogenicidade de MRSA

É uma bactéria de grande relevância clínica devido à sua resistência a múltiplos antibióticos, especialmente os β -lactâmicos. Essa resistência complexifica o tratamento de infecções, resultando em maiores taxas de morbidade e mortalidade. Estudos recentes indicam uma prevalência crescente de MRSA em diferentes populações, sendo endêmicas tanto em hospitais quanto na comunidade em todas as partes do mundo (BRCAST, 2022).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica (coco) Gram-positiva, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 micrômetros. Caracteriza-se por se organizar em agrupamentos irregulares que lembram cachos de uva, resultado de divisões celulares em múltiplos planos. Essa configuração é distinta e auxilia na identificação laboratorial do microrganismo. Além disso, algumas cepas podem apresentar cápsulas de polissacarídeos, que aumentam sua virulência ao dificultar a fagocitose pelo sistema imunológico do hospedeiro (MICROBIAL NOTES, 2023). Na figura 4, observa-se a caracterização morfológica realizada por meio da coloração de Gram. Ao microscópio óptico, observou-se a presença de cocos Gram-positivos, evidenciados pela coloração roxa característica, dispostos predominantemente em agrupamentos semelhantes a cachos de uva, padrão típico do gênero *Staphylococcus*. Esse resultado confirma a morfologia e a afinidade tintorial compatíveis com *S. aureus*, reforçando sua identidade bacteriana e auxiliando na diferenciação em relação a outros cocos Gram-positivos (MADIGAN *et al.*, 2018).

Figura 4 - Imagem microscópica de *Staphylococcus aureus* (cocos).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Diversos fatores de risco estão associados à infecção, incluindo o uso prévio de antibióticos e a realização de procedimentos invasivos, como a utilização de dispositivos médicos, cateteres e ventilação mecânica. A resistência está principalmente relacionada à presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a), reduzindo a afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos. Além disso, a presença de cassetes cromossômicos específicos (SCC*mec*) contribui para a diversidade genética e a capacidade adaptativa da bactéria. Configura uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, a visualização do quadro clínico do paciente é influenciada pelo tipo de infecção e se o paciente está efetivamente infectado ou apenas colonizado. Sendo, as internações prolongadas, o aumento dos custos no tratamento e a maior mortalidade dos pacientes associada a falha em iniciar a antibioticoterapia adequada desde o início da infecção. Este fato induziu ao aumento do uso de carbapenêmicos em muitas instituições, o que resultou em aumento da resistência a esta classe de antimicrobianos (BRCAST, 2022).

Para conter a disseminação do MRSA, medidas de controle e prevenção são essenciais. Entre elas, destacam-se a higiene adequada das mãos, o uso racional de antibióticos para reduzir a pressão seletiva e a implementação de medidas de isolamento para pacientes infectados (SIEGEL *et al.*, 2007; CDC, 2019). Atualmente, o MRSA representa um desafio significativo para a saúde pública. A compreensão de sua epidemiologia, fatores de risco e mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento (TURNER *et al.*, 2019). O monitoramento contínuo e a adoção de medidas baseadas

em evidências podem reduzir a disseminação dessa bactéria resistente e melhorar os desfechos clínicos (WHO, 2017).

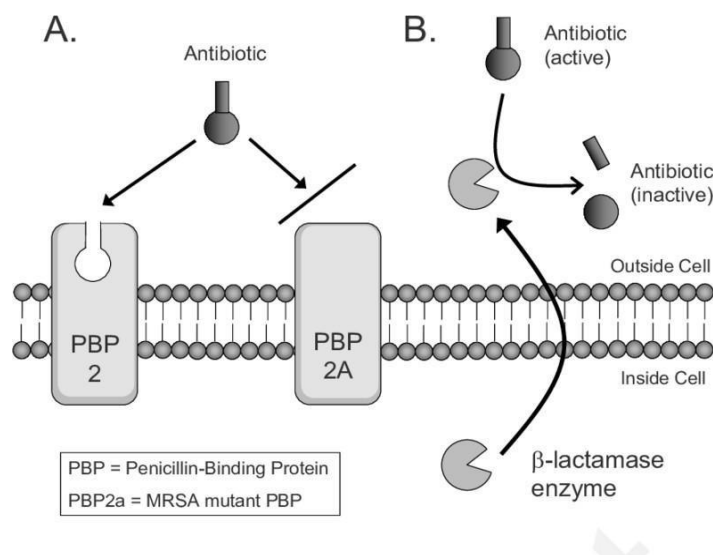
3.4.2 Mecanismos de resistência de *Staphylococcus aureus*

A resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* ocorre, na maioria dos casos, pela presença do gene *mecA*, localizado no cromossomo bacteriano. Esse gene codifica a proteína ligadora de penicilina PBP2a, que possui baixa afinidade por antibióticos β -lactâmicos, tornando-os ineficazes (LIMA *et al.*, 2019). O *mecA* está inserido no elemento genético móvel conhecido como *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), cujos diferentes tipos estão associados a distintos perfis de resistência. Cepas hospitalares (HCA-MRSA) costumam portar os tipos I a III, enquanto as cepas comunitárias (CA-MRSA) carregam os tipos IV e V, que são mais móveis geneticamente e menos multirresistentes (SILVA *et al.*, 2021).

A expressão do gene *mecA* pode variar entre células da mesma população bacteriana, fenômeno conhecido como heterorresistência, o que influencia a manifestação fenotípica da resistência, dependendo de fatores ambientais e regulatórios (SANTOS *et al.*, 2020). Além do *mecA*, outros mecanismos menos frequentes, como a superprodução de β -lactamases e a modificação de outras proteínas ligadoras de penicilina, também podem conferir resistência à meticilina (COSTA *et al.*, 2022).

Na Figura 5, observa-se uma representação esquemática dos principais mecanismos de resistência do *S. aureus* à meticilina. O primeiro é a produção da PBP2a, que substitui as PBPs nativas na síntese da parede celular, garantindo a sobrevivência bacteriana na presença do antibiótico, e o segundo mecanismo ilustrado é a produção de β -lactamases, enzimas que degradam o anel β -lactâmico de diversos antibióticos, tornando este um agente inerte. A figura evidencia como essas estratégias contribuem para a persistência do microrganismo frente à pressão seletiva dos antimicrobianos (MURPHY, 2011).

Figura 5 - Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina.



Fonte: MURPHY (2011).

Para a detecção da resistência à oxacilina, diversos métodos laboratoriais são empregados. Embora o teste de disco-difusão com meticilina tenha sido amplamente utilizado por muitos anos, sua sensibilidade pode ser comprometida pela heterorresistência (BARBOSA *et al.*, 2023). Atualmente, o disco de cefoxitina é considerado mais confiável para a detecção do gene *mecA* e é o método recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (MARTINS *et al.*, 2023).

A correta identificação das cepas resistentes é essencial para o manejo terapêutico, uma vez que cepas resistentes à meticilina devem ser consideradas resistentes a todos os β-lactâmicos, independentemente dos resultados individuais de testes para outros antibióticos desta classe (RODRIGUES *et al.*, 2021).

3.4.3 Significado clínico da detecção de cepas de MRSA

A detecção de MRSA possui um significado clínico importante, pois está associada a infecções de difícil tratamento e a maiores taxas de morbidade e mortalidade (DAVID; DAUM, 2010; TONG *et al.*, 2015). Sua presença em infecções hospitalares e comunitárias representa um desafio terapêutico, uma vez que limita as opções de tratamento antimicrobiano eficaz.

Estudos recentes indicam que a detecção precoce e precisa de MRSA é crucial para a implementação de medidas de controle de infecção e para a escolha adequada da terapia antimicrobiana (SALGADO *et al.*, 2003; CDC, 2019). Além disso, sua identificação em pacientes está associada a um aumento nos custos hospitalares, devido à necessidade de medidas de isolamento e prolongamento do tempo de internação (COSGROVE *et al.*, 2003). Portanto, a detecção prévia é fundamental para orientar decisões clínicas e políticas de saúde pública, visando reduzir a propagação de cepas resistentes e melhorar os desfechos clínicos dos pacientes.

3.4.4 Fundamentos históricos da evolução de MRSA

O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva descrita pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston que desempenha um papel significativo na medicina devido à capacidade de causar uma variedade de infecção, sejam elas benignas ou até doenças graves. Ele observou a bactérias em amostras de pus de abscessos cirúrgicos, a denominação *Staphylococcus* foi baseada na sua aparência semelhante a cachos de uvas (“*staphyle*” em grego significa cacho de uvas), enquanto *aureus* refere-se a sua coloração dourada característica em culturas (TONG, 2015). Após este fato, começou-se a observar um aumento de casos de infecções cutâneas por *S. aureus*, associada pelo seu reconhecimento e caracterização, mas também pelo fato de que a população começava a se aglomerar em grandes cidades devido à urbanização (SANTOS *et al.*, 2021).

Nas décadas seguintes, o *S. aureus* foi reconhecido como um patógeno responsável por diversas infecções, incluindo abscessos cutâneos, pneumonia e endocardite. A introdução de antibióticos como a penicilina na década de 1940 inicialmente ofereceu tratamentos eficazes contra essas infecções. No entanto, a resistência bacteriana emergiu rapidamente, com cepas de *S. aureus* desenvolvendo resistência à penicilina devido à produção de penicilinase. Essa resistência levou ao uso de antibióticos mais potentes, como a meticilina. Em 1961, foi identificada a primeira cepa de MRSA na qual, é mediada pelo gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada, tornando a bactéria resistente a antibióticos beta-lactâmicos (SANTOS *et al.*, 2020).

O *S. aureus* possui uma notável capacidade de adaptação e resistência, tornando-se uma das espécies de maior importância no contexto das infecções hospitalares e comunitárias.

Estudos recentes têm investigado a evolução genética do *S. aureus*, identificando linhagens específicas associadas a diferentes padrões de resistência e virulência (SANTOS *et al.*, 2021).

3.5 Cepas clínicas e ATCC: diferenças e implicações para a pesquisa antimicrobiana

A escolha entre utilizar cepas clínicas ou cepas de referência, como aquelas fornecidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), desempenha um papel crucial nos estudos microbiológicos, influenciando a aplicabilidade e os resultados obtidos (CLSI, 2023). As cepas clínicas são isoladas de pacientes ou de ambientes hospitalares e refletem melhor a diversidade genética e os padrões de resistência observados na prática clínica (TENOVER *et al.*, 2012). Em contraste, as cepas ATCC são padronizadas, geneticamente estáveis e amplamente utilizadas para validação de métodos, controle de qualidade e reprodutibilidade experimental (ATCC, 2024).

As cepas clínicas apresentam alta diversidade genética e fenotípica, refletindo a realidade de patógenos encontrados em situações reais de infecção. Essa variabilidade permite que os estudos avaliem a eficácia de novos antimicrobianos ou terapias frente a cepas com perfis específicos de resistência, como observado em estudos recentes que destacaram sua relevância para o desenvolvimento de tratamentos clínicos mais eficazes (LIMA *et al.*, 2021). Contudo, a heterogeneidade das cepas clínicas pode gerar variabilidade nos resultados, exigindo amostras maiores e maior controle experimental para assegurar conclusões confiáveis (SILVA *et al.*, 2022).

Por outro lado, as cepas ATCC são amplamente utilizadas devido à sua estabilidade genética e caracterização detalhada. Essas características garantem alta reprodutibilidade dos experimentos, tornando-as ideais para estudos que envolvem padronização de métodos e controle de qualidade. Por exemplo, a ATCC autentica suas cepas por meio de abordagens rigorosas, assegurando identidade, viabilidade e pureza, o que é essencial para testes de sensibilidade a antimicrobianos e validação de novos métodos diagnósticos. Embora cepas ATCC sejam indispensáveis para garantir consistência experimental, seu uso isolado pode limitar a aplicabilidade clínica, uma vez que não representam completamente a diversidade de patógenos encontrados em ambientes reais (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Assim, a combinação de ambas as abordagens tem se mostrado uma prática eficaz em pesquisas microbiológicas, permitindo explorar tanto a relevância clínica quanto a reprodutibilidade experimental proporcionada pelas cepas ATCC.

3.6 Resistência microbiana: fatores contribuintes e perspectivas para o futuro da terapia antimicrobiana

O uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos é apontado como um dos principais fatores contribuintes para o aumento da resistência bacteriana (FRIERI *et al.*, 2017; WHO, 2020), que configura um desafio crescente à saúde pública global, caracterizado pela capacidade de microrganismos resistirem aos efeitos dos medicamentos previamente eficazes (CASSINI *et al.*, 2019). A prescrição excessiva de antibióticos, muitas vezes sem necessidade clínica, e a automedicação são práticas que aceleram esse processo, resultando em um impacto significativo no ambiente hospitalar e comunitário (SANCHEZ *et al.*, 2020).

Com a ineficácia dos medicamentos convencionais e o aumento das infecções difíceis de tratar, surgem os fitoconstituintes, compostos bioativos derivados de plantas, que se apresentam como uma alternativa promissora para superar as limitações atuais dos antimicrobianos sintéticos (CHYSAFIDES *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2021). As características únicas desses compostos os tornam relevantes na busca de novos tratamentos. Sua ampla diversidade química, que inclui metabólitos secundários como flavonóides, terpenos, taninos e alcalóides, disponibiliza uma infinidade de estruturas complexas e inéditas (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Essas moléculas apresentam múltiplos mecanismos de ação, atacando diferentes alvos nos microrganismos, como a membrana celular, enzimas vitais e o material genético, vantagem significativa em comparação com muitos antibióticos sintéticos, que geralmente têm alvos específicos (MUNOZ *et al.*, 2021).

Pesquisas recentes destacam o potencial de diversos fitoconstituintes na inibição de microrganismos resistentes (OLIVEIRA *et al.*, 2023; SANTOS *et al.*, 2021). Compostos como flavonóides e terpenos têm demonstrado eficácia contra bactérias multirresistentes, como o MRSA (GUERREIRO *et al.*, 2021; BEZERRA *et al.*, 2022). Além disso, muitos desses compostos podem aumentar a permeabilidade da membrana celular bacteriana, facilitando a ação de antibióticos convencionais e restaurando sua eficácia (COSTA *et al.*, 2012). Taninos e

alcalóides, por sua vez, são reconhecidos por sua capacidade de inibir a formação de biofilmes, estruturas que conferem resistência adicional aos microrganismos (SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Uma aplicação promissora dos fitoconstituintes é sua utilização em terapias combinadas, onde atuam sinergicamente com antibióticos existentes (LIU *et al.*, 2021). Esse tipo de abordagem não apenas aumenta a eficácia dos tratamentos, mas também reduz as doses necessárias de antibióticos, minimizando efeitos colaterais e a pressão seletiva que leva à resistência (GARCIA *et al.*, 2022). Além disso, esses compostos podem ser explorados em outras áreas industriais. No entanto, existem alguns desafios para a aplicação prática dos fitoconstituintes, como a extração e purificação de compostos bioativos, que requerem técnicas avançadas, e os testes pré-clínicos e clínicos necessários para garantir a segurança e eficácia dos novos tratamentos. Tal como, a produção sustentável desses compostos em larga escala exige investimentos em biotecnologia e métodos de cultivo eficientes (EZZAT *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021).

Esta representa uma abordagem inovadora e sustentável para enfrentar a crise da resistência microbiana. A integração de pesquisas fitoquímicas com tecnologias modernas, como a biologia sintética e a bioinformática, pode acelerar a identificação de novos compostos e otimizar seu uso (RÍOS *et al.*, 2021). A conservação da biodiversidade vegetal também é essencial, garantindo que essas fontes naturais sejam preservadas para futuras descobertas. Assim, os fitoconstituintes oferecem uma solução promissora e estratégica para a resistência microbiana, com potencial para transformar o panorama do tratamento de infecções e contribuir significativamente para a saúde global (RIBEIRO *et al.*, 2021).

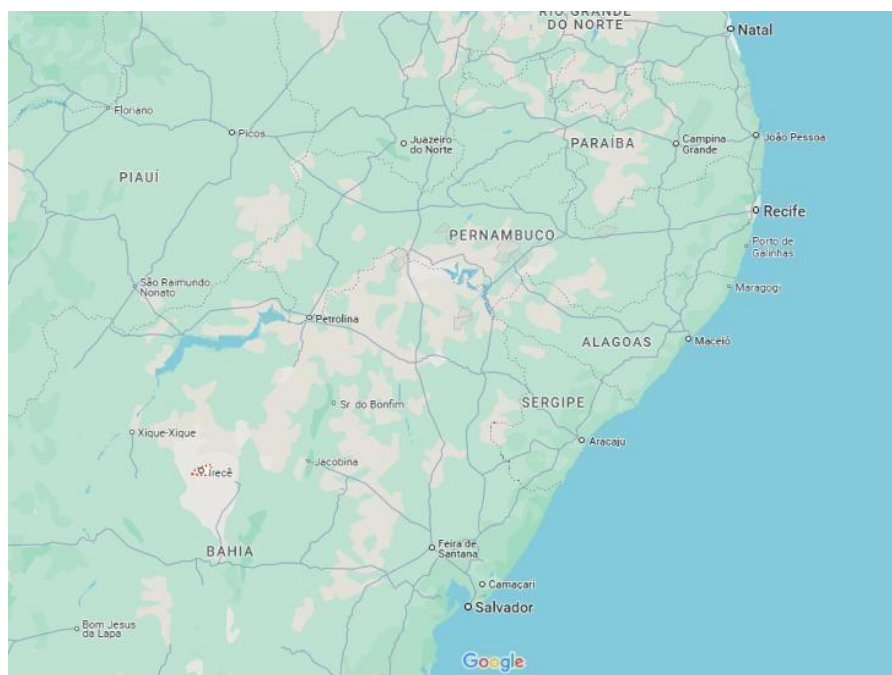
4 METODOLOGIA

4.1 Origem do óleo essencial da folhas de *Croton conduplicatus*

4.1.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Croton conduplicatus* foram coletadas na cidade de Irecê, Bahia, em -11.345982 S, -41.891216 W, às 14:00 horas do dia 4 de fevereiro de 2021. Para identificação botânica adequada do material vegetal coletado, foi feita uma exsicata e em seguida depositada e registrada sob o número 3217 no Herbário Manoel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba. As folhas foram separadas das outras partes aéreas e foram secas em um forno circulante a uma temperatura de 40°C por um período de 72 horas. As folhas secas foram moídas em um moinho de facas até um tamanho de partícula de aproximadamente 10 mesh, e 704,5 g do material vegetal seco foram obtidos e armazenados em um recipiente hermeticamente fechado protegido da luz.

Figura 6 - Localização do município de Irecê, Bahia, Brasil.



Fonte: GOOGLE MAPS (2025)

4.1.2 Obtenção do óleo essencial das folhas de *Croton conduplicatus*

O óleo essencial (OE) foi extraído por hidrodestilação a 100°C, utilizando um aparelho Clevenger simples e uma manta de aquecimento (Warmnest, Reino Unido), durante 3 horas. A Farmacopeia Brasileira (2010) reconhece e descreve a técnica como método oficial para a extração de óleos essenciais de plantas medicinais. Toda a quantidade de material vegetal seco (DV) foi utilizada, mantendo a proporção de 700 mL de água destilada para cada 100 g de DV, quantidade necessária para cobrir completamente o material. Esse processo resultou na obtenção de 2,2 mL de óleo essencial de *C. conduplicatus* (OECC) (Oliveira *et al.*, 2023).

Como observado na Figura 7, o OECC apresentou coloração amarelo-claro translúcida, com aspecto límpido e ausência de partículas em suspensão. O odor é característico, forte e marcante, semelhantes às de outras espécies do gênero *Croton*. O rendimento total do óleo foi de 2,2 mL, sendo armazenado em frascos de vidro com septo de silicone, apropriados para a conservação do material. Como os demais óleos essenciais, este é insolúvel em água e apresenta boa miscibilidade em solventes orgânicos como etanol, metanol e DMSO, utilizados em experimentos biológicos.

Figura 7 - Óleo essencial extraído das folhas de *Croton conduplicatus* armazenados em frascos de vidro.



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, (2023)

4.1.3 Caracterização do óleo essencial de *Croton conduplicatus* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

O EOCC extraído foi caracterizado cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizando um cromatógrafo a gás Clarus 680, equipado com um injetor automático PALCOMBI-xt, uma coluna Elite-5MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm) e um espectrômetro de massas Clarus SQ8S (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). A identificação dos compostos foi realizada através do banco de dados NIST MS *Search* Versão 2.2 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA), comparando os espectros de massa dos compostos com aqueles do banco de dados NIST, com o índice de retenção (IR) e a composição química dos óleos essenciais de *C. conduplicatus* relatada em outros estudos (OLIVEIRA *et al.* 2023).

O hélio foi empregado como gás de arraste, com uma vazão constante de 1 mL/min. A injeção da amostra (1,0 µL) foi realizada em modo split (1:10) a uma temperatura de 250°C. O programa de temperatura do forno consistiu em três etapas, são elas:

- Aquecimento de 35°C (mantido por 2 minutos) até 90°C (mantido por 2 minutos) a uma taxa de 10 °C/min;
- Elevação de 90°C até 130°C (mantido por 4 minutos) a uma taxa de 8 °C/min;
- Aumento de 130°C até 230°C (mantido por 2 minutos) a uma taxa de 4°C/min.

O tempo total de análise foi de 45,5 minutos. O espectrômetro operou em modo de ionização por impacto eletrônico (EI) a 70 eV, com temperatura da interface (linha de transferência) ajustada para 180 °C e da fonte de íons para 220°C. Os fragmentos de massa foram monitorados na faixa de 40 a 610 Da. Todas as análises foram conduzidas em triplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

4.2 Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton conduplicatus* diante de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina

4.2.1 Microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos utilizados neste estudo foram seis cepas da espécie *Staphylococcus aureus*, sendo duas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) *S. aureus* ATCC 25923 (sensível a metilina) e *S. aureus* ATCC 33591 (resistente a metilina), além de quatro cepas de origem clínica: *S. aureus* L16, *S. aureus* LL01, *S. aureus* P357 e *S. aureus* OXA01. Todas as cepas estavam estocadas sob congelamento (-20 °C) em Caldo Mueller Hinton (CMH)

com 15% de glicerol, no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Para fins de confirmação da espécie estudada foram realizados os testes de crescimento e fermentação em agar manitol salgado (figura 8), prova da catalase, prova da coagulase e prova da DNase, onde todos os testes positivos confirmaram a espécie *Staphylococcus aureus*.

Figura 8 - Crescimento da cepa *S. aureus* ATCC 33591 em Agar Manitol Salgado (AMS).

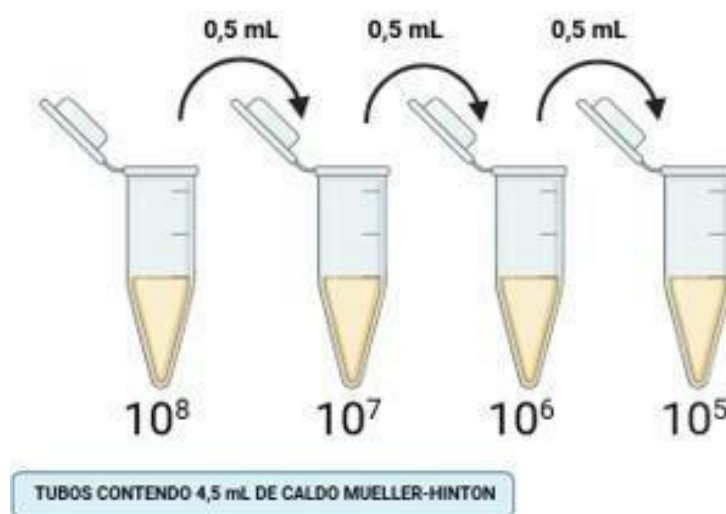


Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

4.2.2 Preparo dos inóculos microbianos

Para a obtenção da suspensão bacteriana, procedeu-se à retirada de uma alíquota de cada cepa a ser testada, a qual foi inoculada no respectivo tubo de vidro contendo 4 mL de caldo de Ágar Mueller-Hinton. As cepas foram então incubadas em estufa por 24 horas, à temperatura de 37°C. A partir da cultura em caldo, uma alíquota de 100 µL foi transferida para 4,5 mL de caldo estéril de Ágar Mueller-Hinton. Após um período de incubação de 20 a 30 minutos, foi monitorado o momento em que a suspensão atingiu a densidade correspondente à escala 0,5 de MacFarland, que equivale a uma concentração de 10^8 UFC/mL. Concluído este procedimento, foi realizada a diluição seriada necessária para alcançar o inóculo de trabalho com a concentração de 10^5 UFC/mL, como ilustrado na figura 9 (BRCAST, 2022).

Figura 9 - Diluição seriada para o inóculo de trabalho.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

4.2.3 *Preparo das soluções teste do OECC e agentes antimicrobianos*

O OECC foi solubilizado em uma solução composta por 3 mL de dimetilsulfóxido (Neon), 2 mL de Tween 80® (Dinâmica) e 7 mL de água deionizada estéril, em concentração inicial de 20.480 µg/mL. Para este estudo foram selecionados os antibióticos da classe das cefalosporinas: cloridrato de cefepime (ABL - antibióticos do Brasil®), ceftazidima pentraidratada (Blau Farmaceutica®) e ceftriaxona sódica (Momenta®). Os antimicrobianos foram solubilizados em água destilada estéril. Todas as soluções foram, posteriormente, filtradas por meio de uma membrana de 0,22 µm antes de serem submetidas ao teste de atividade, a fim de assegurar sua esterilidade. Todos os compostos testados foram preparados em concentração de 8.096 ug/mL, resultando em uma solução denominada de solução-estoque.

4.2.4 *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)*

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos (ceftriaxona, ceftazidima, cefepime) e do óleo essencial de *Croton conduplicatus* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando microplaca de 96 poços de fundo U, preconizado pelo documento M27, CLSI (2017). Para isso foram realizadas diluições seriadas dos antibióticos e

do OECC em meio caldo Mueller Hinton, a fim de obter concentrações finais em cada poço variando de 2.048 a 4 µg/mL para ceftriaxona, cefepime e ceftazidima e de 1.024 a 512 µg/mL para o óleo essencial.

Após a etapa de preparação das diluições, 100 µL foram distribuídos nos poços de microplacas de 96 poços e 100 µL do inóculo padronizado a 10^5 aplicados em todos os poços da placa. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi possível realizar a análise da inibição visual através do crescimento bacteriano na base do poço. Lembrando que as duas últimas colunas da microplaca são utilizadas como controle positivo e controle negativo. Em seguida, foi acrescido 20 µL de resazurina 0,01% e após um intervalo de 1 hora foi realizada a leitura através da mudança de coloração conforme recomendações do documento M27, CLSI (2017).

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi realizado o subcultivo através da transferência de 10µL de cada poço sem crescimento visível para placas de Ágar Mueller-Hinton, incubados sob temperatura de 35 ± 2 °C por um período de 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração dos antibióticos e do óleo essencial de *Croton conduplicatus* que inibiram o crescimento visível das espécies de *Staphylococcus aureus*. A CBM foi definida como a mais baixa concentração dos antibióticos e OECC que inviabilizou mais de 99,9% do inóculo inicial. Os testes foram realizados em triplicata e com controle positivo e negativo a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados (BRCast, 2022).

4.2.5 Ensaio de combinação do óleo essencial das folhas de *Croton conduplicatus* e cefalosporinas (checkerboard)

O método *checkerboard* tem como objetivo determinar a interação de dois agentes antimicrobianos em combinação para inibir o crescimento de microrganismos através do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Inicialmente, foi cultivada as cinco cepas de *Staphylococcus aureus* em caldo Mueller-Hinton, ajustando para a densidade celular para 10^5 UFC/mL, o inóculo foi padronizado utilizando o método de turbidez da escala de McFarland. Em seguida, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços, nas quais foram preparadas diluições seriadas dos agentes antimicrobianos em teste, incluindo o OECC e os antibióticos ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima.

O OECC foi diluído ao longo das colunas da placa e os antimicrobianos diluídos ao longo das linhas da placa, criando uma matriz bidimensional. Cada poço apresentando uma combinação diferente de concentrações dos dois agentes antimicrobianos. Em sequência, foi

adicionado 100µL da suspensão bacteriana padronizada a cada poço. Realizado todo o processo, as placas foram incubadas entre 35°C a 37°C na estufa por um período de 24 horas.

Em seguida, a avaliação do crescimento bacteriano foi realizada por meio da observação visual, complementada pelo uso do corante resazurina, amplamente utilizada como indicador de viabilidade celular em ensaios microbiológicos devido à sua capacidade de sofrer redução em células metabolicamente ativas, o que resultou em uma mudança de coloração permite a interpretação dos resultados. No qual, a coloração rosa indicativa da ausência de inibição bacteriana, enquanto tons de roxo ou púrpura indicam efeito sinérgico com inibição do crescimento microbiano. Dessa forma, a resazurina atuou como um marcador eficiente para a determinação da atividade antimicrobiana dos compostos testados.

Com todos os dados disponíveis, calculou-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), utilizando as fórmulas:

$$CIF1 = \frac{CIM (associação\ do\ OECC + antibiótico)}{CIM (OECC)} \quad (Eq1)$$

$$CIF2 = \frac{CIM (associação\ do\ OECC + antibiótico)}{CIM (antibiótico)} \quad (Eq2)$$

Legenda - CIF: Concentração Inibitória Fracionada; CIM: concentração inibitória mínima; OECC: Óleo essencial de *Croton conduplicatus*.

O efeito da combinação foi determinado por meio de uma equação específica, o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Os valores obtidos foram comparados com a CIM da substância em teste e do antibiótico isolado, o que permitiu avaliar a viabilidade da interação ou terapia. Esses efeitos sinérgicos, na maioria dos casos, podem contribuir para a redução da quantidade de antibiótico necessária para inibir o crescimento de cepas bacterianas.

$$ICIF = CIF1 + CIF2 \quad (Eq3)$$

Legenda - ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

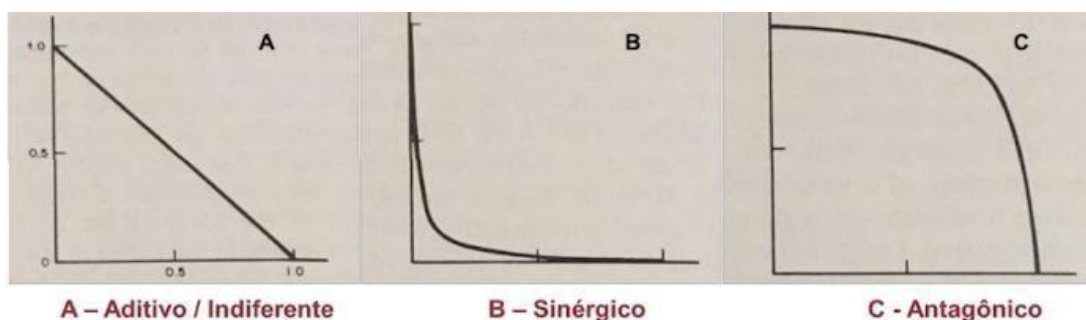
Embora o Comitê Europeu de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST) e o Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BRCAT) forneça

critérios detalhados para a interpretação de testes de sensibilidade, como a Concentração Inibitória Mínima (CIM), não se é especificado diretrizes para a análise do ICIF derivado do método *checkerboard*. Na ausência de critérios oficiais para o ICIF, a literatura científica recomenda a seguinte classificação enviada por LORIAN (2005), na qual indica que:

- **ICIF $\leq 0,5$:** sinergismo, indicando que a combinação dos antimicrobianos resulta em um efeito superior ao esperado individualmente.
- **$0,5 < \text{ICIF} \leq 4$:** indiferença, sugerindo que a associação não altera significativamente a eficácia dos compostos.
- **ICIF > 4 :** antagonismo, onde a combinação diminui a eficácia dos antimicrobianos, podendo comprometer o tratamento.

A figura 10 apresenta o perfil dos isobologramas dependendo do efeito observado (LORIAN, 2005). Os ensaios foram realizados em duplicata de experimentos independentes.

Figura 10 – Perfil dos isobologramas com os possíveis efeitos das associações: A (Aditivo), B (Sinérgico) e C (Antagônico).



Fonte: LORIAN (2005)

4.3 Ensaio de citotoxicidade em hemácias

A citotoxicidade do OECC em hemácias foi avaliada utilizando sangue de carneiro desfibrinado (NEWPROV). Foram testadas as amostras do OECC em concentrações que variaram de 1024 a 2 $\mu\text{g/mL}$. Inicialmente foi feita uma suspensão de hemácias de carneiro a 5%, uma alíquota de 1 mL de cada uma das amostras testadas foram colocadas em contato por 1 hora com 1 mL da suspensão de hemácias em tubo de ensaio, após este período as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro no

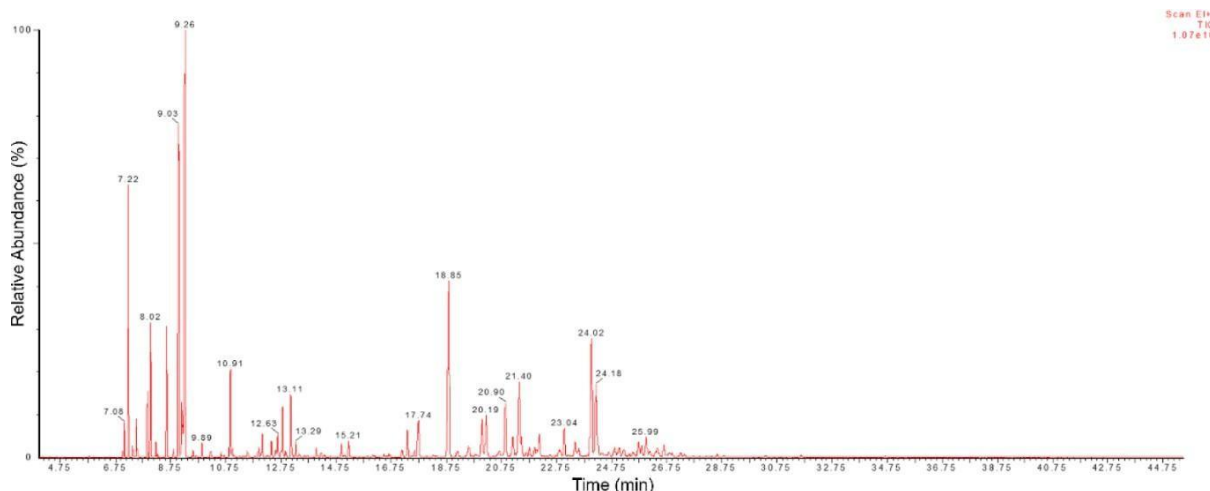
comprimento de onda 540 nm. Como controle positivo de hemólise foi utilizado uma solução de Triton X-100 1 % e como controle negativo de hemólise a solução fisiológica. Os resultados foram expressos por porcentagem de hemólise, levando em consideração a absorbância da hemólise do controle positivo e do controle negativo (ROCHA *et al.*, 2020). Os testes foram realizados em triplicata de experimentos independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do óleo essencial das folhas de *Croton conduplicatus*

Conforme ilustrado no cromatograma de íons totais (Figura 11), foi possível observar a presença de 74 picos distintos, dos quais 71 foram devidamente identificados correspondendo a 95,94% da composição total. Os principais compostos identificados incluem os monoterpenos 1,8-cineol (13,15%) e p-cimeno (10,68%), além dos sesquiterpenos cariofileno (9,73%) e espatulenol (6,36%), que se destacam como os constituintes majoritários, estes estão representados na Figura 12. Os demais picos presentes no cromatograma correspondem a compostos minoritários, com concentrações inferiores a 5%, como α -pineno (4,93%), biciclogermacreno (3,40%), α -felandreno (3,08%), β -pineno (2,77%) e linalol (2,39%). Todos os compostos identificados estão definidos na Tabela 1 com os respectivos tempos de retenção de cada composto e a porcentagem relativa da área do pico no cromatograma, refletindo a abundância relativa de cada composto.

Figura 11 - Cromatograma de íons totais obtido por GC-MS do óleo essencial de *Croton conduplicatus*.



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, (2023)

Estudos anteriores demonstraram variações na composição química do OECC de acordo com as condições de coleta e preparo do material vegetal. Oliveira-Junior (2021) identificaram

42 compostos em folhas frescas coletadas em Petrolina (PE), com predominância de eucaliptol (21,42%), p-cimeno (12,41%) e espatulenol (15,47%). De forma semelhante, Almeida et al. (2015) observaram a presença majoritária de eucaliptol, p-cimeno e espatulenol nas folhas frescas coletadas no mesmo local durante a estiagem, embora com pequenas variações nas porcentagens. No período chuvoso, porém, o perfil químico mudou, destacando eucaliptol, α -felandreno e biciclogermacreno como compostos majoritários. Essas diferenças podem ser atribuídas a fatores como a estação do ano, as condições climáticas, características do solo e, no caso do presente estudo, ao uso de folhas secas e pulverizadas, procedimento que pode influenciar a composição final do óleo.

Tabela 1 - Composição química das folhas do OECC analisada por CG-MS.

Nº	NOME	Área %	TR	Nº	NOME	Área %	TR
1	α - triciclono	0,0947 %	7,019	37	α –copaeno	1,1905 %	17,33 3
2	α -thujeno	0,5708 %	7,076	38	β -bouborneno	0,2048 %	17,60 6
3	α -pineno	4,9312 %	7,216	39	β –elemeno	1,9192 %	17,73 9
4	1- Etilbutilhidroperó xido	0,2080 %	7,380	40	Cariofileno	9,7331 %	18,84 8
5	Camfeno	0,7277 %	7,504	41	β –copaeno	0,3110 %	19,15 5
6	4-tujeno	1,2496 %	7,916	42	α -feruleno	0,6161 %	19,55 8
7	β -pineno	2,7718 %	8,024	43	Humuleno	1,7674 %	20,05 2

8	β - mirceno	0,3253 %	8,211	44	Aloadendreno	1,9932 %	20,19 5
9	2,3- dihidro- 1,8- cineol	0,0524 %	8,271	45	β -gurjuneno	0,2695 %	20,67 6
10	α -felandreno	3,0767 %	8,604	46	D-gamacreno	2,6389 %	20,90 1
11	α -terpineno	0,2022 %	8,848	47	β - Selinene	0,8670 %	21,17 1
12	P-cimeno	10,675 %	9,035	48	Biciclogermacreno	3,3999 %	21,40 2
13	D-limoneno	1,5112 %	9,155	49	α -Muruleno	0,7182 %	21,48 1
14	β -tujeno	0,6914 %	9,196	50	Eremofila-1(10),8,11 trieno	0,1580 %	21,64 9
15	Eucaliptol	13,145 %	9,263	51	β -germacreno	0,4158 %	21,76 6
16	β -ocimeno	0,1820 %	9,554	52	γ -cadieno	0,4333 %	21,95 3
17	γ -terpineno	0,3961 %	9,893	53	β –cadineno	1,0416 %	22,13 1
18	Cis-4-tujanol	0,1809 %	10,21 6	54	Cadala-1(10)3,8-trieno	0,4817 %	22,86 3
19	Isoterpinoleno	0,1605 %	10,58 7	55	Ciclohexano,1,3- diisopropenil-metil	1,3389 %	23,03 7

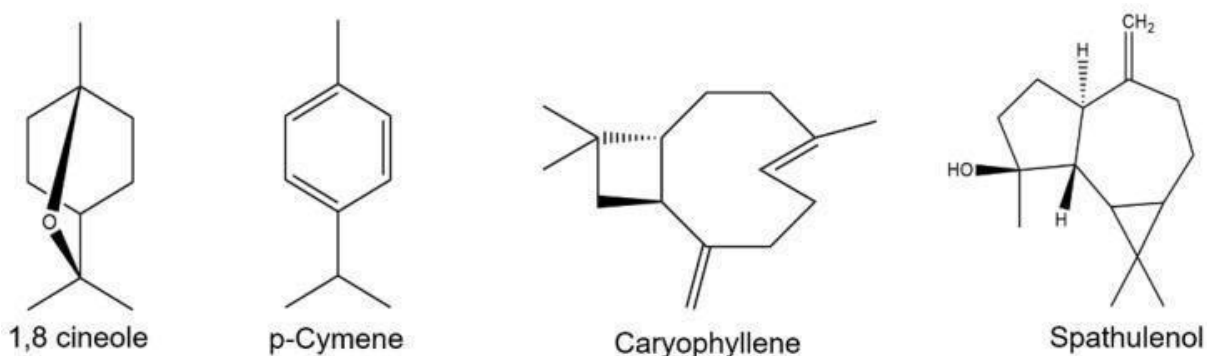
20	Linalol	2,3936 %	10,91 0	56	β -germacreno	0,6324 %	23,43 0
21	Cis-4-tujanol	0,1832 %	10,97 7	57	Cis- α -copaeno-8-ol	0,5110 %	23,56 3
22	cis-2-metenol	0,1727 %	11,53 8	58	Espatulenol	6,3595 %	24,01 9
23	Trans-pinocarveol	0,3306 %	11,97 7	59	Ledol	0,5042 %	24,85 3
24	d-2-canfanona	0,7481 %	12,07 0	60	1,2 epoxihumuleno	0,4319 %	25,02 4
25	pinocarvona	0,4545 %	12,40 6	61	β -guaieno	0,4382 %	25,19 2
26	Terpineol	0,2259 %	12,57 1	62	2 γ -malieno	0,1182 %	25,38 8
27	Borneol	0,6743 %	12,63 1	63	Epicubebol	0,2556 %	25,52 8
28	Terpinen-4-ol	1,4399 %	12,80 9	64	β -espatulenol	0,5956 %	25,73 4
29	p-cimenol	0,1932 %	12,92 3	65	11,11-dimetil-4,8-biciclodimetilenoundecan3-ol	0,3415 %	25,84 8
30	α - terpinol	1,9567 %	13,11 0	66	10-epi- α -cadinol	0,8824 %	25,93 3
31	Cis-sabinol	0,4026 %	13,29 0	67	Aloaromadendrano-4- β ,10 - α -diol	0,1516 %	26,13 3

32	Cis-piperitol	0,0858 %	13,40 4	68	Epi- α -murolol	0,7203 %	26,39 9
33	Acetato de β sabinila	0,2238 %	14,03 8	69	Xantoxilina	0,6456 %	26,64 6
34	Acetato de bornila	0,3624 %	14,94 4	70	(1R,7S,E)-7-isopropil4,10-dimetileno-ciclododec5-eno	0,1352 %	27,25 5
35	Timol	0,5278 %	15,21 4	71	Aromadendreno		28,58 2
36	Ciclosativeno	0,3395 %	17,15 3				

Legenda - TR: Tempo de retenção.

Fonte: OLIVEIRA *et al.* (2023)

Figura 12 - Estrutura química dos monoterpenos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de *Croton conduplicatus*.



Fonte: OLIVEIRA *et al.* (2023)

Os três compostos majoritários evidenciam o caráter terpênico do óleo, reconhecidos por suas diversas propriedades biológicas benéficas, incluindo a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2023). No estudo publicado por Oliveira e colaboradores (2023) com o OECC, foi identificado a presença predominante de eucaliptol e p-

cimeno, compostos químicos que já foram relatados por apresentarem atividades microbiológicas e anti-biofilme, especialmente frente a cepas de MRSA.

5.2 Concentração inibitória mínima e bactericida mínima do OECC

Na tabela 2, podemos analisar diferenças significativas na susceptibilidade das cepas de *S. aureus* frente aos antibióticos testados (CPM, CAZ e CRO) e ao OECC. Os resultados indicam que as cepas apresentam perfis variados de resistência, com algumas linhagens exibindo CIMs elevadas aos antimicrobianos testados, sugerindo um fenótipo de resistência às cefalosporinas.

Tabela 2 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antibióticos ceftriaxona (CRO), cefepime (CPM), cefazolina (CAZ) e do óleo essencial de *Croton conduplicatus* (OECC), frente a cepas de *S. aureus* (µg/mL)

	CIM/CBM (µg/mL)				
	OECC	CPM	CAZ	CRO	RESISTÊNCIA
<i>S. aureus</i>					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	512/512	8/16	8/16	4/8	CEPA CONTROLE
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	512/512	256/512	>2048/>2048	512/1024	CEPA CONTROLE
<i>S. aureus</i> L16	512/512	32/64	8/16	8/16	CPM; CAZ;CRO
<i>S. aureus</i> LL01	256/512	2048/2048	1024/2048	4/8	CPM; CAZ; CRO

<i>S. aureus</i>	256/512	2048/2048	128/256	>2048/>2048	CPM; CAZ;CRO
P57					
<i>S. aureus</i>	512/1024	>2048/>2048	>256/>256	2048/2048	CPM; CAZ;CRO
OXA01					

Legenda - CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; ATCC: *American Type Culture Collection*.

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Oliveira et al. (2022) demonstrou resultados no qual o OECC apresentou atividade antimicrobiana significativa com valores da CIM de 256 µg/mL para MSSA e 512 µg/mL para MRSA. Valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho, demonstrando um efeito bactericida. Ainda, Oliveira e colaboradores (2022) testaram a atividade frente cepas Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, obtendo valores superiores a 1024 µg/mL, indicando uma seletividade do OECC para *S. aureus*.

Diversas espécies do gênero *Croton* têm sido investigadas por suas propriedades antimicrobianas, especialmente frente a cepas resistentes. A espécie *Croton conduplicatus* tem se destacado como uma fonte promissora de compostos bioativos. Oliveira et al. (2023) demonstraram que o óleo essencial obtido das folhas dessa espécie apresenta não apenas atividade antibacteriana contra cepas clínicas de MRSA, mas também efeito sinérgico quando combinado com antibióticos como a oxacilina, esses resultados reforçam o potencial do óleo como agente adjuvante no combate destas infecções.

Em consonância com de Oliveira et al. (2022), que relatam CIM de 256–512 µg/mL para cepas de MSSA e MRSA frente ao OECC, os valores de CBM obtidos (512–1.024 µg/mL) geraram razões CBM/CIM de 1:2, indicando que concentrações até duas vezes maiores que as inibitórias são necessárias para garantir efeito bactericida pleno. Além disso, Merghni e colaboradores (2023) demonstraram em estudos com 1,8-cineol, que esse monoterpene promove ruptura da membrana celular e indução de estresse oxidativo em cepas de MRSA, reforçando o papel dos constituintes majoritários do OECC na supressão bacteriana.

No presente estudo, a cepa de referência *S. aureus* ATCC 25923 apresentou a CIM para CRO, CPM e CAZ (4–16 µg/mL), enquanto a CIM para o OECC foi de 512 µg/mL. Em contrapartida, a cepa *S. aureus* ATCC 33591, conhecida por sua resistência à metilicina, apresentou CIMs com valores superiores a 512 µg/mL para todos os antibióticos testados, confirmando seu perfil de resistência. Da mesma forma, as cepas clínicas OXA01 e P357

exibiram CIMs para CRO, CPM e CAZ variando de 2048 µg/mL a >2048 µg/mL, reforçando sua resistência expressiva. O óleo essencial, por outro lado, apresentou CIMs menores nessas cepas, variando entre 256 e 1024 µg/mL, sugerindo que pode ter algum efeito antimicrobiano contra essas linhagens resistentes.

A cepa L16 apresentou CIM de 512 µg/mL frente ao óleo essencial, sugerindo baixa sensibilidade ao composto e quanto aos antimicrobianos convencionais essa cepa demonstrou menor CIM para CRO e CAZ (8–16 µg/mL) quando comparado ao CPM (32–64 µg/mL). Já a cepa LL01 também exibiu uma CIM de 512 µg/mL para o óleo essencial e um padrão variável frente aos antibióticos, para CRO a CIM de 4–8 µg/mL, mas valores superiores para CPM e CAZ (2048 µg/mL).

Com relação ao CBM, na maioria dos casos de resistência este dado se apresenta maior que CIM, considerando que a bactéria consegue sobreviver mesmo com a presença de antimicrobiano, ativando mecanismos como bombas de efluxo, enzimas de resistência, alterações no alvo, dentre outros. O que implica dizer que, o antibiótico inibe o crescimento da bactéria (CIM) mas não consegue matar, exigindo concentrações mais altas de CBM (BRCAST, 2022). Nos casos que a CIM/CBM apresentou resultados iguais indica que, ele não apenas inibe mas também mata nas mesmas concentrações, como acontece no caso das cepas padrões ATCC 25923 e ATCC 33591.

A análise da relação CIM/CBM indicou para a maioria das amostras um comportamento predominantemente bacteriostático, uma vez que os valores de CBM foram, em geral, no máximo duas vezes superiores às respectivas CIMs (CLISI, 2020). Esses resultados reforçam a resistência intrínseca das cepas MRSA às cefalosporinas de gerações convencionais e destacam a importância da avaliação do efeito sinérgico da associação OECC-antibiótico como potencial estratégia para reverter a resistência observada (LIU *et al.*, 2020)

Reconhecer que a CIM de antimicrobianos pode variar entre cepas da mesma espécie é essencial, pois essa diferença resulta de diversos fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Entre eles, destacam-se as variações na permeabilidade da membrana celular (GIBSON *et al.*, 2001), a presença de mecanismos de resistência como enzimas inativadoras (betalactamases) ou bombas de efluxo (LEGER *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2015), além de mutações ou transferência genética que afetam a sensibilidade ao tratamento (BERTOLUCCI *et al.*, 2017).

A formação de biofilmes também contribui para o aumento da resistência, dificultando a ação dos antimicrobianos (MA *et al.*, 2014). Condições ambientais como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e a fase de crescimento bacteriano influenciam diretamente a

resposta ao antimicrobiano, assim como a variabilidade na expressão dos alvos moleculares das drogas entre diferentes cepas (HAMADA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017). Esses fatores reforçam a importância de avaliar a atividade antimicrobiana em múltiplas cepas, como realizado no presente estudo, para garantir resultados mais robustos e clinicamente relevantes.

Os compostos majoritários do óleo, eucaliptol (1,8-cineol), p-cimeno e sesquiterpeno cariofileno apresentam atividade antimicrobiana segundo diferentes estudos. O eucaliptol é reconhecido por seu efeito bactericida sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, embora seu poder possa diminuir quando misturado a outros componentes do óleo; ainda assim, ele costuma potencializar a ação de antibióticos tradicionais, funcionando como um adjuvante valioso, tem mostrado eficácia contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, incluindo aquelas resistentes à metilina (MRSA), por sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular bacteriana, facilitando a penetração de antibióticos (SANTOS *et al.*, 2021; DE LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2019). O p-cimeno também apresenta ação antibacteriana, particularmente contra *Staphylococcus aureus*, alterando a membrana celular bacteriana e tornando-a mais permeável a agentes antimicrobianos (MARZOUK *et al.*, 2016).

O p-cimeno inibe o crescimento de diversas bactérias — em ensaios, apresentou CIM de 128 µg/mL contra *S. aureus* ATCC 25923 e mostrou efeito sinérgico com tetraciclina. Esses achados sugerem que, juntos, esses dois compostos são responsáveis pela supressão observada na população de *S. aureus* no presente estudo (OLIVEIRA *et al.*, 2023). O cariofileno, por sua vez, além de antibacteriano, possui propriedades anti-inflamatórias, o que o torna útil no combate a infecções (LIMA *et al.*, 2020). Quando combinados com antibióticos, como as cefalosporinas (cefepime, ceftriaxona e ceftazidima), esses compostos mostram efeitos sinérgicos, ou seja, aumentam a eficácia do antibiótico ao reduzir a CIM necessária para inibir o crescimento bacteriano (PEREIRA *et al.*, 2017). Esse sinergismo ocorre devido à alteração na membrana celular e ao aumento da penetração dos antibióticos nas células bacterianas, o que pode ser uma estratégia eficaz contra cepas resistentes.

O estudo de Probst (2012) avaliou o óleo essencial de *Salvia rosmarinus* (alecrim) extraído por hidrodestilação apresentou uma CIM de 3,75 mg/mL contra *S. aureus* ATCC 6538. Válido ressaltar que variações na composição química dos OEs podem impactar significativamente sua atividade antimicrobiana. No presente estudo, a análise do óleo extraído revelou a presença de cânfora (27,51%), limoneno (21,01%), mirceno (11,19%), α -pineno (10,37%) e β -pineno (5,27%) como constituintes majoritários. Esses compostos desempenham

papéis distintos na atividade antimicrobiana, podendo atuar de forma sinérgica ou individualmente, inibindo o crescimento bacteriano de maneira independente.

Enquanto isso, Owlia et al. (2007) avaliaram a atividade do OE de camomila por meio da metodologia de difusão em ágar e tubos, obtendo CIMs que variaram entre 0,1 e 7,0 mg/mL, dependendo da espécie testada. Os dados obtidos no presente estudo corroboram tais achados, indicando que a atividade antimicrobiana dos OEs pode variar conforme a cepa bacteriana avaliada e a metodologia empregada (OWLIA *et al.*, 2007).

Entre óleos essenciais avaliados em outros estudos, o de canela demonstrou eficácia contra todas as bactérias testadas. Essa atividade é atribuída ao elevado teor de cinamaldeído (68,95%), corroborado por Unlu et al. (2009), que também relataram potente ação contra *S. aureus*. O óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) também apresentou atividade antimicrobiana atribuída principalmente à presença de eugenol (75,85%) e acetato de eugenila (16,38%). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2010) e Zago et al. (2012), que reforçaram o potencial antibacteriano desses óleos, especialmente contra cepas de *S. aureus*.

5.3 Efeito da combinação do OECC com cefalosporina

A Tabela 3 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton conduplicatus* (OECC) em combinação com as cefalosporinas cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO) e ceftazidima (CAZ) contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo ATCC 25923, ATCC 33591, L16, LL01, OXA 01 e P357. Os valores da CIM foram determinados tanto para os antibióticos isoladamente quanto para suas combinações com OECC. Além disso, foram calculados os valores do índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIFI) para avaliar o tipo de interação entre os compostos e a porcentagem de redução da CIM.

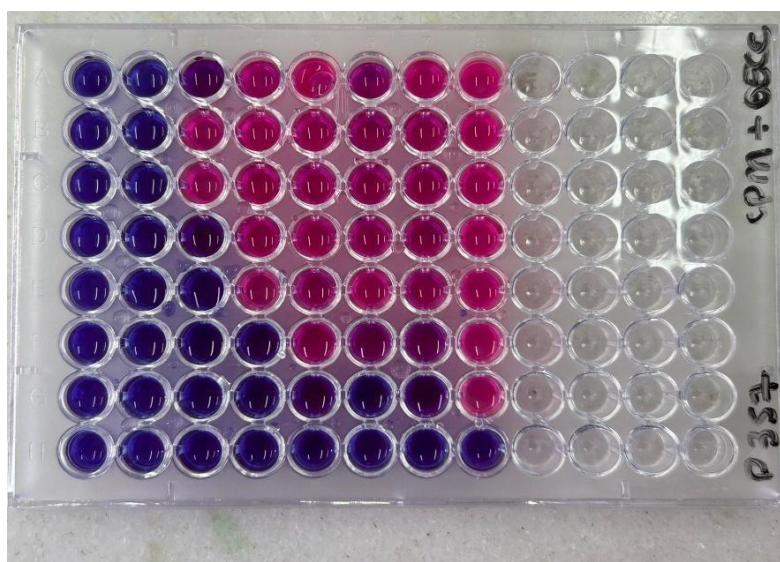
Os resultados demonstram uma redução expressiva da CIM dos antibióticos quando combinados com OECC, indicando um potencial efeito sinérgico. Por exemplo, na cepa ATCC 33591, a CIM da ceftriaxona foi reduzida de 512 µg/mL para apenas 2 µg/mL, representando uma diminuição de aproximadamente 99,61%. Da mesma forma, na cepa LL01, a CIM da ceftazidima caiu de 1024 µg/mL para 16 µg/mL, reforçando o efeito da associação com OECC. Esse padrão de redução foi observado em todas as combinações testadas, o que indica uma

melhoria significativa na atividade antibacteriana dos antibióticos quando associados ao óleo essencial.

Pode-se destacar também a cepa *S. aureus* P357, onde a combinação do OECC com CPM, CRO e CAZ promoveu sinergismo em todas as combinações sendo capaz de reduzir a CIM destes antibióticos entre 98,44 e 99,22%, ficando bem ilustrado pela figura 13, demonstrando inibição de crescimento em várias combinações entre OECC e CPM.

Os valores do CIFI corroboram esse efeito sinérgico, uma vez que todas as combinações apresentaram $CIFI \leq 0,5$, valor indicativo de sinergismo. Esse resultado sugere que o OECC potencializa a ação dos antibióticos, permitindo uma inibição mais eficaz do crescimento bacteriano mesmo em concentrações menores de antibiótico. Isso é particularmente relevante no combate a cepas resistentes, como a ATCC 33591, conhecida por sua resistência à meticilina. Em suma, os dados apresentados na tabela 3 indicam que o óleo essencial de *Croton conduplicatus* atua como um agente sinérgico ao potencializar o efeito das cefalosporinas testadas contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*. Essa descoberta sugere um possível uso do OECC como adjuvante na terapia antimicrobiana, permitindo a redução da concentração necessária dos antibióticos e, consequentemente, minimizando os efeitos adversos associados ao seu uso.

Figura 13 - *Checkerboard* da combinação entre OECC e cefepime em concentrações subinibitórias diante da cepa *S. aureus* P357.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Tabela 3 - Efeito sinérgico do OECC em combinação com cefalosporinas diante de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

<i>S. aureus</i>	Combinação	CIM ind. (µg/mL)	CIM comb. (µg/mL)	CIF ind.	CIF ind. (CIFi)	Redução da CIM (%)	Efeito da comb.
<i>S. aureus</i>	CPM/OECC	8/512	2/128	0,250/0,25	0,50	75%	Sinérgico
ATCC	CRO/OECC	4/512	0,125/256	0,004/0,02	0,06	96,88%	Sinérgico
25923	CAZ/OECC	8/512	0,125/128	0,250/0,06	0,26	98,44%	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	CPM/OECC	256/512	4/8	0,016/0,06	0,032	98,44%	Sinérgico
ATCC	CRO/OECC	512/512	2/8	0,016/0,04	0,020	99,61%	Sinérgico
33591	CAZ/OECC	2048/512	8/6	0,004/0,06	0,02	99,61%	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	CPM/OECC	32/512	2/4	0,063/0,125	0,188	93,77%	Sinérgico
L16	CRO/OECC	8/512	0,5/64	0,063/0,125	0,188	99,61%	Sinérgico
	CAZ/OECC	8/512	0,25/128	0,250/0,031	0,281	99,61%	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	CPM/OECC	2048/256	128/32	0,063/0,125	0,188	93,75%	Sinérgico
LL01	CRO/OECC	4/256	0,25/32	0,016/0,004	0,00	93,75%	Sinérgico
	CAZ/OECC	1024/256	16/64	0,016/0,250	0,266	96,88%	Sinérgico
	CPM/OECC	2048/256	16/64	0,250/0,008	0,258	99,22%	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	CRO/OECC	2048/256	16/64	0,250/0,008	0,258	99,22%	Sinérgico
P357	CAZ/OECC	128/256	2/16	0,063/0,063	0,126	98,44%	Sinérgico
	CPM/OECC	2048/512	256/64	0,125/0,125	0,250	87,50%	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	CRO/OECC	2048/512	64/32	0,032/0,063	0,095	96,88%	Sinérgico
OXA01	CAZ/OECC	256/512	16/64	0,063/0,125	0,188	93,75%	Sinérgico

Legenda - OECC: óleo essencial de *Croton conduplicatus*; CPM: cefepime; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CIM: concentração inibitória mínima; CIFi: índice de concentração inibitória fracionada CIF: concentração inibitória fracionada; ATCC: American Type Culture Collection; Ind: individual; Comb: combinada.

FONTE: Elaborado pela autora, 2025.

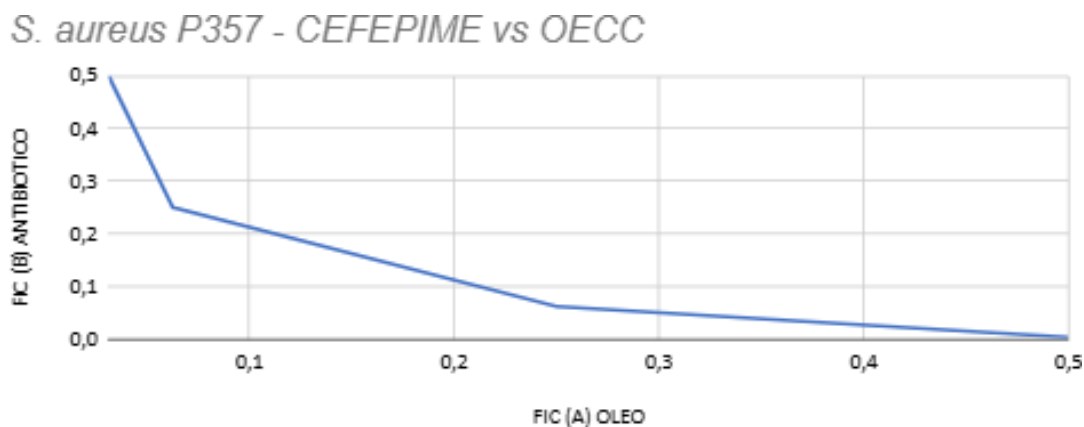
De forma complementar, outras espécies do gênero, como *Croton blanchetianus*, *C. grewoides* e *C. ceanothifolius*, também exibiram eficácia frente a bactérias multirresistentes, seja pela ação direta ou pela modulação da atividade de antibióticos (ALMEIDA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Tais achados sugerem que o gênero *Croton* representa uma importante fonte fitoterápica no enfrentamento da resistência bacteriana, com destaque para seu potencial sinérgico e capacidade de interferir na formação de biofilme.

Um estudo sobre o óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* revelou que os compostos majoritários incluem 1,8-cineol (46,32%), p-cimeno (10,21%) e trans-cariofileno (4,81%). O óleo apresentou atividade antibacteriana contra várias bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*, com CIM variando de 2,5 a 20 µL/mL. Além disso, o óleo afetou a viabilidade celular dessas bactérias, mostrando seu potencial terapêutico (SILVA *et al.*, 2015).

Tal como o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, que contém 1,8-cineol (eucaliptol) como principal componente, demonstrou atividade antibacteriana significativa contra diversas cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas resistentes, como as de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A ação antibacteriana do eucaliptol é atribuída à sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular das bactérias, facilitando a penetração de antibióticos e outros agentes antimicrobianos (LÓPEZ *et al.*, 2020). Em consonância com os dados, Nascimento e colaboradores (2018) em estudo sobre o óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus*, que contém p-cimeno e trans-cariofileno, encontrou atividade antimicrobiana contra diversas cepas de *Staphylococcus aureus*. Esse estudo sugere que os compostos presentes no óleo essencial, incluindo o p-cimeno e o cariofileno, podem contribuir para a ação antibacteriana.

A análise da redução da concentração inibitória mínima (CIM) demonstrou que a combinação dos antibióticos cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO) e ceftazidima (CAZ) com OECC promoveu uma significativa redução na CIM contra *Staphylococcus aureus*, como é possível observar no isoblograma da cepa *S. aureus* P357 (Figura 14).

Figura 14 - Isobolograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa P357 indicando sinergismo



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Em todas as cepas testadas, observou-se uma expressiva diminuição na concentração necessária para inibição bacteriana, com valores que variaram de 75% a 99,61%, indicando um efeito sinérgico considerável, conforme descrito na tabela 3. Os resultados demonstram que a combinação dos antibióticos com o óleo essencial resultou em uma redução significativa da CIM na maioria dos casos, indicando um efeito sinérgico. Esse sinergismo é evidenciado pelos valores de CIF, que estão majoritariamente abaixo de 0,5 que é um critério comumente aceito para indicar interação sinérgica entre compostos antimicrobianos.

A cepa ATCC 25923, considerada padrão de susceptibilidade, apresentou redução da CIM em até 96,44% quando a ceftriaxona (CRO) foi combinada com o óleo essencial, reforçando a potencial modulação do efeito antibiótico pelo OECC. De maneira semelhante, a cepa 33591 (MRSA) apresentou um alto grau de sinergismo, com reduções na CIM superiores a 99% para todas as combinações testadas. A cepa L16, que apresentou perfil de resistência intermediária, também demonstrou sinergismo para todas as combinações, com reduções na CIM superiores a 98%, sugerindo que o óleo essencial pode potencializar a atividade antibacteriana das cefalosporinas mesmo em isolados com resistência parcial. Para a cepa LL01, observou-se uma tendência semelhante, com uma redução significativa da CIM, atingindo 99,76% em algumas combinações. Já para a cepa P357, altamente resistente, a redução da CIM

atingiu valores superiores a 99%, indicando que o óleo essencial pode ter um papel relevante na reversão da resistência bacteriana. A cepa OXA01 apresentou o menor efeito sinérgico dentre as analisadas, com reduções de CIM entre 87,60% e 99,75%. Apesar disso, os valores de CIF indicam que o efeito da combinação ainda pode ser considerado sinérgico, o que sugere que, mesmo em isolados resistentes, a associação com o óleo essencial pode contribuir para melhorar a eficácia do tratamento antimicrobiano.

Esses resultados indicam que a associação com as cefalosporinas e o OECC aumenta consideravelmente a eficácia antimicrobiana, reduzindo a concentração necessária para inibição de *S. aureus*. Esse efeito sinérgico pode ser explicado pela modulação de vias metabólicas específicas, onde as substâncias se ajudam mutuamente a maximizar sua ação. Esses achados são consistentes com estudos anteriores, que também observaram interações positivas entre essas substâncias (SOUZA *et al.*, 2021; FARIAS *et al.*, 2021).

As implicações clínicas desses resultados são significativas, pois podem levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, utilizando combinações de compostos que, isoladamente, não alcançam o mesmo nível de eficácia. O efeito sinérgico observado em algumas combinações reforça o potencial de certos compostos naturais como adjuvantes na terapia antimicrobiana. No entanto, a ausência de sinergismo em outros casos destaca a complexidade das interações entre óleos essenciais e antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Na literatura, há relatos de estudos que corroboram os achados deste trabalho, bem como pesquisas que apontam para resultados distintos. Por exemplo, um estudo realizado com óleos essenciais de plantas da família *Lamiaceae* demonstrou um efeito sinérgico significativo quando combinados com antibióticos, resultando em uma redução expressiva da CIM de drogas como a oxacilina e a cefazolina (SILVA *et al.*, 2020). Da mesma forma, pesquisas envolvendo o óleo essencial de *Allium sativum* indicaram potencial sinérgico quando combinado com antibióticos como ceftriaxona, penicilina e vancomicina, aumentando sua eficácia contra *S. aureus* resistente (FERREIRA *et al.*, 2019).

Por outro lado, há relatos de estudos em que não foi observado sinergismo entre monoterpenos e antibióticos. Pesquisas realizadas com óleos essenciais de *Satureja montana*, *Cymbopogon nardus* e *Citrus limonia* mostraram que, apesar da atividade antimicrobiana individual, a combinação com antibióticos não resultou em efeito sinérgico significativo (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Outro estudo avaliando os óleos essenciais de "cravo", "canela", "orégano" e "alecrim" revelou que, embora esses compostos apresentem atividade

antibacteriana isolada, sua associação com antibióticos não levou à redução da CIM das drogas testadas (SANTOS *et al.*, 2021).

As discrepâncias entre os estudos podem ser atribuídas a diversos fatores, como a composição química dos óleos essenciais, diferenças nos métodos experimentais e o tipo de antibiótico utilizado (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; LIMA *et al.*, 2020). A presença de compostos específicos, como o carvacrol e o timol, tem sido associada ao sinergismo (ULTEE *et al.*, 2009), enquanto outros componentes podem não interagir da mesma forma com as drogas antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2021). Além disso, a variação nas cepas bacterianas testadas e nos protocolos experimentais pode influenciar significativamente os resultados (MOTA *et al.*, 2019).

Paralelamente aos resultados obtidos no presente estudo, Oliveira *et al.* (2023) demonstraram a atividade sinérgica do OECC em associação com os antibióticos oxacilina e ampicilina frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (MSSA e MRSA), com valores de CIFI variando entre 0,0938 e 0,3125 e redução da CIM de até 96,9%. Tais dados estão em consonância com os achados desta pesquisa, cujos valores de CIFI variaram entre 0,004 e 0,250, com redução da CIM entre 75% e 99,61% (Tabela 3), confirmando a presença de um efeito sinérgico.

Contudo, destaca-se que a principal inovação do presente trabalho reside na utilização de cepas clínicas isoladas de pacientes com infecção ativa, em contraste com o estudo de Oliveira *et al.*, que empregou cepas padrão. A inclusão de isolados clínicos confere maior relevância biológica e aplicabilidade clínica aos dados obtidos, uma vez que estas cepas frequentemente exibem mecanismos de resistência mais complexos, heterogeneidade genética e maior adaptabilidade frente a pressões seletivas, como o uso recorrente de antimicrobianos. Portanto, os resultados aqui apresentados não apenas confirmam o potencial do OECC como agente modulador da resistência antimicrobiana, como também ampliam a compreensão de sua eficácia frente a cepas com perfil clínico realista, reforçando sua aplicabilidade terapêutica no enfrentamento de infecções causadas por *S. aureus* multirresistentes.

Além desses estudos, uma pesquisa conduzida por Rodrigues *et al.* (2021) avaliou a combinação de monoterpenos, incluindo limoneno e geraniol, com antibióticos β -lactâmicos contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicaram que, embora os monoterpenos testados apresentassem atividade antimicrobiana isolada, suas combinações com antibióticos não resultaram em sinergismo significativo. Em alguns casos, observou-se até

mesmo um efeito antagônico, sugerindo que determinados compostos naturais podem interferir na ação dos antibióticos em vez de potencializá-la.

A ausência de sinergismo relatada nesses estudos reforça a complexidade das interações entre óleos essenciais e fármacos antimicrobianos. Diferentes fatores podem estar envolvidos nessa variabilidade, como a presença de compostos secundários nos extratos vegetais, que podem competir com os antibióticos por alvos bacterianos ou até mesmo alterar a permeabilidade da membrana celular de forma não favorável à ação antimicrobiana (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Esses achados ressaltam a importância de uma caracterização detalhada da composição química dos óleos essenciais e de testes padronizados para avaliar a viabilidade de seu uso como adjuvantes terapêuticos. Embora algumas combinações apresentem potencial clínico, outras podem não oferecer benefícios adicionais ou até comprometer a eficácia dos antibióticos. Assim, pesquisas futuras devem se concentrar na identificação dos mecanismos subjacentes a essas interações e na determinação das condições ideais para que o sinergismo, quando presente, possa ser explorado de maneira eficaz na prática clínica.

Embora os resultados obtidos demonstrem o potencial sinérgico, algumas limitações devem ser consideradas. Primeiramente, apesar da redução da CIM indicar uma interação favorável, o mecanismo de ação responsável por esse efeito sinérgico não foi elucidado. Entender se a atividade ocorre por alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, inibição de bombas de efluxo ou outro mecanismo específico seria fundamental para o direcionamento futuro da aplicação clínica. Outro aspecto relevante é que os ensaios realizados foram restritos a experimentos *in vitro*. Assim, não é possível garantir que os mesmos efeitos observados em condições controladas de laboratório se repitam em sistemas biológicos complexos, onde fatores como metabolismo, biodisponibilidade e possíveis interações com tecidos humanos podem interferir nos resultados. Adicionalmente, o estudo foi conduzido com um número limitado de cepas clínicas. Embora as cepas selecionadas representem isolados resistentes de interesse, a diversidade genética do MRSA é extensa, o que limita a generalização dos achados para todas as variantes circulantes em diferentes ambientes hospitalares e comunitários.

Por fim, deve-se considerar a estabilidade do óleo essencial durante os experimentos. Componentes voláteis presentes nos óleos podem sofrer degradação ou evaporação durante o período de incubação, o que pode impactar a real atividade antimicrobiana observada. Assim, a padronização das condições de armazenamento e manuseio dos óleos é essencial para garantir

a reprodutibilidade dos resultados (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012; BASSOLÉ; JULIANI, 2012; PEREIRA *et al.*, 2020).

5.4 Citotoxicidade do OECC em hemácias de carneiro

A avaliação da citotoxicidade do OECC sobre hemácias de carneiro demonstrou que o OECC apresentou atividade hemolítica apenas nas concentrações mais elevadas. Como pode ser observado na Tabela 4, a partir da concentração de 256 µg/mL, observou-se um aumento progressivo da hemólise, com destaque para a concentração de 1024 µg/mL, que resultou em uma atividade hemolítica de $18,9 \pm 0,5\%$. Por outro lado, concentrações iguais ou inferiores a 128 µg/mL não apresentaram efeitos hemolíticos detectáveis, indicando um perfil de segurança considerável em faixas de concentração mais baixas.

Tabela 4 – Atividade hemolítica do óleo essencial de *Croton conduplicatus* (OECC) em hemácias de carneiro desfibrinado, em diferentes concentrações.

Concentrações de OECC (µg/mL)	Atividade hemolítica em sangue de carneiro desfibrinado (%)
1024	$18,9 \pm 0,5$
512	$7,1 \pm 0,9$
256	$3,5 \pm 0,5$
128	0,0
64	0,0
32	0,0
16	0,0
8	0,0
4	0,0
2	0,0
Diluyente Tween/DMSO/Água (0,2/0,3/0,7 mL)	$1,0 \pm 0,5$

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Esses dados sugerem que o OECC possui baixa toxicidade sobre células eritrocitárias quando utilizado em concentrações compatíveis com testes microbiológicos ou terapêuticos. A ausência de hemólise nas concentrações de 128 µg/mL ou inferiores é particularmente relevante, uma vez que essas faixas geralmente compreendem as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para diversos microrganismos. Portanto, os resultados indicam uma margem terapêutica aceitável, especialmente quando considerado o uso potencial do OECC como agente antimicrobiano (SANTOS *et al.*, 2013).

Além disso, o controle (Tween/DMSO/água – 0,2/0,3/0,7 mL) apresentou atividade hemolítica de apenas $1,0 \pm 0,5\%$, o que demonstra que o veículo utilizado não interferiu significativamente no resultado, validando a observação de baixa toxicidade atribuída ao próprio óleo.

Complementarmente, a composição química do OECC é caracterizada pela presença de compostos como o (E)-cariofileno e o óxido de cariofileno, associados a propriedades anti-inflamatórias e baixa toxicidade (VENÂNCIO *et al.*, 2021). Esses constituintes podem contribuir para o perfil de segurança observado, inclusive no modelo hemolítico.

Portanto, os resultados obtidos corroboram achados anteriores e reforçam o potencial do OECC como um candidato seguro para formulações antimicrobianas, respeitando os limites de toxicidade celular, principalmente em aplicações tópicas ou em sistemas com barreiras biológicas.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o OECC apresentou atividade antimicrobiana moderada quando avaliado isoladamente. No entanto, o enfoque está no efeito sinérgico significativo da associação do óleo com as cefalosporinas (cefepime, ceftriaxona e ceftazidima), potencializando a atividade desses antibióticos contra cepas de *S. aureus*, incluindo isolados clínicos MRSA. Os dados revelaram uma expressiva redução na CIM dos antibióticos. A análise do CIFI com valores majoritariamente abaixo de 0,5, corroborou esse sinergismo, confirmando o potencializador adjuvante e permitindo a utilização de concentrações menores, o que pode ser crucial no tratamento de infecções resistentes. Além disso, a associação de compostos bioativos presentes no OECC com cefalosporinas reforça sua aplicabilidade clínica no combate à resistência bacteriana, destacando seu potencial não só na inibição do crescimento bacteriano, mas também na modulação da formação de biofilmes, um fator crucial para a virulência de patógenos como *S. aureus*.

Os resultados obtidos estão em consonância com estudos anteriores, que também observaram o efeito sinérgico do OECC, é importante considerar a heterogeneidade das cepas bacterianas e a complexidade das interações entre os óleos essenciais e antibióticos. Enquanto alguns óleos essenciais podem não apresentar sinergismo, outros, como o OECC, se mostram promissores no desenvolvimento de terapias mais eficazes contra infecções bacterianas resistentes. Esses dados reforçam a importância da pesquisa contínua sobre o uso de compostos naturais como adjuvantes no tratamento de doenças infecciosas, com ênfase na caracterização detalhada da composição química e nas condições ideais para explorar plenamente o potencial terapêutico desses agentes.

Considerando os resultados promissores, os próximos passos incluem a realização de estudos adicionais para elucidar o mecanismo de ação responsável pela interação sinérgica entre OECC e as cefalosporinas. Estudos *in vivo* também são fundamentais para avaliar a eficácia, biodisponibilidade e possíveis efeitos adversos da associação em organismos completos. Com relação a citotoxicidade, foi identificada uma baixa atividade hemolítica indicando perfil seguro para uso biológico, testes envolvendo um número maior e geneticamente diverso de cepas de MRSA podem contribuir para validar a aplicabilidade clínica dos achados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Estudo fitoquímico e potencial farmacológico do gênero *Croton*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 2, p. 215-230, 2022.
- ALMEIDA, R. R. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Croton blanchetianus* leaves. **Current Topics in Chemistry & Biochemistry**, v. 6, p. 71–78, 2022.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Potencialidades fitoquímicas de espécies do gênero *Croton* na Caatinga. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 24, n. 2, p. 123–135, 2022.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). **About ATCC: Standards for Research and Development**. 2024. Disponível em: <https://www.atcc.org/about-us>. Acesso em: 29 abr. 2025.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.
- BARBOSA, L. M. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Croton* contra bactérias multirresistentes. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 17, n. 4, p. 512-520, 2023.
- BERTOLUCCI, M. R. et al. Genetic variability in bacterial resistance and mechanisms of resistance to antibiotics. **Microbial Pathogenesis**, 2017.
- BRCAST – **Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos**. Tabela de concentração química de rotina e estendida. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019. v. 1. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/volume-1-fb6.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2025.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta: U.S. **Department of Health and Human Services**, CDC, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2025
- COSTA, R. P. et al. Efeito sinérgico de óleos essenciais de *Croton* com antibióticos contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 289–305, 2022.

- COSTA, R. P. et al. Seasonal variation in the chemical composition of *Eugenia uniflora* essential oil and its antimicrobial activity. **Journal of Essential Oil Research**, 2012.
- COSGROVE, S. E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E. N.; SCHWABER, M. J.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 53–59, 2003.
- DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616–687, 2010.
- EUCAST – **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2023. Disponível em: <https://www.eucast.org>. Acesso em: 8 mar. 2025.
- FENG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Z. Molecular epidemiology and genetic evolution of *Staphylococcus aureus* and its impact on antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 839867, 2022.
- FENG, Y. et al. Genetic evolution and resistance profiles of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbial Resistance**, v. 58, p. 123–134, 2022.
- FERREIRA, M. G. et al. Propriedades anticancerígenas de compostos isolados do gênero *Croton*. **Phytomedicine Research**, v. 33, n. 4, p. 245–260, 2019.
- GIBSON, D. L. et al. Role of bacterial membrane permeability in antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2001.
- GOOGLE MAPS. Localização do município de Irecê - BA. Disponível em: <https://www.google.com/maps/place/Irecê+-+BA>. Acesso em: 23 abr. 2025.
- HAMADA, M. et al. Influence of environmental conditions on antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2011.
- HELANDER, I. M.; HILPONEN, P.; KOSKI, P.; LINDSTROM, M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.
- JUNIOR, R. S. et al. Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de agentes antimicrobianos. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 4, p. 940–945, 2023.
- LAGO, R. P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Eugenia uniflora* leaf essential oil. **Natural Product Research**, 2010.
- LEE, K. et al. Cellular mechanisms of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, 2017.
- LEGER, D. et al. Mechanisms of bacterial resistance and their influence on the effectiveness of antibiotics. **Clinical Microbiology and Infection**, 2005.

LIMA, A. S.; OLIVEIRA, D. L.; MELO, R. S. Métodos de avaliação da interação entre antimicrobianos: aplicações clínicas e laboratoriais. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 445–452, 2018.

LIMA, B.; OLIVEIRA, F.; ROCHA, D. Synergistic antibacterial activity of monoterpenes and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 80, p. 153363, 2021.

LIMA, C. S. et al. Uso tradicional e potencial terapêutico de *Croton* na medicina popular. **Planta Medica**, v. 85, n. 6, p. 471–485, 2019.

LIMA, S. et al. Antimicrobial synergism of plant-derived compounds with antibiotics against resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 35, p. 905–915, 2021.

LIMA, M. C. et al. Chemical composition and synergistic effects of essential oils on antimicrobial activity: a review. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 22, p. 1–10, 2020.

LIMA, V. N. et al. Uso tradicional e atividade biológica de espécies do gênero *Croton*. **Ethnopharmacology Journal**, v. 19, n. 2, p. 78–95, 2019.

LORIAN, V. Antibiotics in Laboratory Medicine. 5. ed. **France: Lippincott Williams & Wilkins**, 832 p., 2005.

LÓPEZ, M. E.; LÓPEZ, S. R.; MARTÍNEZ, A. L. *Antibacterial activity of *Eucalyptus* essential oil against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 1073–1080, 2020.

MA, L. et al. Biofilm formation and resistance mechanisms in bacteria. **Microbial Biofilms**, 2014.

MARTINS, A. et al. Chemical profiling of essential oils from *Croton conduplicatus* and their antimicrobial activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, p. 412–421, 2022.

MARTINS, C.; SILVA, D.; RODRIGUES, A. Application of GC-MS analysis in the discovery of antimicrobial compounds from medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 16, n. 5, p. 73–83, 2022.

MARTINS, D. L. et al. Mecanismo de ação dos óleos essenciais de *Croton* sobre membranas bacterianas. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 61, n. 5, p. 310–325, 2023.

MEDEIROS, M. F. Interação entre antibióticos e compostos naturais no controle de patógenos resistentes. **Revista de Biociências**, v. 8, n. 2, p. 120–132, 2012.

MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A.; BROCK, T. D. **Microbiologia de Brock**. 15. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

MENDES, A. L. et al. Atividade antiespasmódica de *Croton bonplandianus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112–120, 2020.

MENDES, T. A. et al. Efeitos antiespasmódicos de extratos de *Croton bonplandianus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 30, n. 1, p. 15–28, 2020.

MERGHNI, A.; BELMAMOUN, A. R.; URCAN, A. C.; BOBIȘ, O.; LASSOUED, M. A. 1,8-Cineol (Eucalyptol) Disrupts Membrane Integrity and Induces Oxidative Stress in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antioxidants (Basel)**, Basel, v. 12, n. 7, p. 1388, 06 jul. 2023.

MESTRA, M. H. P.; MORAES, G. F. Q.; SANTOS, G. M.; ANDRADE JÚNIOR, F. P.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O. Synergistic antibacterial activity of monoterpenes in combination with conventional antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 2, p. 258–264, 2020.

MOTA, M. L. et al. Synergistic interactions between natural products and antibiotics against resistant bacteria: a review. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 10, p. 1–16, 2019.

MURPHY, James T. Diagram of the two principal antibiotic resistance mechanisms observed in MRSA bacteria. **ResearchGate**, 2011.

NAFIS, A.; KUMAR, S.; PATEL, H. Synergistic effects of essential oils and antibiotics against multi-drug resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Research**, v. 7, n. 1, p. 30–45, 2019.

NASCIMENTO, T. R.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, P. C. Antibacterial potential of *Pimenta pseudocaryophyllus* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 165–171, 2018.

OLIVEIRA, D. L. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em combinação com antibióticos: uma abordagem sinérgica. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 5, p. 402–407, 2012.

OLIVEIRA, G. D. de et al. Synergistic and antibiofilm effects of the essential oil from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 16, n. 1, p. 55, 2023.

OLIVEIRA, W. A. et al. Modulatory activity of *Croton ceanothifolius* essential oil against multidrug-resistant bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, Art. ID 4723805, 2019.

OLIVEIRA-JÚNIOR, M. C. et al. Composição química do óleo essencial de *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) coletado em Petrolina, Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 640–646, 2021.

OWLIA, M. et al. Antistreptococcal activity of *Matricaria chamomilla* essential oil. **Phytotherapy Research**, 2007.

PATEL, G.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases in the 21st century: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 440–458, 2015.

PEREIRA, P.S. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance of MRSA in healthcare settings: **A challenge for infection control**. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2054, 2020.

PRAZAK, A. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: The role of *mecA* gene and beta-lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, p. e00935-20, 2020.

PROBST, I. S. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. Dissertação (Mestrado) — **Universidade Estadual Paulista**, 2012.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

ROCHA, W. R. V. et al. Antimicrobial screening and hemolytic activity of products obtained from *Piper montealegreanum* Yuncker and effect in vitro on growth of *Staphylococcus aureus*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e346997410, 2020.

RODRIGUES, C. P. et al. Atividade larvicida e antifúngica de *Croton bonplandianus*. **Revista de Ciências Biológicas e Saúde**, v. 14, n. 3, p. 112–126, 2021.

RODRIGUES, M. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and its contribution to antibiotic resistance. **Microbiology and Pathology**, v. 67, p. 131–140, 2020.

RODRIGUES, M. et al. Evaluation of the antimicrobial potential of *Croton conduplicatus* essential oils against resistant bacterial strains. **Natural Product Research**, v. 35, p. 988–997, 2021.

RODRIGUES, M.; SOUZA, G.; SANTOS, A. Phytochemicals as potential therapeutic agents against resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 180, 2021.

ROZATTO, G. M. Synergistic effects of natural products with antibiotics in the treatment of multi-drug resistant bacterial infections. **Antimicrobial Agents Journal**, v. 26, p. 184-190, 2012.

ROZATTO, M. Uso de métodos microbiológicos para avaliação da interação entre fármacos antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 6, n. 1, p. 55-68, 2012.

SANTOS, E. M. et al. Composição química e bioatividade de espécies do gênero *Croton*. **Phytochemistry Reviews**, 19(3), 567-580, 2020.

SANTOS, A. O. et al. Hemolytic activity of essential oils from medicinal plants: a comparative study using human erythrocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 915–922, 2013.

SANTOS, A. O. et al. Antibacterial activity of 1,8-cineole and its synergy with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2697, 2021.

SALGADO, C. D.; FARR, B. M.; CALFEE, D. P. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. 131–139, 2003.

- SILVA, A. S. et al. Propriedades farmacológicas de óleos essenciais: uma revisão. **Journal of Medicinal Plant Research**, 4(6), 409-415, 2010.
- SILVA, M. R.; LIMA, J. A.; COSTA, L. E. Antibacterial activity of the essential oil of *Croton rhamnifolioides* (Pax & Hoffm.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 3, p. 161-168, 2015.
- SILVA, R. S. et al. Distribuição geográfica e diversidade de *Croton* no Nordeste brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 35, n. 4, p. 410-423, 2021.
- SILVA, T. et al. Synergy of essential oils and antibiotics in the treatment of multi-resistant bacterial infections. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 12, p. 231-238, 2023.
- SILVA, T. R.; FERREIRA, G. P.; COSTA, H. M. Método Checkerboard e sua aplicabilidade na análise de combinações antimicrobianas. **Microbial Research Journal**, v. 15, n. 4, p. 221-235, 2020.
- SILVA, G. F. et al. Antimicrobial properties of *Caryophyllus aromaticus* essential oil against *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010.
- SILVA, K. B. da; MELLO, P. L. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de hortelã pimenta (*Mentha piperita*), hortelã japonesa (*Mentha arvensis*) e manjerição (*Ocimum basilicum*) frente a cepas ATCC de *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde - UNG-Ser**, 15(3/4), 17-22, 2021.
- SILVA, L. A. *et al.* Chemical composition and antibacterial potential of *Croton grewoides* essential oil and its synergistic interaction with antibiotics. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 4, n. 4, p. 39, 2021.
- SILVA, J. R. et al. **Potencial de formulações de monoterpenos como bioinseticidas naturais**. 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Monoterpenos-presentes-no-oleo-de-terebintina-e-dipenteno_fig2_360480279. Acesso em: 13 abr. 2025.
- SIEGEL, J. D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L.; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2007.
- SOUZA, F. C. et al. Efeito sinérgico de óleos essenciais de *Croton* na inibição de bactérias resistentes. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10(1), 105-115, 2021.
- SOUZA, L. M. et al. Interação de óleos essenciais de *Croton* com antibióticos: um estudo de sinergismo. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 2, p. 99-112, 2021.
- TENOVER, F. C., TICKLER, I. A, PERSING, D. H. Antimicrobial-resistant strains: characterization and clinical impact. **Future Microbiology**, 2012.
- TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28(3), p. 603-661, 2015.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

UNLU, A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cinnamomum verum* bark essential oil. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 926-930, 2009.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606–4610, 1999. ssential oil. **Food Chemistry**, 2009.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Plant-based antimicrobial interactions: from traditional practice to scientific investigation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 1-9, 2011.

VENÂNCIO, V. F. et al. Quimiodiversidade do óleo essencial de três espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) da Caatinga brasileira. **Semantics Scholar**, 2021.

WHITE, R. L. et al. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, 1996.

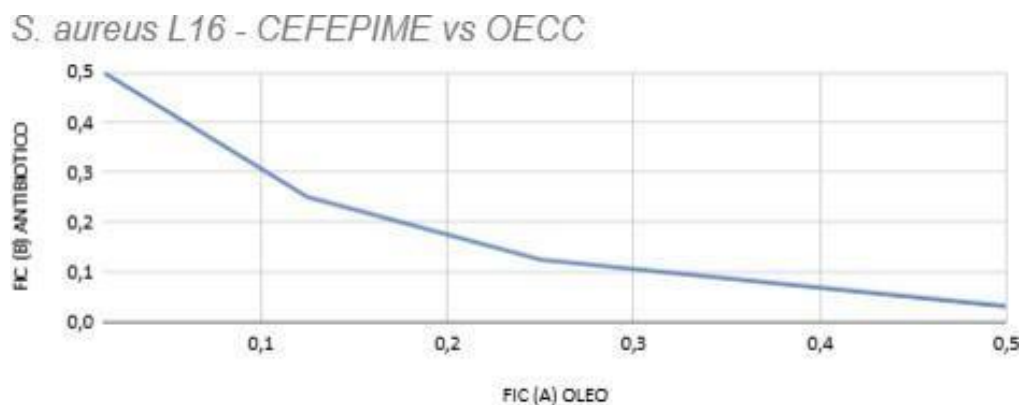
WHITE, R. L.; BURST, C. J.; BOSSO, J. A. Effects of antimicrobials combinations: the checkerboard method revisited. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2595-2601, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, 2017.

ZHANG, H. et al. Global spread and clinical implications of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. e00145-21, 2021.

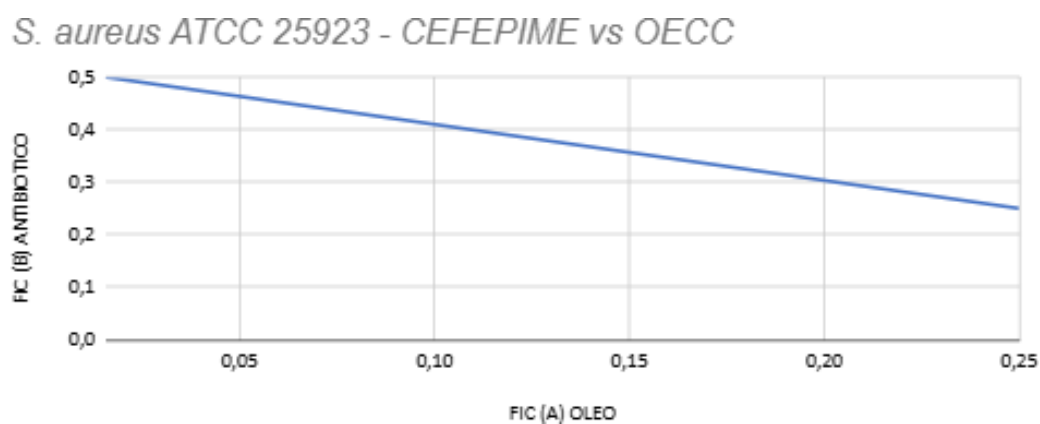
APÊNDICE A - ISOBOLOGRAMAS DAS COMBINAÇÕES DE OECC COM ANTIBIÓTICOS FRENTE A CEPAS DE *S. aureus*

Figura 15 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa *S. aureus* L16 indicando sinergismo



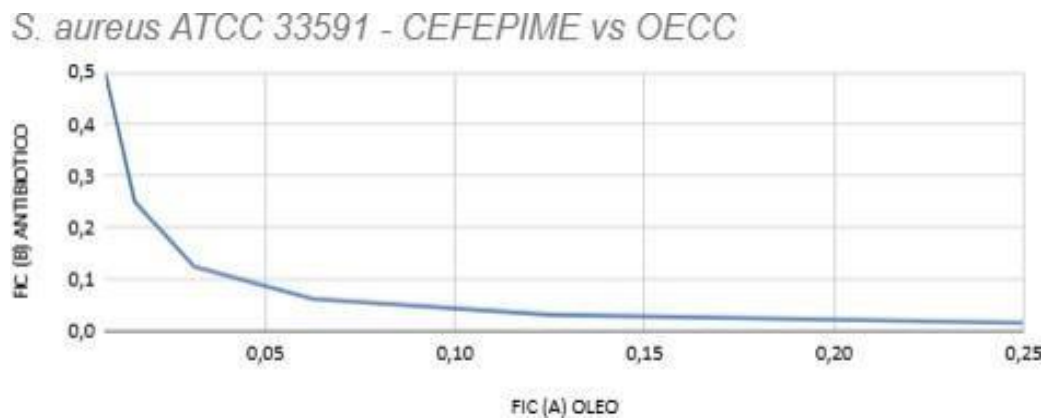
Fonte: Elaborado pela autora, 2025. (2025)

Figura 16 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa *S. aureus* ATCC 25923 indicando sinergismo



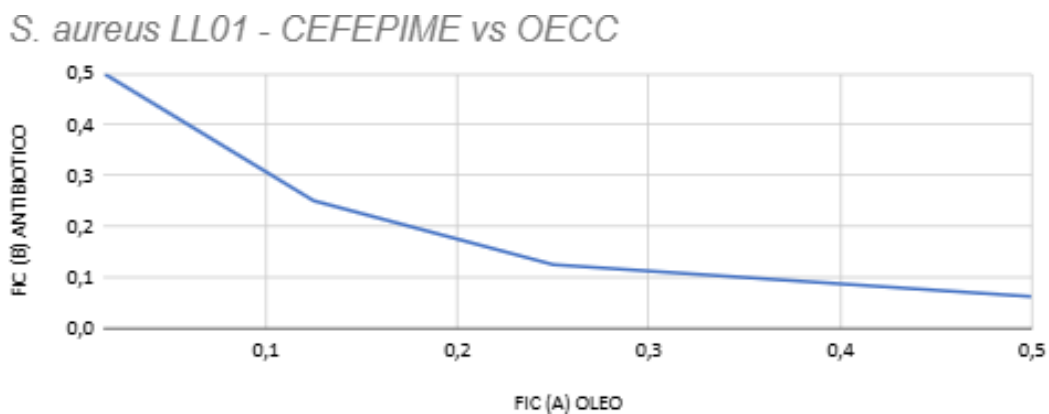
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 17 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa *S. aureus* ATCC 33591 indicando sinergismo



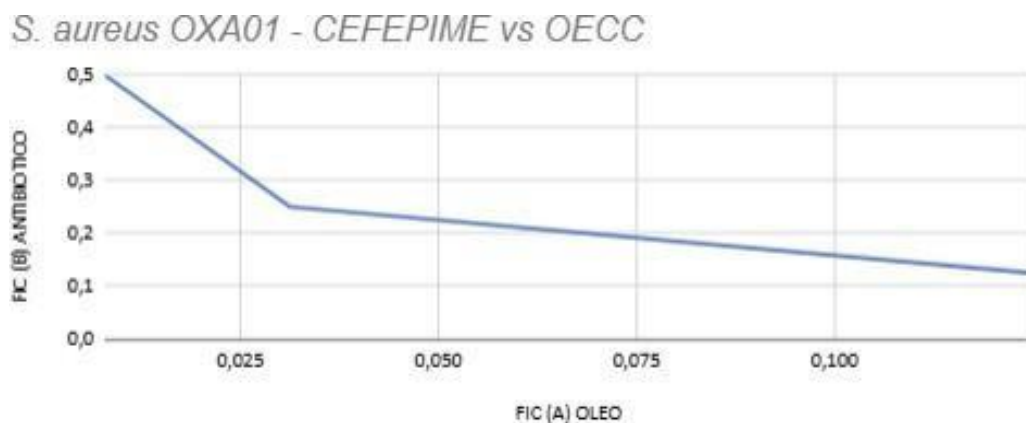
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 18 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa *S. aureus* LL01 indicando sinergismo



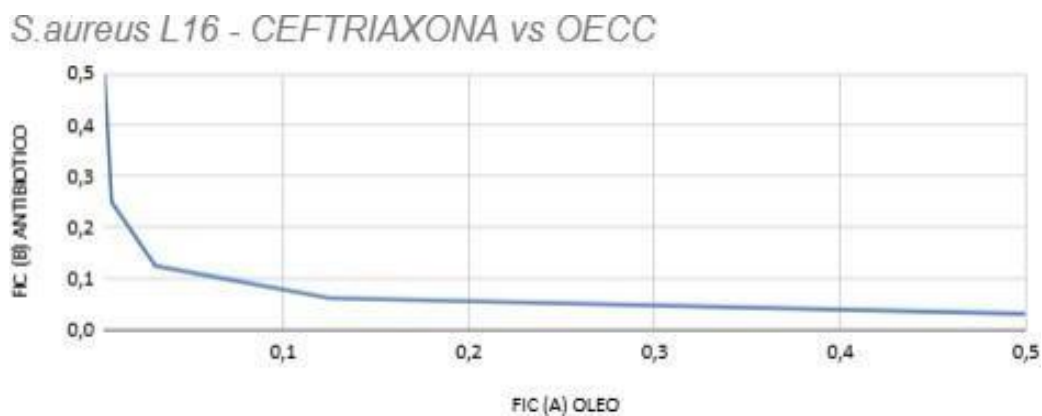
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 19 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa *S. aureus* OXA01 indicando sinergismo



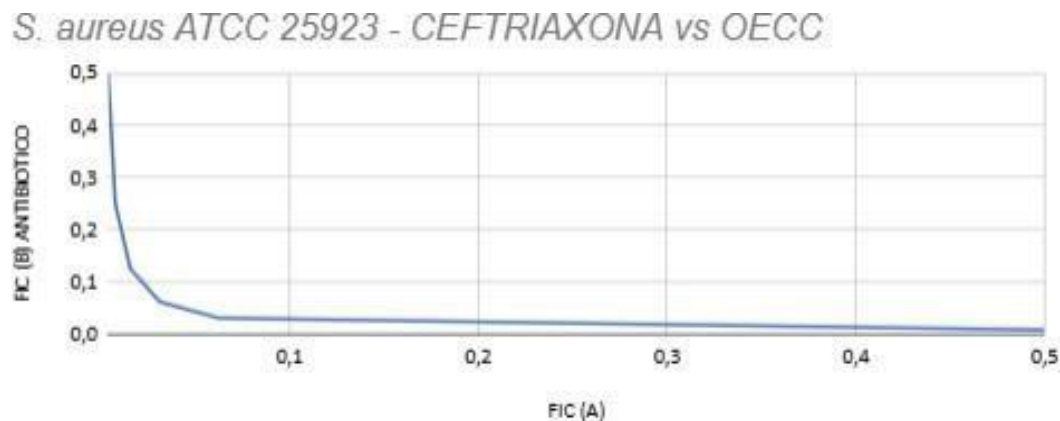
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 20 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa *S. aureus* L16 indicando sinergismo



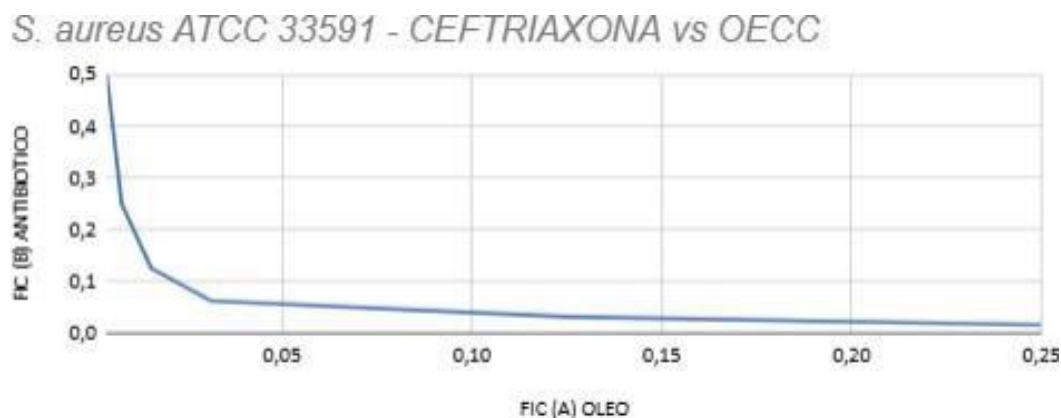
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 21 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa *S. aureus* ATCC 25923 indicando sinergismo



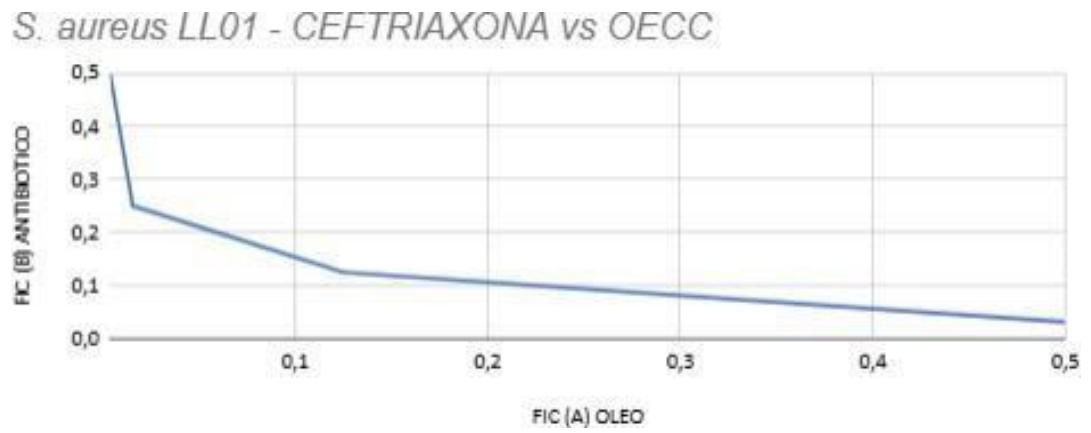
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 22 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa *S. aureus* ATCC 33591 indicando sinergismo



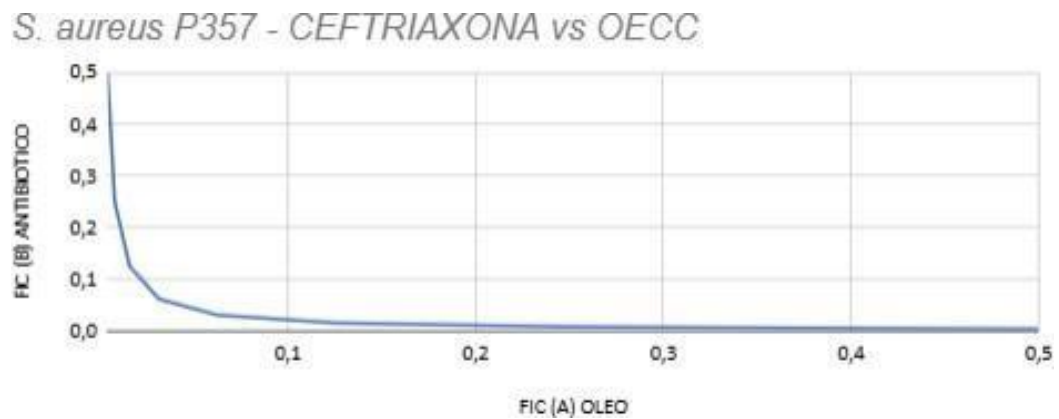
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 23 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa *S. aureus* LL01 indicando sinergismo



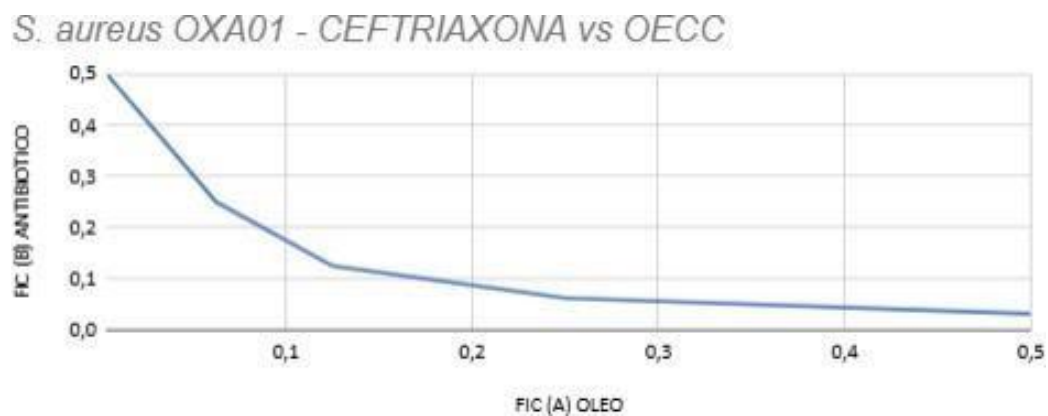
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 24 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa *S. aureus* P357 indicando sinergismo



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 25 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftriaxona diante da cepa *S. aureus* OXA01 indicando sinergismo



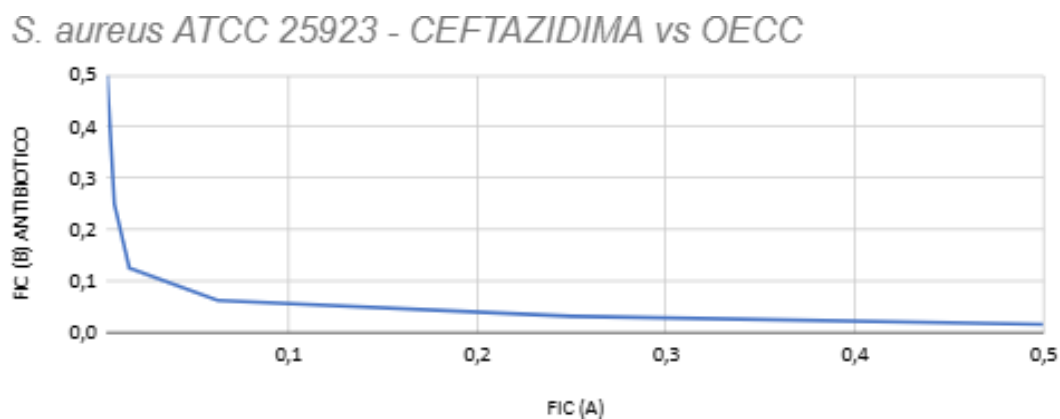
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 26 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa *S. aureus* L16 indicando sinergismo



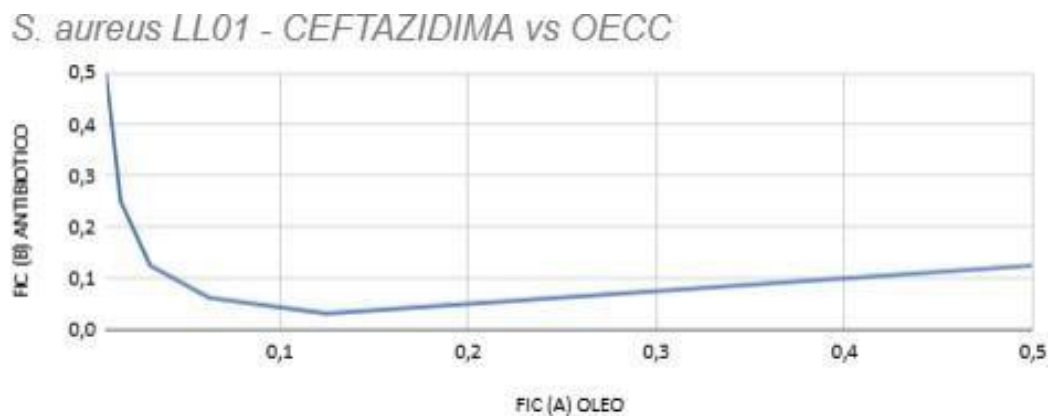
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 27 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa *S. aureus* ATCC 25923 indicando sinergismo



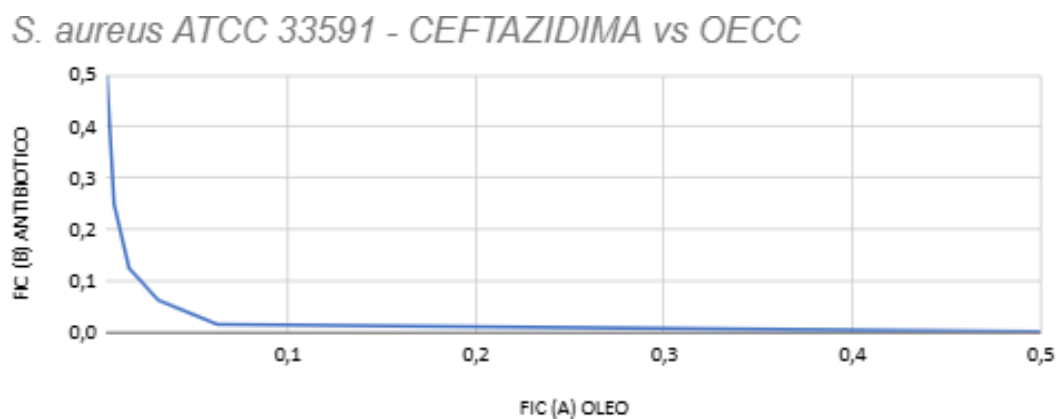
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 28 - Isoblograma da combinação do OECC com cefepime diante da cepa *S. aureus* LL01 indicando sinergismo



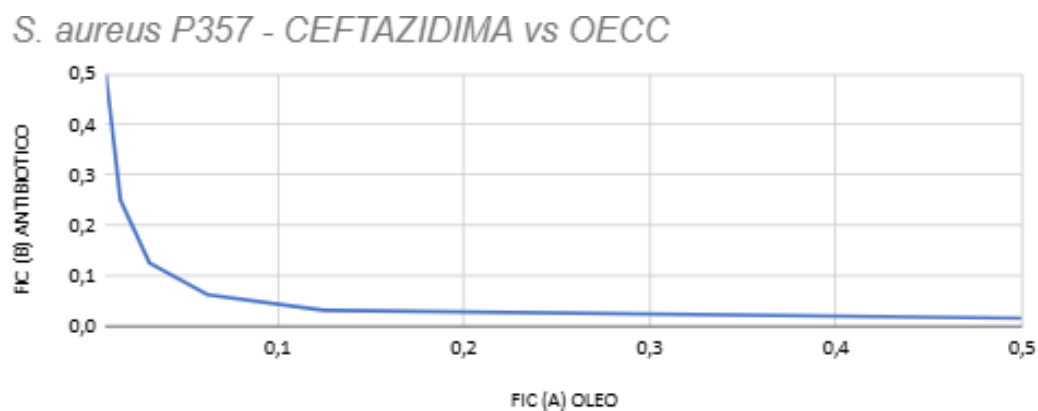
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 29 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa *S. aureus* ATCC 33591 indicando sinergismo



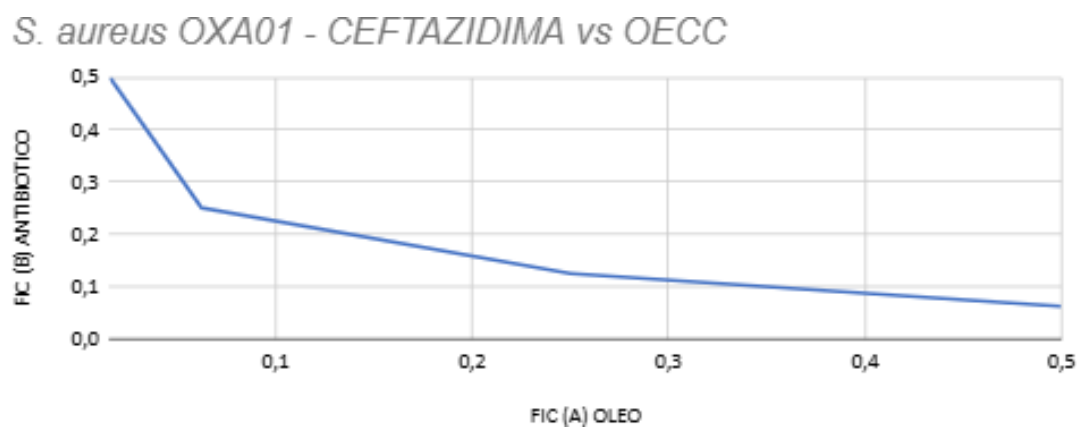
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 30 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa *S. aureus* P357 indicando sinergismo



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 31 - Isoblograma da combinação do OECC com ceftazidima diante da cepa *S. aureus* OXA01 indicando sinergismo



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.