



AValiação DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO Óleo ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* E SEU EFEITO SINéRGICO COM O CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE *S. aureus* e *E.coli*.

ADRIANO FAVERO; FAGNER LUIZ DA COSTA FREITAS; MAURICIO TURKIEWCZ;
ALEXANDRE MALLER; RITA DE CÁSSIA GARCIA SIMÃO

RESUMO

As plantas possuem metabólitos secundários atuando como um sistema de defesa e podem ser extraídos na forma de óleos essenciais, apresentando frequentemente capacidades antimicrobianas. Simultaneamente à descoberta de novos compostos antimicrobianos, existe uma busca de novas estratégias para tratamento de infecções, principalmente de cepas resistentes a antimicrobianos de referência. O uso combinado de antimicrobianos utilizados na clínica com fitoterápicos buscando efeitos sinérgicos tem se mostrado uma estratégia promissora frente ao desenvolvimento de resistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e investigar o seu potencial efeito sinérgico com o ciprofloxacino contra cepas bacterianas padrão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação do potencial antibiótico demonstrou que as cepas testadas são sensíveis ao óleo essencial de Melaleuca e o ciprofloxacino, demonstrando um amplo espectro de ação antibacteriano do óleo essencial frente a cepas gram-positivas e gram-negativas. A concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento das cepas testadas variou entre 0,21-0,50% (1872-4495 µg/mL), 0,35% em média para o óleo essencial de Melaleuca e 0,001-0,012% (10-120 µg/mL), 0,0044% em média para o ciprofloxacino. O ensaio de checkerboard demonstrou um efeito sinérgico entre todas as associações avaliadas, com concentrações inibitórias efetivas de 0,03-0,125% (5,8 a 8,3 vezes inferiores) para o óleo essencial de Melaleuca e 0,00015-0,0003% (8 a 20 vezes inferiores) para o ciprofloxacino. Os resultados indicam que, além do potencial antimicrobiano do óleo essencial de melaleuca, o mesmo pode ser utilizado como adjuvante no tratamento de infecções bacterianas possibilitando uma diminuição efetiva da dose do antimicrobiano de uso clínico, aumentando o número de alvos terapêuticos e consequentemente uma diminuição nas chances de obtenção de resistência pelo microrganismo.

Palavras-chave: Sinergismo; Antibacteriano; Resistência Antimicrobiana.

1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma variedade de compostos que apresentam atividade biológica e são empregadas para o desenvolvimento de medicamentos, representando uma importante fonte para pesquisa de antimicrobianos. Esses compostos, geralmente, são oriundos do metabolismo secundário das plantas e incluem alcalóides, flavonóides, ligninas compostas fenólicas e terpenóides (Saleem et al., 2010).

O advento dos antimicrobianos foi uma revolução na medicina, a sua capacidade de inibir o crescimento ou eliminar microrganismos causadores de doenças infecciosas, que eram

grandes causa de morbidade e mortalidade em todo mundo (Furtado *et al.*, 2019). Mas o uso indiscriminado dos mesmos, tem contribuído para a emergência e disseminação de microrganismos resistentes (RAM) e multirresistentes (MMR) a antimicrobianos e tem se tornado uma das maiores ameaças a saúde global com imenso impacto clínico e econômico devido ao fato das restritas opções terapêuticas (Shriram *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2020). Para tratar dessa grande demanda, tem se buscado estratégias e a combinação de antimicrobianos tem se tornado uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes. Os óleos essenciais (OEs), muitas vezes contem metabólitos secundários com capacidade antibacteriana, sendo capazes de inibir ou eliminar esses microrganismos. A grande diversidade dessas biomoléculas pode proporcionar interações entre os antimicrobianos de uso convencional e os óleos essenciais resultando em interações, por vezes, sinérgicas na ação do fármaco (Aiyegoro *et al.*, 2011). Essa interação medicamentos tem se mostrado uma estratégia promissora e quando benéfica pode auxiliar no tratamento, reduzir os efeitos adversos no paciente, prolongar o efeito do antimicrobiano convencional, diminuição da dose, impedir ou diminuir a aquisição de resistência bacteriana, aumentar ou restaurar a eficácia de cepas resistentes (Cordeiro *et al.*, 2005; Chouhan *et al.*, 2017).

A *Melaleuca alternifolia* é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, conhecida, popularmente, como árvore do chá. O óleo essencial de melaleuca (OEM) contém aproximadamente 97 compostos, que constituem uma diversidade de substâncias voláteis principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes, como terpinen-4-ol, γ - and α -terpineno, α -terpinenol e 1-8 cineol (Flora do Brasil, 2020). O composto antibacteriano principal é o terpinen-4-ol, responsável por causar a lise da parede celular bacteriana, o perda de material nuclear e inibição da respiração dependente de glicose (Cox *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 2002; Iseppi *et al.*, 2023).

O objetivo desse estudo foi fornecer informações relacionadas tanto ao potencial antibacteriano do OEM, quanto ao efeito sinérgico do mesmo em combinação com o antibiótico ciprofloxacino contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEM)

Foi utilizado OEM comercial (Laszlo, Brasil) composto por Terpinen-4-ol (41,07%), γ - Terpineno (26,61%) e α -Terpinene (11,72%) e com densidade relativa de 0,8989, atendendo aos critérios estabelecidos pela ISO 4730 para a comercialização do OEM.

2.2 Ensaios Antimicrobianos

2.2.1 Culturas e microrganismo

Foram utilizadas cepas padrões de *Staphylococcus aureus* NP0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* B24 e *Staphylococcus aureus* NP 0038) e *Escherichia coli* NP 0022, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* LB 25922), provenientes do Laboratório de Pesquisa NB2 da Universidade Federal da Fronteira Sul.

2.2.2 Padronização do inóculo

Os microrganismos precisam atingir fase de crescimento apropriado e um número padronizado de células precisa ser utilizado para garantir a homogeneidade do processo (Kalemba e Kunicka, 2003). As culturas estocadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) glicerinado foram reativadas e enriquecidas em BHI, sendo padronizadas para turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

2.3 Determinação da Concentração Inibitória (CIM) e Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços preconizado pelo CLSI (2020). Em suma, foram adicionados 100µL de BHI estéril em todos os 96 poços. Após, diluições seriadas foram realizadas a partir da segunda coluna, onde foi adicionado e 100µL da solução estoque do OEM (1%) ou CIP (0,25%), da primeira linha (A) até a última linha (H). A partir da segunda coluna foi realizada a diluição seriada de forma que cada poço subsequente a direita em cada linha contenha metade da concentração do composto a ser testado que o poço anterior. Após diluição seriada, 10 µL do inóculo padronizado foi dispensado em cada poço nas colunas de 1 até 11. A primeira coluna da placa (1), foi considerada o controle positivo, possuindo apenas o BHI e o inóculo. A última coluna (12) é os controles negativo possuindo apenas o BHI. Foi avaliada a densidade óptica (D.O.) em espectrofotometro a 625nm para obtenção da absorbância inicial. Após seladas, as placas foram para a estufa 36°C/24h com posterior também a D.O 625nm.

A CIM foi representada pela concentração de OEM/CIP utilizada que inibiu o crescimento da bactéria, a diferença de absorbância da segunda para a primeira leitura indica o crescimento. Para uma comprovação da CIM foi utilizado 20µL da substancia reveladora resazurina, um marcador de metabolismo bacteriano, em todos os poços e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Quando a resazurina (roxo) não foi reduzida a resorufina (rosa) ficou constatado o efeito inibitório e quando o corante sofreu modificação para a cor rosa, indicou uma reação da óxido-redução evidenciando a viabilidade celular (Salvat *et al.*, 2001; Salles, 2014).

A CBM é definida como a menor concentração do composto capaz de inviabilizar 99,99% da população microbiana inicial, sendo determinada a partir dos poços onde não foram observados crescimento. Aliquotas com 10µL foram semeadas em placas ágar Mueller-Hinton (AMH) seguido de incubação a 36°C/24h. Posteriormente, foram enumeradas as unidades formadoras de colônias (UFC). O não crescimento indica atividade bactericida e o crescimento atividade bacteriostática na concentração testada.

2.4 Ensaio da associação do OEM com CIP (Método Checkerboard) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

A expressão *Checkerboard*, refere-se a testar múltiplas diluições com dois compostos em diversas concentrações abaixo ou acima da CIM para os microrganismos testados. O *Checkerboard* consiste de colunas contendo uma dosagem da **droga A** diluídas seriadamente ao longo do eixo-x, e linhas contendo a **droga B** diluídas seriadamente ao longo do eixo-y (Lorian, 2005). Com base nos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções dos agentes antimicrobianos em concentrações subinibitórias as quais variaram de 1/2 a 1/256 da CIM do OEM e de 1/2 a 1/4096 da CIM para o CIP. Foram depositados 90µL de caldo BHI em cada poço da microplaca estéril de 96 poços. Posteriormente, cada uma das diluições desses agentes antimicrobianos foi depositada 100µL na microplaca na forma de diluição seriada: o OEM na orientação vertical (1 a 12) e o CIP na orientação horizontal (A a H). Em seguida, 10µL da suspensão bacteriana padronizada em todos os poços da microplaca. Assim como no CIM, a absorbância foi medida a D.O. de 625nm antes e depois de ir a estufa a 36°C/24h e a resazurina foi utilizada como teste adicional. Os critérios de interpretação para a associação entre os antimicrobianos de uso convencional e os óleos essenciais foram obtidos a partir do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) que pode ser alcançado de acordo com as equações (Eq1):

$$ICIF = \frac{(CIM - OEM \& CIP)}{(CIM - OEM)} + \frac{(CIM - OEM \& CIP)}{(CIM - CIP)} \quad (Eq1)$$

ICIF= Índice de Concentração Inibitória Fracionada

CIP= Ciprofloxacino

OEM= Óleo Essencial de Melaleuca

OEM & CIP= Óleo Essencial de Melaleuca em associação ao Ciprofloxacino

A partir dos valores obtidos no ICIF, foi avaliada a classificação conforme proposto por Kumar *et al.* (2012) no **Quadro 01**.

Quadro 01- Índice de Concentração Inibitória Fracionada

Interação	ICIF
Sinergismo	≤ 0.5
Aditivo	$0.5 \leq \text{ICIF} \leq 1$
Indiferente	$1 < \text{ICIF} \leq 2$
Antagonismo	> 2

2.5 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata de forma independente (N=3). Os valores médios foram calculados e apresentados $\pm$ erro-padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de MIC e MBC de OEM e CIP para as cepas bacterianas testadas são apresentados na **Tabela 01**, e pode-se observar que eles variaram entre 0,21-0,50% para *S. aureus* e 0,25-0,50% para *E. coli*; não houve crescimento nos controles negativos, e os controles positivos apresentaram crescimento, demonstrando a viabilidade dos inóculos. O MIC de CIP encontrado para as cepas de *S. aureus* e *E. coli* variou de 0,001-0,012%. O MBC do OEM não pôde ser quantificado na concentração inicial testada (1%), significando que não houve efeito bactericida em concentrações iguais ou inferiores a 1%. Os valores de MBC apresentados foram iguais aos valores de MIC para CIP em todas as espécies e cepas mostrando uma atividade bactericida, conforme também apresentado na **Tabela 01**.

Tabela 1 -CIM e CBM do OEM e do CIP.

Microorganismo	OEM				CIP			
	CIM (%)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM (%)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM (%)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM (%)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i> NP0038	0,45	4043	>1	>8989	0,001	10	0,001	10
<i>S. aureus</i> LB25923	0,50	4494	>1	>8989	0,003	30	0,003	30
<i>S. aureus</i> B24	0,25	2247	>1	>8989	0,009	90	0,009	90
<i>S. aureus</i> NP0023	0,21	1872	>1	>8989	0,012	120	0,012	120
<i>E. coli</i> NP0022	0,50	4494	>1	>8989	0,003	30	0,003	30
<i>E. coli</i> ATCC25922	0,25	2247	>1	>8989	0,001	10	0,001	10
<i>E. coli</i> LB25922	0,25	2247	>1	>8989	0,002	20	0,002	20

Média aritmética da triplicata, expresso em percentagem (%) e concentração ($\mu\text{g/mL}$). Concentração inicial de 1%, valores maiores que essa concentração é expressos como >1 (%) ou > 8989 ($\mu\text{g/mL}$).

Diversos trabalhos já testaram a susceptibilidade do OEM frente a grande variedade de bactérias em todo espectro de ação, sendo que em grande maioria a mesma se mostrou eficaz em concentrações iguais ou inferiores a 1%, corroborando com o presente estudo (Hammer *et al.*, 1996; Elsom *et al.*, 1999; Nimbarte & Kulkarni, 2013). Em ensaios de triagem antimicrobiana, o OEM (Terpineno-4-ol 31,11%, γ -Terpineno 25,3% e α -Terpineno 12,7%) também inibiu fortemente o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* (Zhang *et al.*, 2018).

Segundo Carson *et al.* (2006), apesar de o OEM atuar de forma bacteriostática mesmo

em concentrações pequenas, é considerado bactericida dose dependente por necessitar de dosagens mais altas para obter esse efeito, isso explicaria por que não se obteve esse efeito em dosagens iguais ou menores que 1%. Experimentos *in vitro* relatam que a concentração bactericida mínima do OEM em microrganismos de relevância clínica está situada entre 1-1,5% (v/v) (Banes-Marshall *et al.*, 2001). Em trabalho visando avaliar dez diferentes lotes de OEM comerciais frente cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) encontraram CIMs variando entre 0,25% e 2,5% (Brun *et al.*, 2019). Em trabalho de McMahon *et al.* (2007) encontrou um CIM médio de 0,5% para as cepas testadas de *S. aureus* e *E. coli*.

Table 2 - Checkerboard e Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

Microorganismo	CIM OEM +CIP (%)		CIM OEM +CIP (µg/mL)		ICIF	RESULTADO (EFEITO)
	OEM	CIP	TTO	CIP		
<i>S. aureus</i> NP0038	0,03	0,0003	269	3	0,37	Sinérgico
<i>S. aureus</i> LB25923	0,125	0,0003	1123	3	0,35	Sinérgico
<i>S. aureus</i> B24	0,03	0,0002	269	2	0,14	Sinérgico
<i>S. aureus</i> NP0023	0,06	0,0004	539	4	0,31	Sinérgico
<i>E. coli</i> NP0022	0,06	0,0001	539	1,5	0,17	Sinérgico
<i>E. coli</i> ATCC25922	0,03	0,0003	269	3	0,42	Sinérgico
<i>E. coli</i> LB25922	0,03	0,0003	269	3	0,27	Sinérgico

Concentração inibitória mínima dos compostos associados (Checkerboard), expressos em percentagem (%) e concentração (µg/mL). Teste de sinergia, valores de ICIF ≤ 0.5 indicam sinergia entre os compostos, valores entre $\geq 0.5 \leq 1$ indicam efeito aditivo, $>1 \leq 2$ indicam indiferença e > 2 antagonismo (Kumar *et al.*, 2012).

Quando individualmente testado o OEM necessitou de concentrações entre 0,21-0,5% para inibir o crescimento de *S. aureus*, um CIM médio de 0,35%. O CIP entre 0,01-0,12%, um CIM médio de 0,06%. Quando associados, o OEM necessitou de 0,03-0,125%, 0,06% em média e o CIP entre 0,0002-0,0004%, média de 0,0003%. Isso significa que para a associação conseguir o mesmo efeito inibitório para as cepas de *S. aureus* foram necessárias (em média) concentrações 5,8 vezes menores de OEM e 20 vezes menores de CIP. As cepas de *E. coli*, individualmente, necessitaram de concentrações de OEM entre 0,25-0,5%, em média 0,33%. O CIP entre 0,001-0,003%, média de 0,002%. Quando associados, o OEM precisou de concentrações variando entre 0,03-0,06% (média de 0,04%) e o CIP entre 0,00015-0,0003% (média de 0,00025%). Os resultados mostram que ambos os compostos quando associados, em média necessitam de uma concentração 8 vezes menor para obter o mesmo efeito inibitório de que quando usados individualmente.

Quando aplicamos o ICIF (Kumar *et al.*, 2012; Lee *et al.*; 2017), constatamos que houve um efeito sinérgico, isso mostra que quando associados, os compostos precisam de no máximo 50% (ICIF $\leq 0,5$) da dosagem combinada que em suas formulações isoladas e isso se repetiu em todas as cepas de *S. aureus* e *E. coli* testadas como demonstrado na **Tabela 02**. O OEM foi avaliado contra vários patógenos, obtendo um MIC de 0,25% para *E. coli* e 0,5% e 1% contra MRSA e MSSA respectivamente, também demonstrou um alto nível de sinergia em concentrações sub-inibitórias quando combinado com antimicrobianos de referência (Oliva *et al.*, 2018). Em um prisma farmacológico, isso se deve ao fato de que as substâncias isoladas com ação em apenas um alvo molecular, geralmente, possuem uma ação menos eficiente no tratamento de uma infecção quando em comparação a terapia combinada atuando em mais de um alvo simultaneamente, potencializando seu efeito terapêutico (Biavatti, 2009).

4 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o OEM possui atividade antibacteriana significativa contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*, demonstrando um amplo espectro de ação bacteriano. Além disso, a combinação do OEM com o CIP revelou um efeito sinérgico, reduzindo as concentrações necessárias para inibir o crescimento bacteriano. Esses resultados indicam que a associação de fitoterápicos com antimicrobianos convencionais pode ser uma estratégia promissora para combater cepas bacterianas resistentes. Entretanto, o estudo apresenta algumas limitações, primeiramente os testes foram realizados *in vitro*, não significando a mesma eficácia *in vivo*. Além disso, a variabilidade na composição dos OEs pode influenciar os resultados, sendo necessário padronizar os componentes ativos para garantir a reprodutibilidade dos efeitos. Para futuras pesquisas, são necessários estudos *in vivo* de eficácia e segurança do OEM e a combinação. Visto isso, a investigação com outros OEs e outras classes de antibióticos pode ampliar as possibilidades de tratamentos sinérgicos.

REFERÊNCIAS

- AIYEGORO, Olayinka et al. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia Africana* against drug resistance bacterial isolates. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 7, p. 4477-4487, 2011.
- BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
- BANES-MARSHALL, Lynne; CAWLEY, Patrick; PHILLIPS, Carol A. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. isolates from clinical specimens. **British Journal of Biomedical Science**, v. 58, n. 3, p. 139, 2001.
- BIAVATTI, M. Weber. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 371-378, 2009.
- BrCAST- EUCAST- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- BrCast. Tabelas de pontos de cortes para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Disponível em <http://www.brcast.org>. 2024.
- BRUN, Paola et al. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current microbiology**, v. 76, p. 108-116, 2019.
- CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A.; RILEY, Thomas V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.
- CARSON, Christine F.; MEE, Brian J.; RILEY, Thomas V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.
- CHOUHAN, Sonam; SHARMA, Kanika; GULERIA, Sanjay. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.
- CLSI. "Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial

susceptibility testing." 30th Informational Supplement. CLSI document M100-S29 (2020).

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; DO SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 272-278, 2005.

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

DO BRASIL, Flora. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/Accessed>, v. 6, 2020. Acesso em: 05/01/2024.

ELSOM, G. K. F.; HIDE, D. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 427-428, 1999.

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

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

ISEPPI, Ramona et al. Effects of *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. essential oils on antibiotic-resistant bacterial biofilms. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1671, 2023.

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

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

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

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

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

MCMAHON, M. Ann et al. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 125-127, 2007.

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

OLIVA, Alessandra et al. High potency of melaleuca alternifolia essential oil against multi-drug resistant gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2584, 2018.

SALEEM, Muhammad et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural product reports**, v. 27, n. 2, p. 238-254, 2010.

SALES, Gleilton Weyne Passos et al. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2014.

SALVAT et al. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

SHRIRAM, Varsha et al. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2990, 2018.

YU, Zhihui et al. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue?. **Fitoterapia**, v. 140, p. 104433, 2020.

ZHANG, Xiaofeng et al. In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **BioMed research international**, v. 2018, n. 1, p. 2396109, 2018.