



EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUB-INIBITÓRIAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis*

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

RESUMO

O uso excessivo e irracional de antibióticos tem contribuído para a disseminação de microrganismos resistentes, dificultando a terapia de infecções. O *Staphylococcus epidermidis*, um estafilococo coagulase-negativo, está frequentemente associado a infecções persistentes devido à formação de biofilmes em dispositivos médicos. Este estudo avaliou as propriedades antibacterianas do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEM) e sua capacidade de inibir a formação de biofilmes em cepas de *S. epidermidis*. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo teste de disco-difusão, enquanto a concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada pelo método de microdiluição em placa. O efeito do OEM na formação de biofilmes foi analisado pelo método de coloração com cristal violeta. Os resultados mostraram que o OEM inibiu o crescimento das cepas em concentrações inferiores a 0,5 %, com uma ação moderada. A CIM para *S. epidermidis* ATCC12228 foi de 0,1041 % e para *S. epidermidis* 0128 foi de 0,50 %. O OEM inibiu a formação de mais de 51,23% do biofilme em Sub-CIM para *S. epidermidis* ATCC12228 e mais de 69,67 % para *S. epidermidis* 0128. Conclui-se que o OEM possui propriedades antibacterianas eficazes contra essas cepas e pode inibir maior parte da formação de biofilmes, mesmo em concentrações subinibitórias. Futuras pesquisas devem focar na padronização dos métodos de extração e na avaliação da eficácia do OEM em um espectro mais amplo de microrganismos, além de estudos in vivo para confirmar sua aplicabilidade clínica como agente antimicrobiano e antibiofilme.

Palavras-chave: Biofilme; Antibacteriano; Resistência Antimicrobiana.

1 INTRODUÇÃO

Apesar do advento dos antibióticos (ATBs), as infecções ainda são um grande problema de saúde pública. O seu uso excessivo e/ou irracional tem contribuído para uma pressão seletiva e disseminação de microrganismos resistentes a medicamentos, dificultando a terapia (Uddin *et al.*, 2021). As infecções resistentes e multirresistentes a antibióticos, tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas e estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade e consequente aumento nos custos de saúde, sendo tido um dos maiores problemas de saúde mundial (Oliveira *et al.*, 2006). A rápida taxa de evolução de microrganismos resistentes a antibióticos e a lenta pesquisa por novos compostos faz que consideremos uma abordagem prática para os antibióticos atualmente disponíveis e busca de novos compostos visando diminuir, inibir ou reverter a resistência (Murygaiyan *et al.*, 2022).

Os mecanismos que geralmente conferem resistência aos microrganismos são bombas de efluxo, superprodução de moléculas alvo ou degradação enzimática, mas as células microbianas também podem adquirir tolerância aos ATBs pela formação de biofilme (He *et al.*, 2016). Os biofilmes são um grande problema na saúde, em ambiente hospitalar são causa de mais de 80% das graves infecções persistentes (Davies, 2003). Bactérias de relevância

clínica como *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e *S. aureus* proliferam-se em dispositivos médicos, *P. aeruginosa* causa insuficiência pulmonar em pacientes com fibrose cística. Ambas formam biofilmes com resistência e tolerância de até 1000 vezes a antibióticos em comparação com sua forma planctônica (Kumar et al., 2017).

Um biofilme é uma comunidade de microrganismos fixados em uma superfície, envolvidos por uma matriz polimérica extracelular, composta por exopolissacarídeos (EPS), proteínas e DNA extracelular (eDNA). A matriz atua como uma barreira física contra medicamentos e aos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro. Também contribuem para o aparecimento de mutações genóticas que alteram os alvos dos fármacos, fornecendo um nicho ecológico protetor para a sobrevivência de microrganismos, atuando como uma fonte de infecções recorrentes (Swolana et al., 2020). Uma única espécie de bactéria ou consórcios de micróbios multiespécies podem existir dentro de um biofilme (Kumar et al., 2017). A maioria dos autores divide o processo de criação do biofilme em três estágios principais: adesão, maturação e dispersão (Santos et al., 2020).

As infecções causadas por *S. epidermidis* são frequentes e difíceis de erradicar (Swolana et al., 2022). Trata-se de um estafilococo coagulase-negativo, considerada uma bactéria comensal da pele, podendo causar problemas significativos a romper a barreira epitelial (Rogers et al., 2009). O *S. epidermidis* geralmente está envolvido na bacteremia, em casos de sepse pacientes com sistema imunológico imaturo ou imunocomprometido (Marchant et al., 2013). Esse seu potencial virulento é muitas vezes relacionado ao biofilme de dispositivos médicos internos como implantes articulares, cateteres urinários e tecidos infectados, o que dificulta a terapia com antimicrobianos convencionais (Rogers et al., 2009).

A escassez no desenvolvimento de novos antibióticos e moléculas anti-biofilme nas últimas décadas, tem levado a pesquisas visando desvendar os mecanismos que controlam a formação de biofilme, além de descobrir compostos para atenuar a formação de biofilme sem permitir que as bactérias desenvolvam resistência a aos ATBs. Nesse contexto, produtos naturais de plantas podem ser fontes importantes de agentes antimicrobianos, levando à descoberta de vários novos compostos (Artini et al., 2017). A heterogeneidade estrutural dos compostos naturais, principalmente os óleos essenciais (OEs), representam um importante reservatório de compostos biologicamente ativos, permitindo que eles atuem sob uma série de mecanismos de ação, com as vias bioquímicas sendo um dos principais alvos (Vaou et al., 2021). Muitos OEs têm demonstrado propriedades antimicrobianas. Embora compostos por uma mistura complexa de componentes, os monoterpenos, na maioria das vezes, desempenham essa atividade biológica (Chouhan et al., 2017).

A *Melaleuca alternifolia* é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, que destilada produz o óleo essencial de melaleuca (OEM). Consiste em uma diversidade de substâncias voláteis principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus alcoois correspondentes, como terpinen-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno, 1-8 cineol (eugenol) e α -terpinenol (DO BRASIL, 2020). É conhecido pela presença de elementos medicinais, com atividade antinflamatória e antimicrobiana frente a diversas espécies de fungos e bactérias (Carson et al., 2006).

Considerando o exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar as propriedades antibacterianas do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e a capacidade do mesmo inibir a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEM).

Foi utilizado OEM da EssencialLife (Brasil), caracterizada quimicamente por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, utilizado o equipamento da marca Agilent, Modelo MSD 5977 B.

2.2 Ensaios Antimicrobianos

2.2.1 Culturas e microrganismo e padronização dos inóculos

Foram utilizadas cepas padrões de *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 e *Staphylococcus epidermidis* 0128 provenientes do Laboratório de Pesquisa NB2 da Universidade Federal da Fronteira Sul. 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.

2.2.2- Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos (teste de disco-difusão)

O teste de disco-difusão, também conhecido como antibiograma, foi realizado seguindo a metodologia preconizada pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Esse ensaio tem como princípio básico a difusão do composto teste em um disco. Trata-se de um método físico onde um microrganismo desafiado frente a uma substância biologicamente ativa em agar. Quando a substância consegue conter o avanço do microrganismo, ocorre a formação de um halo de inibição em torno do disco, caracterizando a substância como antimicrobiana. O objetivo é fornecer resultados qualitativos e/ou semi-quantitativos caracterizando as cepas em suscetíveis, intermediárias ou resistentes (ANVISA, 2013).

Em suma, o inóculo padronizado foi semeado em toda extensão da placa contendo Agar Mueller-Hinton (AMH). Discos brancos estéreis com 6 mm de diâmetro contendo 5 µL do OEM, assim como os discos de controle foram alocados no meio de cultura. Para fins de controle positivo e comparação de atividade foi utilizado discos comerciais de Ciprofloxacino (CIP), o controle negativo foi realizado com água destilada estéril.

A incubação foi realizada a $36^\circ\text{C}/24\text{h}$. A leitura foi feita com paquímetro digital e comparada com valores padronizados nos manuais de forma qualitativa e interpretadas como: sensíveis (S) a dose padrão, um microrganismo é categorizado como sensível quando existe alta chance de sucesso terapêutico na dosagem testada (halo de inibição > 8 mm); intermediárias (I), também considerado como sensível aumentando a exposição, quando há uma alta taxa de sucesso com o aumento da dosagem ($6 < 8$ mm); ou resistentes (R) (≤ 6 mm) quando há grande possibilidade de insucesso mesmo com aumento da dosagem (BrCAST, 2024). A atividade foi caracterizada de forma semi-quantitativa pela força de sua ação, como: Muito Forte (MF) (> 15 mm), Moderada (M) (10 - 15 mm), Fraca (F) (< 10 mm) ou Sem Ação (SA) de acordo com seus halos de inibição (Kacániová *et al.*, 2021).

2.2.3 Determinação da Concentração Inibitória (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em placa preconizado pelo CLSI (2020) com a concentração do OEM variando entre 1% (8980 µg/mL) e 0,001% (8,9 µg/mL). Resumindo, foram adicionados 100 µL de BHI estéril em todos os 96 poços. Na segunda coluna, foi adicionado e 100 µL 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 o controle 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 substância 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 a inibição e quando o corante sofreu modificação para a cor rosa, indicou uma reação da oxidação-redução evidenciando a viabilidade celular (Salles *et al.*, 2014).

2.2.4 Ensaio de inibição de formação de biofilme

O efeito do OEM de prevenir a formação do biofilme foi usando o método de coloração com cristal violeta, modificado (Adukwu *et al.*, 2012). Resumidamente, 100µl de caldo BHI foi dispensado em todos os 96 poços, 100µl da solução estoque foi dispensada na segunda coluna e sofreu diluição seriada até o último poço, 10µl do inóculo padronizado foi colocado em todos os poços. Após incubação a 37°C/24 h, o meio será descartado e cada poço lavado 2 vezes com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4), seco, corado por 20 minutos com 200µL de cristal violeta 0,4% (p/v) e lavado com água destilada. Os biofilmes corados serão ressuspensos em 200µl de etanol 95%. A D.O. foi medida em λ=570nm, por meio espectrofotometro Multiscan. O controle negativo foi apenas BHI e o controle positivo foi o inóculo sem tratamento. Todos os testes serão realizados em triplicata. A % de inibição da formação de biofilme foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{O. D. (controle negativo)} - \text{O. D. (amostra tratada)}}{\text{O. D. (controle negativo)}} \times 100$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos presentes no OEM foram caracterizados pela comparação dos tempos de retenção e espectros de massa de cada pico com informações da biblioteca NIST.

Tabela 01 - Perfil Cromatográfico do OEM cultivado em Realeza/PR- Brasil e ISO 4730:2017.

Constituintes Químicos	OE de Melaleuca		ISO 4730:2017
	Densidade Relativa: 0,890	Densidade Relativa: 0,885 - 0,906	
	Concentração (%)	Concentração (%)	
α-Pineno	3,17	1,00-4,00	
α-Terpineno	24,71 ↑	6,0-12,0	
p-Cimeno	3,16	0,5-8,0	
Limoneno	2,24 ↑	0,5-1,5	
Eucaliptol (1-8 Cineol)	2,19	Traços - 10,0	
γ-Terpineno	21,81	14,0-28,0	
Terpinen-4-ol	26,91 ↓	35,0-48,0	
α-Terpineol	2,07	2,0-5,0	
Aromandendreno	1,31	0,2-3,0	
Viridifloreno	1,02	0,1-3,0	
δ-Cadineno	1,30	0,2-3,0	

Cromatografia do óleo essencial de Melaleuca, suas respectivas concentrações e comparação com as faixas de concentração indicados pela ISO 4730:2017, indicando quando a concentração de um composto está acima (↑) ou abaixo (↓) das concentrações preconizadas pela respectiva norma (compostos com concentrações não especificadas pela ISO ou dentro da norma, não possuem indicações).

A norma que regulamenta as características físico-químicas e composição do OEM é a ISO 4730:2017, na qual consta que óleo deve conter predominantemente monoterpenos e álcoois relacionados. Os valores da supramencionada ISO e seus principais constituintes químicos estão descritos na **Tabela 01**. A densidade relativa encontrada no OEM foi 0,890, os compostos majoritários o **Terpinen-4-ol** (26,91%), **α -Terpineno** (24,71%) e o **γ -Terpineno** (21,81%), correspondendo a 73,43% da concentração total do OE. A composição e concentração dos componentes dos OEs de plantas, mesmo quando da mesma espécie, embora regulado por genes, podem variar devido a diversos fatores ecológicos e condições edafoclimáticas. Também podem ocorrer variações na composição do OE pelo método de extração ou mudança do material vegetal, fatores que explicam as diferenças encontradas entre o OEM e os valores preconizados pela ISO (Verma *et al.*, 2016). Em estudo de Zhang *et al.*, (2018) também encontraram valores de Terpinen-4-ol (31,1%) inferiores a ISO 4730:2017, além γ -Terpineno (25,3%) e α -Terpinene (12,7%) totalizando aproximadamente 70% da concentração. Brophy *et al.*, (1989) pesquisou 800 amostras chegando a uma média de: Terpinen-4-ol (40,1%), γ -terpineno (23.0%), α -Terpinene (10.4%), totalizando 73,5%.

Tabela 02 - Resultado teste de disco-difusão do OEM, perfil de sensibilidade e grau de (S) Muito Forte (MF)

Microrganismo	Óleo Essencial de Melaleuca (OEM)		
Bactérias Gram-positivas	Halo de Inibição (mm)	Interpretação	Ação
<i>S. epidermidis</i> 0128	14,87±1,60	Sensível (S)	Moderada (M)
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	14,93±2,14	Sensível (S)	Moderada (M)
CIPROFLOXACINO (CIP5)			
<i>S. epidermidis</i> 0128	49,03±1,37	Sensível (S)	Muito Forte (MF)
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	46,03±2,80	Sensível (S)	Muito Forte (MF)

Zona de inibição (em mm) incluindo o diâmetro do disco, de 6 mm. Os dados referem-se à média da triplicata $\pm$ desvio padrão. Perfil de Sensibilidade: Sensível (S) > 8 mm; Intermediário (I) $> 6 < 8$ mm; Resistente (R) ≤ 6 mm (BrCast, 2024). Graus de inibição: Sem Ação (SA) ≤ 6 mm; Fraca (F) < 10 mm; Moderada (M) 10 - 15mm; Muito Forte (MF) > 15 mm (Kacániová *et al.*, 2021).

No ensaio de susceptibilidade a antimicrobiano, o OEM mostrou-se eficaz frente as cepas de *S. epidermidis*, a mesma se mostrando sensível e com uma ação moderada do óleo. Para fins de controle positivo, as cepas foram expostas ao antimicrobiano CIP, também se mostrando sensíveis e com uma ação muito forte do mesmo.

Tabela 2 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM)

Microorganismo	OEM		CIP	
	MIC (%)	MIC (μ g/mL)	MIC (%)	MIC (μ g/mL)
<i>S.epidermidis</i> ATCC12228	0,1041	748,35	0,001	10
<i>S.epidermidis</i> 0128	0,50	4490	0,012	120

Média aritmética da triplicata, expressa em porcentagem (%) e concentração (μ g/mL). Concentração inicial do OEM 1% e do CIP 0,25%.

O CIM mostrou que ambas as cepas *S. epidermidis* são inibidas por concentrações de OEM inferiores a 0,5%. O OEM já foi testado para uma grande variedade de bactérias, demonstrando um amplo espectro de ação e uma atividade bacteriostática em concentrações iguais ou inferiores a 1%, mas é essencialmente bactericida em concentrações suficientes,

corroborando com o resultado do trabalho (Carson *et al.*, 2006). Cox *et al.*, (2001) avaliaram os mecanismos de atividade antimicrobiana do OEM, constituído em grande parte por monoterpenos cíclicos, frente *S. aureus* e *E. coli*, concluindo que os efeitos inibitórios do OEM são consistentes com a partição dos constituintes monoterpênicos na membrana celular e o dano causado na membrana é diferente em cada tipo de microrganismo. Essa diferença na sensibilidade as substancias ativas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são devido as diferenças na estrutura da célula associada a parede celular ou camadas de contorno celular. O Terpenen-4-ol, é o componente majoritário do óleo e a principal fonte de atividade antimicrobiana de amplo espectro, onde demonstrou afetar a parede celular bacteriana, perda de material nuclear e inibição da respiração dependente de glicose (Hammer *et al.*, 2003). Apesar do consenso que Terpenen-4-ol é a principal fonte de atividade antimicrobiana (Brum *et al.*, 2019), é difícil atribuir uma atividade biológica a um ou dois únicos compostos dentro de uma mistura tão complexa. A efetividade antimicrobiana dos OEs se dá pela interação sinérgica de diversos compostos, mesmo em concentrações vestigiais (Rao *et al.*, 2019). O 1,8-Cineol, por exemplo, mesmo em quantidades traços aumenta a permeabilidade da membrana, facilitando a penetração dos outros componentes direcionados a cadeia respiratória, síntese de produção de estruturas adesivas e expressão de genes envolvidos na formação de biofilme (Gustafson *et al.*, 1998).

Tabela 3- Porcentagem de inibição do biofilme

Microorganismo	CONCENTRAÇÃO DE OEM			
	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%
<i>S.epidermidis</i> ATCC12228	68,71	66,39	63,71	51,23
<i>S.epidermidis</i> 0128	72,39	69,64	69,41	35,55
Microorganismo	CONCENTRAÇÃO DE CIP			
	0,125%	0,01562%	0,00391%	0,00012%
<i>S.epidermidis</i> ATCC12228	75,33	74,23	74,35	73,25
<i>S.epidermidis</i> 0128	78,27	73,28	74,77	71,90

Média aritmética da triplicata, expressa em porcentagem (%) de inibição do biofilme na referida concentração do composto.

O ensaio de inibição do biofilme tem como objetivo verificar se a utilização prévia do composto pode evitar a formação do mesmo. Na cepa de *S.epidermidis* ATCC12228, que teve CIM de 0,10% o OEM inibiu a formação de mais de 65% do biofilme em concentrações acima do CIM, 63,71% do biofilme em concentrações bacteriostáticas e 51,23% em concentrações subinibitórias. Em *S.epidermidis* 0128, que teve CIM de 0,50%, o OEM inibiu a formação de mais de 70% do biofilme na concentração do CIM e 69,41% em concentrações 4 vezes menores que o CIM. O CIP inibiu a formação de mais de 70% do biofilme tanto em concentrações muito superiores quanto muito inferiores ao CIM.

O trabalho realizado por Veerendrakumar *et al.*, (2024), demonstrou uma inibição de 60,5% da formação de biofilme em uma concentração sub-inibitória do OEM em *S. mutans*. Em estudo de Zhao *et al.*, (2018), os pesquisadores examinaram o perfil transcricional de células de biofilme de *S. aureus* para observar alterações na expressão genica após tratamento com OEM. Os resultados mostraram 304 genes exibindo expressão diferencial quando tratados com concentrações sub-inibitórias do óleo. Kim *et al.* (2016), os EOs de *P. racemosa*, *S. aromaticum* e *P. officinalis* em uma concentração de 0,005% (v/v) inibiram a formação de biofilme de EHEC em cerca de 75%.

4 CONCLUSÃO

O estudo avaliou as propriedades antibacterianas do OEM e sua capacidade de inibir a formação de biofilme em cepas de *S. epidermidis*. Os resultados mostraram que o OEM inibiu o crescimento das cepas em pequenas concentrações do OEM e a formação do biofilme (mesmo em concentrações inferiores a CIM). Apesar dos resultados promissores, o estudo apresenta algumas limitações. A variação na composição do OEM devido a fatores ecológicos e métodos de extração pode influenciar a eficácia do óleo. Futuras pesquisas devem focar na padronização dos métodos de extração do OEM e na avaliação de sua eficácia em um espectro mais amplo de microrganismos. Além disso, estudos *in vivo* são essenciais para confirmar a aplicabilidade clínica do OEM como agente antimicrobiano e antibiofilme. A busca por compostos naturais eficazes continua sendo uma estratégia promissora para combater a resistência antimicrobiana e melhorar os tratamentos de infecções persistentes.

REFERÊNCIAS

ADUKWU, E. C et al. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, 2012.

ANVISA- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica - Brasília: Anvisa, 2013.

ARTINI, Marco et al. Hydrophobin coating prevents *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different surfaces. **Biofouling**, v. 33, n. 7, p. 601-611, 2017.

BrCAST- EUCAST- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- BrCast. Tabelas de pontos de cortes para interpretação de CIMs e diâmetros de halos, 2024.

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

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

CARSON, Christine et al. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

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.

COX, Sean D. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, n. 2, p. 87-91, 2001. DAVIES, David. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

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

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

HAMMER, KA et al. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of applied microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853-860, 2003.

HE, Hong-Jing et al. Erythromycin resistance features and biofilm formation affected by subinhibitory erythromycin in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 1, p. 33-40, 2016.

KAČÁNIOVÁ, Miroslava et al. Chemical composition, in vitro and in situ antimicrobial and antibiofilm activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) essential oil. **Plants**, v. 10, 2021.

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.

KUMAR, Ashutosh et al. Biofilmes: Estratégia de sobrevivência e defesa para patógenos. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 307, n. 8, p. 481-489, 2017.

MARCHANT, Elizabeth A. et al. Neonatal sepsis due to coagulase-negative *Staphylococci*. **Journal of Immunology Research**, v. 2013, n. 1, p. 586076, 2013.

MURUGAIYAN, Jayaseelan et al. Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: Focus on antibiotics. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 200, 2022.

RAO, Jiajia et al. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. **Annual review of food science and technology**, v. 10, n. 1, p. 365-387, 2019.

ROGERS, Kathie L.; FEY, Paul D.; RUPP, Mark E. Infecções estafilocócicas coagulase-negativas. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 73-98, 2009.

SALES, G.W.P. 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.

SANTOS, Catarina A. et al. Bioactive properties of *Syzygium cumini* (L.) skeels pulp and seed phenolic extracts. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 990, 2020.

SKOVDAL, S M. et al. Host factors abolish the need for polysaccharides and extracellular matrix-binding protein in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, 2021.

SWOLANA, Denis et al. Antibiofilm effect of silver nanoparticles in changing the biofilm-related gene expression of *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, 2022.

SWOLANA, Denis et al. The antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus epidermidis* strains with different biofilm-forming ability. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, 2020.

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

VAOU, Natalia et al. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2041, 2021.

VEERENDRAKUMAR, Prateek et al. Melaleuca alternifolia essential oil combat antibiotic-resistant streptococcus mutans: suppressing quorum-sensing-dependent virulence and biofilm formation. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 53, n. 3, p. 179-193, 2024.

VERMA, Sajendra K. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of bergamot-mint (*Mentha citrata* Ehrh.) essential oils isolated from the herbage and aqueous distillate using different methods. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 152-160, 2016.

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