

## METODOLOGIAS APLICADAS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PRODUTOS NATURAIS, UMA REVISÃO

### METHODOLOGIES APPLIED IN THE EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS, A REVIEW

### METODOLOGÍAS APLICADAS EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PRODUCTOS NATURALES, UNA REVISIÓN

Lucas dos Santos Sa<sup>1</sup>

**RESUMO:** Os produtos naturais continuam a representar uma fonte relevante de compostos bioativos com potencial terapêutico, especialmente frente ao aumento global da resistência bacteriana aos antibióticos convencionais. Nesse contexto, metodologias confiáveis, reprodutíveis e padronizadas para avaliação da atividade antibacteriana são essenciais para a prospecção, validação e comparação de resultados obtidos com extratos, frações e compostos isolados de origem natural. Este artigo de revisão aborda criticamente e de forma ampliada as principais metodologias *in vitro* e *in vivo* empregadas na avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais, incluindo ensaios de difusão, métodos de diluição, testes de viabilidade celular, análises mecanísticas, estudos de modulação da atividade antibiótica e modelos alternativos *in vivo*. São discutidas vantagens, limitações, critérios experimentais e aplicações de cada abordagem, bem como perspectivas para padronização e integração metodológica em pesquisas futuras.

**Palavras-chave:** Microdiluição em caldo. Checkboard. Antibiograma. Antibiofilme. Zebrafish.

**ABSTRACT:** Natural products continue to represent a relevant source of bioactive compounds with therapeutic potential, especially given the global increase in bacterial resistance to special antibiotics. In this context, reliable, reproducible and standardized methodologies for evaluating antibacterial activity are essential for prospecting, validating and comparing results obtained with extracts, fractions and isolated compounds of natural origin. This review article critically and extensively addresses the main *in vitro* and *in vivo* methodologies used to evaluate the antibacterial activity of natural products, including diffusion assays, dilution methods, cellular prediction tests, mechanistic analyses, antibiotic activity modulation studies and alternative *in vivo* models. Advantages, limitations, experimental criteria and applications of each approach are discussed, as well as perspectives for standardization and methodological integration in future research.

**Keywords:** Broth microdilution. Checkboard. Antibiogram. Antibiofilm. Zebrafish.

**RESUMEN:** Los productos naturales continúan representando una fuente relevante de compuestos bioactivos con potencial terapéutico, especialmente ante el aumento global de la resistencia bacteriana a antibióticos de uso clínico. En este contexto, las metodologías fiables, reproducibles y estandarizadas para la evaluación de la actividad antibacteriana son esenciales para la prospección, validación y comparación de los resultados obtenidos con extractos, fracciones y compuestos aislados de origen natural. Este artículo de revisión aborda de manera crítica y exhaustiva las principales metodologías *in vitro* e *in vivo* utilizadas para evaluar la actividad antibacteriana de productos naturales, incluyendo ensayos de difusión, métodos de dilución, pruebas de predicción celular, análisis mecanísticos, estudios de modulación de la actividad antibiótica y modelos alternativos *in vivo*. Se discuten las ventajas, limitaciones, criterios experimentales y aplicaciones de cada enfoque, así como las perspectivas para la estandarización y la integración metodológica en futuras investigaciones.

**Palabras clave:** Microdilución en caldo. Checkerboard. Antibiograma. Antibiofilme. Zebrafish.

<sup>1</sup>Licenciado em Ciências Biológicas, pela Universidade Regional do Cariri-URCA.

## I. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos constitui um problema crítico de saúde pública em escala global, sendo reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma das principais ameaças à efetividade dos tratamentos antimicrobianos. O uso indiscriminado de antibióticos, associado à capacidade adaptativa dos microrganismos, tem favorecido o surgimento e a disseminação de cepas multirresistentes, limitando drasticamente as opções terapêuticas disponíveis (Gamboa *et al.*, 2022). Nesse cenário, a busca por novas moléculas antibacterianas tem sido intensificada, e os produtos naturais emergem como uma das mais promissoras fontes de diversidade química. Historicamente, uma parcela significativa dos antibióticos utilizados na prática clínica, como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos, teve origem direta ou indireta em metabólitos naturais. Além disso, extratos vegetais, óleos essenciais, compostos fenólicos, alcaloides, terpenos e metabólitos microbianos têm demonstrado atividades antibacterianas relevantes, tanto de forma isolada quanto em associação com antibióticos convencionais (De pinho *et al.*, 2024).

Entretanto, a complexidade química inerente aos produtos naturais impõe desafios metodológicos significativos. A variabilidade na composição dos extratos, influenciada por fatores como origem geográfica, condições ambientais, método de extração e solvente utilizado, pode comprometer a reprodutibilidade e a comparabilidade dos resultados. Assim, a seleção criteriosa e a correta aplicação das metodologias de avaliação antibacteriana tornam-se etapas cruciais para a validação científica desses produtos (Lima *et al.*, 2022).

A avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais envolve uma ampla gama de abordagens experimentais, que vão desde ensaios qualitativos de triagem inicial até métodos quantitativos e estudos mecanísticos aprofundados. Além disso, modelos *in vivo* e sistemas alternativos têm sido progressivamente incorporados, visando uma melhor correlação entre os resultados *in vitro* e a eficácia biológica em organismos complexos (Abrantes, 2022). Diante disso, está revisão tem como objetivo apresentar e discutir de forma aprofundada as principais metodologias empregadas na avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais, destacando seus fundamentos, aplicações, vantagens e limitações contribuindo para o delineamento de estratégias experimentais mais robustas e reprodutíveis.

## 2. METODOLOGIA

O presente estudo consiste em uma revisão narrativa e integrativa da literatura científica, de caráter qualitativo, cujo objetivo foi compilar e analisar criticamente as principais metodologias aplicadas na avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais. A revisão foi conduzida com base em recomendações gerais para estudos de revisão na área biomédica, visando garantir abrangência temática, rigor metodológico e reprodutibilidade.

A busca bibliográfica foi realizada de maneira sistemática nas bases de dados Google acadêmico, PubMed/MEDLINE, Web of Science, Scopus, ScienceDirect e SciELO, selecionadas por sua relevância e ampla cobertura de periódicos nas áreas de microbiologia, farmacologia, produtos naturais e ciências da saúde. As estratégias de busca foram elaboradas a partir da combinação de descritores controlados e termos livres, utilizando operadores booleanos (AND e OR). Entre os principais termos empregados destacam-se “produtos naturais”, “extratos vegetais”, “metabólitos secundários”, associados a “atividade antibacteriana”, “atividade antimicrobiana”, “ensaios antibacterianos”, “métodos antimicrobianos”, bem como descritores específicos relacionados às metodologias, como “concentração inibitória mínima (CIM)”, “mecanismo de ação” e “inibição de bombas de efluxo”. As buscas foram realizadas predominantemente no idioma inglês e, quando pertinente, termos equivalentes em português e espanhol foram utilizados, especialmente para a base SciELO.

3

Foram considerados estudos publicados no período compreendido entre 2015 e 2025, de modo a contemplar tanto metodologias clássicas amplamente consolidadas quanto abordagens mais recentes utilizadas na avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais. Os critérios de inclusão abrangeram artigos originais e revisões publicados em periódicos revisados por pares, que descrevessem de forma clara metodologias *in vitro* e/ou *in vivo* aplicadas à avaliação antibacteriana de extratos, frações ou compostos isolados de origem natural, com disponibilidade do texto completo. Foram excluídos resumos de congressos, editoriais, cartas ao editor, estudos voltados exclusivamente à atividade antifúngica, antiviral ou antiparasitária, trabalhos com descrição metodológica insuficiente, artigos duplicados entre as bases de dados e publicações provenientes de periódicos sem revisão por pares ou de caráter predatório.

O processo de seleção dos estudos foi realizado em etapas sequenciais, incluindo a leitura dos títulos, seguida da análise dos resumos e, posteriormente, da leitura integral dos textos potencialmente elegíveis. Em todas as etapas, os critérios de inclusão e exclusão previamente

estabelecidos foram rigorosamente aplicados. Após a seleção final, procedeu-se à extração das informações relevantes, incluindo as metodologias antibacterianas empregadas, os principais parâmetros experimentais adotados e aplicações de cada abordagem metodológica descrita.

A análise dos estudos incluídos foi conduzida de forma qualitativa e comparativa, com ênfase na robustez experimental, na adequação metodológica e na aplicabilidade das técnicas para a prospecção de agentes antibacterianos de origem natural. Devido à heterogeneidade dos delineamentos experimentais, dos modelos biológicos e dos parâmetros avaliados, não foi realizada meta-análise quantitativa. Por se tratar exclusivamente de uma revisão bibliográfica, o estudo não envolveu experimentação com seres humanos ou animais, não sendo necessária a submissão a comitê de ética em pesquisa.

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A técnica de microdiluição em caldo é um método quantitativo amplamente utilizado em microbiologia para a avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos, fármacos ou extratos naturais frente a diferentes microrganismos. Esse método permite a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração do agente testado capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano após um período padronizado de incubação. O ensaio é realizado, geralmente, em placas de microtitulação de 96 poços, utilizando como meio de cultura o caldo Mueller-Hinton, por apresentar composição adequada e reprodutibilidade para testes de sensibilidade antimicrobiana (CLSI, 2025).

Inicialmente, a cepa bacteriana é cultivada em meio sólido por 18 a 24 horas, e colônias isoladas são suspensas em solução salina estéril até que a turbidez seja ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondente a aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Em seguida, essa suspensão é diluída em caldo de cultura de modo a se obter uma concentração final de cerca de  $5 \times 10^5$  UFC/mL em cada poço da placa. Paralelamente, o agente antimicrobiano é preparado em uma solução estoque e submetido a diluições seriadas em razão 1:2 no próprio caldo de cultura, resultando em uma faixa de concentrações previamente estabelecida. Cada poço recebe o volume correspondente do meio, do antimicrobiano e do inóculo bacteriano (CLSI, 2025).

O ensaio deve incluir controles adequados, como o controle de crescimento, contendo apenas o meio e a bactéria, o controle de esterilidade, composto somente pelo meio de cultura,

e, quando necessário, o controle do solvente utilizado na solubilização do composto. Após o preparo, as placas são incubadas a 35–37 °C por um período de 18 a 24 horas. A leitura dos resultados pode ser realizada por inspeção visual da turvação do meio, por métodos espectrofotométricos ou com o auxílio de indicadores de viabilidade celular, como a resazurina. A CIM é determinada como a menor concentração do agente testado na qual não se observa crescimento bacteriano visível (CLSI, 2025).

O modo de leitura mais tradicional é a avaliação visual da turvação do meio, na qual a CIM é determinada como a menor concentração do antimicrobiano em que o caldo permanece límpido quando comparado ao controle de crescimento. Esse método baseia-se na observação direta da ausência de turbidez, indicativa de inibição do crescimento bacteriano, sendo amplamente utilizado por sua simplicidade, embora esteja sujeito a certa subjetividade do observador, especialmente em situações de crescimento fraco ou precipitação do composto testado. Outra forma de leitura bastante empregada é a leitura espectrofotométrica, realizada por meio de leitores de microplacas, geralmente em comprimentos de onda entre 570 e 600 nm (De Souza *et al.*, 2025).

Nesse caso, a densidade óptica de cada poço é medida, permitindo a quantificação indireta do crescimento bacteriano. A CIM é definida como a menor concentração capaz de reduzir significativamente a densidade óptica em relação ao controle de crescimento, podendo-se adotar critérios como ausência de aumento de absorbância ou redução superior a 90%. Esse método apresenta maior reprodutibilidade e objetividade quando comparado à leitura visual, sendo particularmente útil em estudos comparativos e ensaios com grande número de amostras (Da Luz Ferreira *et al.*, 2022).

Adicionalmente, a leitura da CIM pode ser realizada com o auxílio de indicadores redox de viabilidade celular, como a resazurina, o TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) ou o INT (iodonitrotetrazólio). A resazurina, por exemplo, é um corante azul não fluorescente que, quando reduzido por células metabolicamente ativas, é convertido em resorufina, de coloração rosa. Nesse método, após o período de incubação inicial, o indicador é adicionado aos poços e a placa é reincubada por um curto intervalo de tempo. A CIM é então definida como a menor concentração do antimicrobiano na qual não ocorre mudança de cor, indicando ausência de atividade metabólica bacteriana (Bezerra *et al.*, 2022).

Esse tipo de leitura é altamente sensível e facilita a visualização dos resultados, sendo especialmente útil em ensaios com crescimento bacteriano discreto ou com compostos que interferem na turbidez do meio. Em alguns protocolos, a leitura pode ainda ser complementada

por métodos fluorimétricos, baseados na detecção da fluorescência emitida por indicadores metabólicos, o que aumenta ainda mais a sensibilidade do ensaio. Independentemente do método adotado, é fundamental que o critério de definição da CIM seja claramente descrito, garantindo a reprodutibilidade e a comparabilidade dos resultados. A análise conjunta dos valores de CIM e CBM permite a classificação do perfil de ação do agente testado (Santos *et al.*, 2023).

### 3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir do ensaio de microdiluição em caldo, é possível determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que corresponde à menor concentração do antimicrobiano capaz de promover a morte de pelo menos 99,9% da população bacteriana inicial. Para isso, alíquotas dos poços que não apresentaram crescimento visível, geralmente aqueles correspondentes à CIM e às concentrações superiores, são semeadas em meio sólido livre de antimicrobiano, como o ágar Mueller-Hinton, e incubadas novamente por 24 horas a 35–37 °C. Após esse período, avalia-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano. A CBM é definida como a menor concentração na qual não ocorre crescimento de colônias viáveis no meio sólido, indicando efeito bactericida do composto (De Sousa *et al.*, 2022).

6

A comparação entre os valores de CIM e CBM permite classificar o perfil de ação do agente testado. Quando a CBM é igual ou até duas vezes maior que a CIM, o composto é considerado bactericida; quando a CBM é significativamente maior, geralmente quatro vezes ou mais em relação à CIM, o efeito é classificado como bacteriostático. Dessa forma, a técnica de microdiluição em caldo associada à determinação da CBM constitui uma ferramenta essencial para a caracterização da atividade antimicrobiana e para estudos comparativos e mecanísticos envolvendo novos agentes ou estratégias de modulação da atividade de antibióticos (De souza *et al.*, 2023).

### 3.3 Atividade potencializadora da ação dos antibióticos

A técnica de potencialização da ação de antibióticos baseia-se na investigação da capacidade de um composto, isoladamente pouco ou não ativo contra determinada bactéria, em restaurar ou aumentar a eficácia de um antibiótico frente a cepas resistentes. O princípio fundamental desse método consiste na comparação da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico testado isoladamente com a CIM obtida na presença de uma concentração subinibitória fixa do composto modulador, geralmente correspondente a uma fração da CIM

previamente determinada, como CIM/8 ou CIM/4. A escolha de concentrações subinibitórias é essencial para garantir que qualquer redução observada na CIM do antibiótico seja atribuída à modulação de mecanismos de resistência bacteriana, e não a um efeito antimicrobiano direto do composto avaliado (Rosa, 2024).

Experimentalmente, a técnica é conduzida por meio do método de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços, meio de cultura apropriado e inóculo bacteriano padronizado, geralmente em torno de  $10^5$  UFC/mL. Após incubação, a inibição do crescimento bacteriano é avaliada por leitura visual ou por meio de indicadores metabólicos, como a resazurina. A redução significativa da CIM do antibiótico na presença do modulador, especialmente reduções iguais ou superiores a quatro vezes, é interpretada como um indicativo de potencialização relevante da atividade antibacteriana (Rosa, 2024).

A aplicação de controles positivos é um aspecto central dessa técnica, pois permite correlacionar a redução da CIM observada com a inibição de mecanismos específicos de resistência. No estudo de resistência mediada por bombas de efluxo, por exemplo, compostos reconhecidos como inibidores desses sistemas são empregados como controles positivos, destacando-se a clorpromazina, a reserpina e o carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona. Nesses ensaios, o antibiótico é testado em associação com uma concentração subinibitória do inibidor de efluxo, e a diminuição da CIM confirma que o fármaco é substrato das bombas ativas na cepa avaliada. O efeito do composto teste pode então ser comparado diretamente ao efeito do controle positivo, permitindo inferir se ambos atuam por mecanismos semelhantes (Rosa, 2024).

De modo análogo, quando a resistência está associada à baixa permeabilidade da membrana bacteriana, controles positivos como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que atua como quelante de íons divalentes em bactérias Gram-negativas, ou a polimixina B em concentrações subinibitórias, são utilizados para aumentar a permeabilidade da membrana externa. A redução da CIM do antibiótico nessas condições sugere que a dificuldade de entrada do fármaco contribui para o fenótipo de resistência. Caso o composto avaliado reproduza um efeito comparável ao do controle positivo, infere-se sua atuação na modulação da permeabilidade celular (De Albuquerque *et al.*, 2022).

No contexto da resistência mediada por enzimas inativadoras, como as  $\beta$ -lactamases, o uso de inibidores clássicos, como sulbactam ou ácido clavulânico, constitui um controle positivo indispensável. A diminuição da CIM de  $\beta$ -lactâmicos na presença desses inibidores confirma a atividade enzimática como principal mecanismo de resistência da cepa. Assim, a observação de



efeito semelhante promovido por um composto teste indica um possível papel na inibição enzimática ou na proteção do antibiótico contra a degradação (Viana *et al.*, 2023).

A interpretação integrada dos resultados obtidos com antibióticos isolados, associações com controles positivos e associações com os compostos avaliados permite não apenas identificar a ocorrência de potencialização da atividade antibacteriana, mas também inferir, de forma indireta, os mecanismos de resistência envolvidos. Quando a redução da CIM promovida pelo composto teste se assemelha àquela observada com um controle positivo específico, fortalece-se a hipótese de que ambos compartilham um mecanismo de ação relacionado. Por outro lado, a ausência de modulação mesmo na presença de controles positivos pode indicar mecanismos alternativos de resistência, como alterações no alvo molecular, que demandam abordagens complementares para sua elucidação (Gonçalves, 2019).

### 3.4 Checkerboard (Tabuleiro de Xadrez)

A técnica de checkerboard, por sua vez, é uma extensão do método de microdiluição em caldo e tem como objetivo avaliar a interação entre dois agentes antimicrobianos quando utilizados em combinação. Esse ensaio é particularmente relevante em estudos de modulação da resistência bacteriana, pois permite verificar se a associação de compostos resulta em efeito sinérgico, aditivo, indiferente ou antagonista. O método consiste na distribuição de diluições seriadas de dois fármacos em uma placa de microtitulação de 96 poços, de forma bidimensional, criando um “tabuleiro” no qual cada poço contém uma combinação específica de concentrações dos dois agentes testados (Silva *et al.*, 2022).

Após a adição de uma suspensão bacteriana padronizada e incubação, o crescimento microbiano é avaliado visualmente ou por meio de indicadores metabólicos, como a resazurina. A partir desses dados, determinam-se as MICs dos compostos isolados e em combinação, possibilitando o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI). Esse índice expressa quantitativamente o tipo de interação entre os fármacos, sendo valores iguais ou inferiores a 0,5 indicativos de sinergismo, valores entre 0,5 e 1,0 associados a efeito aditivo, valores entre 1,0 e 4,0 considerados indiferentes e valores superiores a 4,0 caracterizados como antagonismo (Nikolic *et al.*, 2022).

### 3.5 Antibiograma

O antibiograma é uma técnica microbiológica fundamental utilizada para determinar o perfil de sensibilidade e resistência de microrganismos frente a agentes antimicrobianos. Essa



metodologia baseia-se na exposição de uma suspensão bacteriana padronizada a antibióticos, permitindo avaliar a capacidade desses fármacos em inibir o crescimento microbiano. Em sua forma mais clássica, o antibiograma é realizado pelo método de difusão em disco, no qual discos de papel impregnados com concentrações conhecidas de antibióticos são dispostos sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller-Hinton previamente inoculadas com uma suspensão bacteriana ajustada à turbidez equivalente ao padrão 0,5 de McFarland (De oliveira, 2022).

Após incubação em condições adequadas de temperatura e tempo, observa-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos, cuja medida em milímetros permite classificar a cepa bacteriana como sensível, intermediária ou resistente, de acordo com critérios estabelecidos por órgãos normativos como o CLSI ou o EUCAST (Láscaris *et al.*, 2022). Além desse método, técnicas de diluição em caldo, especialmente a microdiluição, são amplamente utilizadas em pesquisa por possibilitarem a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano. O antibiograma é, portanto, essencial tanto na prática clínica, orientando a escolha racional de antibióticos, quanto em estudos científicos voltados à caracterização de fenótipos de resistência e à avaliação da eficácia de novos compostos antimicrobianos (Larrosa *et al.*, 2023).

De forma integrada, o antibiograma e o ensaio de checkerboard constituem ferramentas complementares na microbiologia experimental e clínica. Enquanto o antibiograma fornece informações sobre a atividade antimicrobiana individual de um agente frente a uma determinada cepa bacteriana, o checkerboard amplia essa análise ao investigar como diferentes compostos interagem entre si, permitindo a identificação de combinações capazes de potencializar a atividade antibacteriana ou reverter mecanismos de resistência. Essas abordagens são amplamente empregadas em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente no contexto do aumento global da resistência bacteriana (Conde *et al.*, 2023).

### 3.6 Tempo de curva de morte

A técnica de curva de morte ao longo do tempo, conhecida como time-kill assay, é um ensaio microbiológico quantitativo utilizado para avaliar a atividade de agentes antimicrobianos sobre populações bacterianas ao longo de períodos definidos. Diferentemente da determinação da concentração inibitória mínima, que fornece apenas uma informação pontual ao final da incubação, a curva de morte permite acompanhar de forma dinâmica a variação da viabilidade bacteriana em resposta à exposição a um composto, possibilitando a distinção entre efeitos

bacteriostáticos e bactericidas, bem como a avaliação da velocidade e da extensão da ação antimicrobiana (Xavier, 2022).

O princípio da técnica baseia-se na quantificação de células viáveis presentes em uma suspensão bacteriana após a exposição ao agente antimicrobiano em diferentes intervalos de tempo. A viabilidade celular é determinada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro, expressas em escala logarítmica, e os valores obtidos são correlacionados com o tempo de incubação. Uma redução igual ou superior a  $3 \log_{10}$  UFC/mL em relação ao inóculo inicial é classicamente interpretada como efeito bactericida, enquanto a manutenção da contagem bacteriana, sem redução significativa, caracteriza um efeito bacteriostático (De Melo Santana, 2022).

Experimentalmente, a técnica inicia-se com o preparo de um inóculo bacteriano padronizado, geralmente ajustado para uma concentração aproximada de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL, obtido a partir de culturas em fase exponencial de crescimento. Esse inóculo é então exposto ao antimicrobiano de interesse, isoladamente ou em combinação com outros compostos, em concentrações previamente definidas, como a concentração inibitória mínima, frações desta ou múltiplos superiores. Paralelamente, é mantido um controle de crescimento sem a adição do agente antimicrobiano, permitindo a comparação do comportamento da população bacteriana ao longo do tempo (Leal *et al.*, 2024).

10

Após a incubação sob condições adequadas de temperatura e atmosfera, alíquotas da suspensão bacteriana são coletadas em tempos previamente estabelecidos, como 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Cada alíquota é submetida a diluições seriadas decimais e posteriormente plaqueada em meio sólido apropriado. Após nova incubação, as colônias formadas são contadas e os valores de UFC/mL são calculados e convertidos para escala logarítmica. Esses dados permitem a construção de um gráfico de  $\log_{10}$  UFC/mL em função do tempo, que representa graficamente a curva de morte bacteriana (Paz *et al.*, 2025).

A análise da curva obtida fornece informações relevantes sobre o comportamento da população bacteriana frente ao tratamento. Uma queda acentuada e contínua da contagem bacteriana indica atividade bactericida, enquanto uma estabilização da curva sugere inibição do crescimento sem eliminação significativa das células. Em alguns casos, pode-se observar uma redução inicial seguida de re-crescimento bacteriano, fenômeno associado à tolerância, adaptação ou emergência de subpopulações resistentes. Quando a técnica é aplicada a combinações de antimicrobianos, a comparação das curvas permite identificar interações sinérgicas, antagonistas ou indiferentes, sendo o sinergismo geralmente definido por uma

redução adicional de pelo menos  $2 \log_{10}$  UFC/mL em relação ao agente isolado mais ativo (Da Silva Costa *et al.*, 2023).

Devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a cinética de ação dos antimicrobianos, a curva de morte ao longo do tempo é amplamente empregada em estudos farmacodinâmicos, na investigação de mecanismos de resistência bacteriana e na avaliação de novos compostos com potencial antibacteriano. Apesar de ser uma técnica mais trabalhosa e demandar maior rigor experimental, ela representa uma ferramenta fundamental para a compreensão aprofundada da eficácia e do comportamento temporal de agentes antimicrobianos frente a microrganismos sensíveis ou multirresistentes (De Oliveira Carvalho *et al.*, 2025).

### 3.7 Atividade antibiofilme

Avaliação da atividade antibiofilme é uma técnica amplamente empregada para investigar a capacidade de compostos, extratos ou fármacos em interferir na formação, manutenção ou estabilidade de biofilmes bacterianos. Os biofilmes correspondem a comunidades microbianas organizadas e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, envolvidas por uma matriz extracelular polimérica composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Essa organização estrutural confere às bactérias um fenótipo mais tolerante a agentes antimicrobianos e às respostas imunes do hospedeiro, tornando as infecções associadas a biofilmes particularmente difíceis de erradicar (Wilsmann *et al.*, 2024).

11

De modo geral, o ensaio antibiofilme baseia-se na formação controlada do biofilme em placas de microtitulação, seguida da exposição do biofilme a diferentes concentrações do agente em estudo. Inicialmente, uma suspensão bacteriana padronizada, normalmente ajustada à escala 0,5 de McFarland, é inoculada em poços contendo meio de cultura apropriado, como TSB ou BHI, frequentemente suplementado com glicose para favorecer a adesão celular. As placas são incubadas em condições estáticas, geralmente a 35–37 °C, por um período de 24 a 48 horas, permitindo a adesão das células bacterianas à superfície do poço e o subsequente desenvolvimento do biofilme. Após esse período, o meio contendo as bactérias planctônicas é cuidadosamente removido e os poços são lavados com solução tampão, como PBS, para eliminar células não aderidas (Da Silva *et al.*, 2025).

Em seguida, o biofilme formado é submetido ao tratamento com os compostos testados, que são adicionados em diferentes concentrações, muitas vezes relacionadas à concentração inibitória mínima, como CIM, CIM/2, CIM/4 ou CIM/8. As placas são novamente incubadas

por um período adicional, normalmente de 24 horas, para permitir a interação do agente com a estrutura do biofilme já estabelecido. Paralelamente, são incluídos controles adequados, como biofilme não tratado, controle tratado com antibiótico de referência e controle de esterilidade, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos (Oliveira *et al.*, 2023).

A quantificação da atividade antibiofilme é comumente realizada por meio do ensaio colorimétrico com cristal violeta, que permite a determinação da biomassa total do biofilme. Após o tratamento, os poços são lavados para remoção do excesso de composto e secos à temperatura ambiente. Em seguida, adiciona-se uma solução de cristal violeta, geralmente a 0,1%, que cora tanto as células bacterianas aderidas quanto a matriz extracelular. Após um período de incubação, o excesso de corante é removido, e o cristal violeta retido é solubilizado com etanol ou ácido acético. A intensidade da coloração, medida por absorbância em leitor de microplacas, reflete a quantidade de biofilme presente. A redução da absorbância em comparação ao controle não tratado indica a eficácia do composto em reduzir ou desestabilizar o biofilme (Sukmarini *et al.*, 2024).

Os resultados são expressos, de forma geral, como porcentagem de inibição ou redução do biofilme, calculada a partir da comparação entre os valores de absorbância dos poços tratados e do controle. Além do cristal violeta, métodos complementares podem ser empregados para uma análise mais abrangente, como ensaios de viabilidade celular baseados em resazurina ou XTT, contagem de unidades formadoras de colônia após a desagregação do biofilme, análises microscópicas e estudos de expressão gênica de genes relacionados à adesão e formação de biofilme. Assim, a avaliação da atividade antibiofilme constitui uma ferramenta fundamental para a caracterização de novos agentes antimicrobianos, permitindo não apenas verificar a redução da biomassa aderida, mas também inferir possíveis mecanismos de ação sobre bactérias em estado sésil, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra infecções persistentes associadas a biofilmes (Jotic *et al.*, 2024).

### 3.8 Atividade anticoagulante

A técnica de avaliação da coagulase é um ensaio microbiológico clássico amplamente utilizado na identificação e diferenciação de bactérias do gênero *Staphylococcus*, especialmente para distinguir *Staphylococcus aureus*, que é coagulase-positivo, dos estafilococos coagulase-negativos. O princípio da técnica baseia-se na capacidade de algumas cepas bacterianas produzirem a enzima coagulase, a qual reage com o fator coagulase-reativo presente no plasma, formando um complexo denominado estafilotrombina (Mattionie *et al.*, 2022). esse complexo é

capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, resultando na coagulação do plasma, fenômeno que pode ser observado visualmente e utilizado como critério para interpretação do teste. A produção de coagulase está diretamente associada à virulência bacteriana, uma vez que a formação da fibrina pode proteger o microrganismo da ação do sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a persistência da infecção (Camacho Silvas, 2025).

Do ponto de vista clínico e microbiológico, o teste da coagulase possui grande relevância, pois *Staphylococcus aureus* é um patógeno importante, frequentemente envolvido em infecções cutâneas, abscessos, septicemias, pneumonias, endocardites e infecções hospitalares, enquanto os estafilococos coagulase-negativos, embora possam causar infecções oportunistas, fazem parte majoritariamente da microbiota normal da pele e mucosas. Dessa forma, a identificação correta dessas bactérias contribui tanto para o diagnóstico laboratorial quanto para a escolha da conduta terapêutica adequada (Dalmolin *et al.*, 2022).

A avaliação da coagulase pode ser realizada por dois métodos principais: o teste em lâmina e o teste em tubo. O teste em lâmina detecta a coagulase ligada à parede celular bacteriana, também conhecida como fator de aglutinação, e baseia-se na observação da aglutinação imediata das células bacterianas quando em contato com o plasma. Trata-se de um método rápido e simples, porém menos sensível, podendo apresentar resultados falso-negativos em cepas que produzem apenas coagulase livre. Já o teste da coagulase em tubo detecta a coagulase livre, secretada no meio extracelular, sendo considerado o método de referência devido à sua maior sensibilidade e especificidade (Cristaldo, 2022).

No teste em tubo, utiliza-se plasma, geralmente humano ou de coelho, previamente anticoagulado, ao qual é adicionada uma colônia bacteriana recente, proveniente de uma cultura com 18 a 24 horas de incubação. Após a homogeneização, o tubo é incubado a 35–37 °C e avaliado quanto à formação de coágulo após quatro horas, podendo a leitura ser estendida até 24 horas quando não há coagulação inicial. A presença de um coágulo total ou parcial, que não se desfaz com a inclinação do tubo, é interpretada como resultado positivo, enquanto a manutenção do plasma em estado líquido indica resultado negativo (Colouna *et al.*, 2023).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, recomenda-se o uso de controles positivos e negativos, como cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente. Além disso, alguns cuidados devem ser observados, como o uso de plasma dentro do prazo de validade, a correta incubação e a utilização de culturas bacterianas jovens, uma vez que culturas antigas podem apresentar redução na produção de coagulase. Apesar de suas limitações, a técnica de avaliação da coagulase permanece como um método simples,

acessível e fundamental na rotina da microbiologia clínica, contribuindo de forma significativa para a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus* e para o diagnóstico laboratorial de infecções estafilocócicas (Rodríguez, 2023).

### 3.9 Atividade Anticatalase

A avaliação da atividade anticatalase é uma técnica empregada para investigar a capacidade de compostos naturais ou sintéticos em inibir a enzima catalase, um dos principais sistemas de defesa antioxidante de microrganismos. A catalase é uma enzima heme-dependente responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio molecular, desempenhando papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo. Em bactérias patogênicas, essa enzima contribui significativamente para a sobrevivência frente às espécies reativas de oxigênio geradas tanto pelo metabolismo celular quanto pela ação de antibióticos e pelo sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, a inibição da catalase leva ao acúmulo intracelular de peróxido de hidrogênio, aumentando a toxicidade oxidativa e podendo potencializar a ação de agentes antimicrobianos (Batista *et al.*, 2024).

O princípio da técnica baseia-se na quantificação direta ou indireta da atividade catalítica da enzima por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio. Na presença de catalase ativa, o  $H_2O_2$  é rapidamente convertido em água e oxigênio, resultando na liberação de bolhas visíveis ou na diminuição da absorbância da solução quando monitorada por métodos espectrofotométricos. Quando a enzima é inibida por um composto teste, observa-se redução dessa decomposição, refletida por menor formação de oxigênio ou maior concentração residual de peróxido de hidrogênio no meio reacional (Almeida *et al.*, 2023).

Experimentalmente, a técnica pode ser conduzida utilizando suspensões bacterianas, extratos enzimáticos ou catalase purificada. As culturas bacterianas são geralmente incubadas com o composto teste em concentrações subinibitórias, de modo a evitar efeitos bactericidas diretos que possam interferir na interpretação dos resultados. Após o período de incubação, o peróxido de hidrogênio é adicionado ao sistema, e a atividade da catalase é avaliada. Em abordagens qualitativas, a inibição enzimática é inferida visualmente pela diminuição da formação de bolhas de oxigênio. Já em ensaios quantitativos, a decomposição do  $H_2O_2$  é monitorada espectrofotometricamente, geralmente a 240 nm, permitindo o cálculo da taxa de reação e da porcentagem de inibição da atividade catalase em relação ao controle não tratado (Repik *et al.*, 2022).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, a técnica requer a inclusão de controles adequados, como controles negativos sem tratamento, controles positivos com inibidores conhecidos da catalase e controles de solvente, assegurando que a inibição observada seja atribuída exclusivamente ao composto avaliado. A interpretação dos dados considera que uma maior quantidade residual de peróxido de hidrogênio ou uma menor taxa de decomposição indica maior atividade anticatalase (Magalhães *et al.*, 2025).

Do ponto de vista biológico e farmacológico, a avaliação da atividade anticatalase é particularmente relevante em estudos de modulação da atividade antimicrobiana e de resistência bacteriana. A inibição dessa enzima compromete a capacidade do microrganismo de neutralizar o estresse oxidativo, tornando-o mais suscetível à ação de antibióticos e às defesas do hospedeiro. Assim, essa técnica tem sido amplamente utilizada na triagem de compostos com potencial antivirulência e como ferramenta para elucidar mecanismos envolvidos na sensibilização de bactérias resistentes a agentes terapêuticos (Biagioni *et al.*, 2023).

### 3.10 Teste *in vivo* em modelos de Zebrafish

O zebrafish é um organismo modelo amplamente empregado em estudos de infecção bacteriana devido à elevada similaridade genética com humanos, à transparência óptica das larvas, ao rápido desenvolvimento embrionário e à possibilidade de manutenção em larga escala com baixo custo. Essas características permitem a visualização direta da progressão da infecção, da resposta imune do hospedeiro e do efeito terapêutico de agentes antibacterianos em tempo real. Em testes antibacterianos, as larvas de zebrafish, geralmente entre 2 e 5 dias pós-fertilização, são preferidas, pois nesse estágio o sistema imune inato já está funcional, possibilitando a análise da interação patógeno-hospedeiro (Adhish, 2023).

A avaliação da atividade antibacteriana em zebrafish inicia-se, em geral, com a infecção experimental das larvas por bactérias patogênicas de interesse clínico, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*. A infecção pode ser realizada por microinjeção direta da suspensão bacteriana em compartimentos específicos, como o saco vitelínico, a corrente sanguínea ou a cavidade pericárdica, ou ainda por exposição das larvas à bactéria em meio aquoso, simulando uma infecção sistêmica ou localizada. A escolha da via de infecção depende do objetivo do estudo e do tipo de patogenicidade a ser avaliada (Doyle, 2022).

Após o estabelecimento da infecção, os compostos antibacterianos em estudo são administrados nas larvas, geralmente por adição direta à água do aquário ou do poço de



microplacas, permitindo a absorção do fármaco por difusão passiva através da pele e das brânquias. Em alguns casos, a administração pode ocorrer por microinjeção, especialmente quando se deseja avaliar doses precisas ou compostos com baixa permeabilidade. A atividade antibacteriana é então avaliada por diferentes parâmetros, incluindo a taxa de sobrevivência das larvas, a redução da carga bacteriana, a atenuação de sinais clínicos de infecção e a recuperação do comportamento normal dos organismos (González-Rosa, 2022).

A quantificação da carga bacteriana pode ser realizada por métodos clássicos, como a recuperação de bactérias viáveis por plaqueamento em meio sólido após maceração das larvas, ou por técnicas mais avançadas, como o uso de cepas bacterianas fluorescentes e análise por microscopia de fluorescência. Essa abordagem permite a visualização espacial da infecção e a avaliação direta da eficácia do tratamento antibacteriano ao longo do tempo. Além disso, a transparência das larvas possibilita o monitoramento da resposta imune, como o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (Shenoy *et al.*, 2022).

Um aspecto fundamental dos testes antibacterianos em zebrafish é a avaliação simultânea da toxicidade dos compostos. Alterações morfológicas, edemas, malformações, alterações cardíacas e redução da taxa de sobrevivência podem indicar efeitos tóxicos, permitindo a determinação de janelas terapêuticas seguras. Dessa forma, o modelo possibilita a distinção entre a morte bacteriana decorrente da ação antibacteriana e a mortalidade do hospedeiro causada por toxicidade do composto (Qu, 2024).

Em conjunto, os testes antibacterianos com zebrafish representam uma abordagem robusta e translacional, pois integram dados de eficácia, toxicidade e resposta imune em um único sistema *in vivo*. Esse modelo é particularmente valioso na triagem inicial de novos agentes antibacterianos, produtos naturais e moduladores da resistência bacteriana, reduzindo a dependência de modelos animais superiores e fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento pré-clínico de novos fármacos (Chia *et al.*, 2024).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais representa uma etapa fundamental na prospecção de novas estratégias terapêuticas frente ao crescente desafio da resistência bacteriana. Ao longo desta revisão, foi possível evidenciar que uma ampla variedade de metodologias tem sido empregada para investigar o potencial antibacteriano de extratos, frações e compostos isolados de origem natural, abrangendo desde ensaios clássicos de triagem inicial até abordagens quantitativas, mecanísticas e modelos *in vivo* e alternativos.

Os métodos de difusão em ágar e os ensaios de diluição permanecem como ferramentas essenciais para a detecção e quantificação da atividade antibacteriana, enquanto testes de viabilidade, curvas de crescimento e análises mecanísticas têm contribuído para uma compreensão mais aprofundada dos modos de ação envolvidos. Além disso, os estudos de modulação da atividade antibiótica destacam-se como uma estratégia promissora, ao demonstrar o potencial dos produtos naturais em atuar sinergicamente com antibióticos convencionais e em interferir em mecanismos de resistência, como a atividade de bombas de efluxo.

Entretanto, esta revisão também evidencia desafios metodológicos relevantes, especialmente relacionados à complexidade química dos produtos naturais, à variabilidade experimental e à ausência de padronização entre os protocolos utilizados. Essas limitações reforçam a necessidade de uma abordagem integrada, que combine metodologias complementares, controle rigoroso de parâmetros experimentais e adoção de diretrizes internacionais, a fim de garantir maior reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados.

Dessa forma, a integração entre ensaios *in vitro*, análises mecanísticas e modelos *in vivo* alternativos emerge como uma estratégia essencial para a validação do potencial antibacteriano dos produtos naturais. O aprimoramento e a padronização das metodologias de avaliação contribuirão significativamente para o avanço do conhecimento na área e para o desenvolvimento racional de novos agentes antibacterianos, capazes de auxiliar no enfrentamento da resistência microbiana.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Jaime Antonio; DA ROCHA NOGUEIRA, Joseli Maria. Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana. *RBAC*, v. 54, n. 3, p. 228-234, 2022.
- ADHISH, Mazumder; MANJUBALA, I. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models. *Heliyon*, v. 9, n. 3, 2023.
- ALMEIDA, Wesley Natam Martins et al. Impactos da utilização de antimicrobianos na resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura com abordagem da saúde única. *Revista Universitária Brasileira*, v. 1, n. 2, 2023.
- BATISTA, Paulo Henrique Mariano et al. Implicações da resistência antimicrobiana na prática clínica. *International Journal of Health Management Review*, v. 10, n. 1, p. e356-e356, 2024.
- BEZERRA, Raquel Vieira et al. Avaliação da atividade antibacteriana do monoterpene (r)-(+)-citronelal contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, v. 51, n. 2, p. 691-702, 2022.

BIAGIONI, M. C. et al. Identificação de Enterobactérias e Resistência Antimicrobiana em Maritacas (*Psittacara leucophthalmus*) de Vida Livre. *Ars Veterinaria*, v. 39, n. 4, p. 105-109, 2023.

CAMACHO SILVAS, Luis Arturo. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de salud pública*, v. 97, p. e202302013, 2025.

CHIA, Kelda et al. Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 15, p. 940484, 2022.

CRISTALDO, Yasmim Cabral; IRMÃO, Mariana Ojeda Souza; MATUO, Renata. O uso indiscriminado de antibióticos e sua relação com a resistência bacteriana. *Tópicos especiais em ciências da saúde: teoria, métodos e práticas*, v. 5, n. 1, p. 117-128, 2022.

CLSI, CLSI M100-Ed35 (2025) – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – 35th Edition.

CONDE, Maria Eduarda Rocha et al. Avaliação da combinação de um composto sintético com potencial antimicrobiano com vancomicina e linezolida para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* em modelos in vitro e in vivo. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, p. 102825, 2023.

COLOUNA, Amanda Alves Teodoro et al. O uso indiscriminado de antibióticos na resistência bacteriana infantil. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 9, n. 9, p. 3686-3695, 2023.

DALMOLIN, Jaqueline et al. Mecanismos de expressão de resistência aos antibióticos e saúde pública. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 26, n. 3, 2022.

DA SILVA, Patriky Pereira et al. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* frente *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico *Tambaqui* (*Colossoma macropomum*). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 25, n. 5, p. e20117-e20117, 2025.

DA SILVA COSTA, Ester et al. Fitopatometria da murcha bacteriana em gerações de tomateiro. *Diversitas Journal*, v. 8, n. 4, p. 3147-3158, 2023.

DA LUZ FERREIRA, Diógenes et al. Controle de qualidade e avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de amostras comerciais do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre *E. coli*. *Revista RG News*, v. 8, p. 2, 2022

DE ALBUQUERQUE, Alessandra Vieira et al. Estratégias associadas a prevenção da resistência de antimicrobianos no âmbito hospitalar: Revisão sistemática. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. e23811729990-e23811729990, 2022.

DE PINHO, Lucimary Leite et al. Uso indiscriminado de antibióticos e o risco de resistência bacteriana: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 1, p. 438-452, 2024.

DE SOUSA, Aline et al. Géis, extratos naturais e nanopartículas de Ag para ação bactericida Gels, natural extracts and Ag nanoparticles for bactericidal action. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 1, p. 7989-8001, 2022.

DE SOUZA, Regivaldo Silva et al. Baixa concentração de trans-resveratrol inibe o crescimento e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02. *Brazilian Applied Science Review*, v. 7, n. 2, p. 416-428, 2023.

DE MELO SANTANA, Hortência Biatriz; DE SOUZA MONTEIRO, Andréa. Comparação do mecanismo de heterorresistência em *Serratia marcescens* por time kill curve frente ao meropeném. *RBAC*, v. 54, n. 1, p. 50-54, 2022

DE OLIVEIRA CARVALHO, Richard Luiz et al. Padronização da luz azul antimicrobiana: a irradiância como determinante da inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*. *Aesthetic Orofacial Science*, v. 6, n. 4, p. 33-41, 2025.

DE SOUZA, Marcos; CORTEZ, Lumena Cristina; MANCA, Ricardo. Resistência microbiana na perspectiva da saúde pública e ambiental. *Revista Interciência e Sociedade*, v. 10, n. extra, 2025.

DOYLE, Jillian M.; CROLL, Roger P. A critical review of zebrafish models of Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 835827, 2022.

DE OLIVEIRA, Anselmo Gomes; SILVEIRA, Damaris. Resistência microbiana a antibióticos: um desafio global de difícil resolução. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, v. 34, n. 3, p. 199-201, 2022.

GAMBOA, Yoel López et al. Resistencia microbiana a los antibióticos: um problema de salud creciente. *Revista Científica Hallazgos*, v. 7, n. 1, p. 103-114, 2022.

GONÇALVES, APAA; PEREIRA, P. S.; GUERRA, MSB. *Cymbopogon citratus*: potencialização de antibióticos associados ao óleo essencial. *Revista Saúde em Foco*, n. 11, p. 507-515, 2019.

GONZÁLEZ-ROSA, Juan Manuel. Zebrafish models of cardiac disease: From fortuitous mutants to precision medicine. *Circulation research*, v. 130, n. 12, p. 1803-1826, 2022.

JOTIC, Ana et al. Antibiofilm Effects of Novel Compounds in Otitis Media Treatment: Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 23, p. 12841, 2024.

LÁSCARIS, Matheus Péricles Silva et al. Sinergismo microbiano entre óleos essenciais e conservantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 3, p. e32011326535-e32011326535, 2022.

LARROSA, María Nieves et al. Recomendaciones del Comité Español del Antibiógrama (COESANT) para la realización de los Informes de Sensibilidad Antibiótica Acumulada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 41, n. 7, p. 430-435, 2023.

LEAL, Eduarda Fernandes et al. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo ca-ma 2 contra *porphyromonas gingivalis* ATCC 49417. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 28, p. 103825, 2024.

LIMA, Vanessa Carreiro Cabral et al. A importância do controle das infecções hospitalares para minimizar a resistência bacteriana. *Epitaya E-books*, v. 1, n. 20, p. 66-99, 2022.

MAGALHÃES, Vanessa et al. Desafios no combate à resistência antimicrobiana: Abordagem global e local. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 7, n. 1, p. 248-257, 2025.

MATTIONI, Alícia Christmann; JUNIOR, Luiz Fernando Rodrigues. Modificações da superfície de titânio: revisão de métodos e seu efeito osteointegrador e antibiofilme. *Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas*, v. 23, n. 1, p. 59-74, 2022.

NIKOLIC, Isidora et al. Um método de tabuleiro de xadrez otimizado para detecção de sinergia fago-antibiótico. *Viruses*, v. 14, n. 7, p. 1542, 2022.

OLIVEIRA, Samuel Santana et al. Avaliação da atividade antibiofilme de sobrenadantes de cultura de *limosilactobacillus fermentum* tcuescoi e *lactiplantibacillus plantarum* tcuesco2 frente a *Acinetobacter baumannii* NCTC 13304. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, p. 102819, 2023.

PAZ, Isabel Cristina Padula et al. Cinética de crescimento de *bacillus amyloliquefasciens* bib 0129 em diferentes concentrações de sacarose e extrato de levedura. *Acta Biologica Brasiliensia*, v. 8, n. 2, p. 69-81, 2025.

QU, Junying et al. Advancing thyroid disease research: The role and potential of zebrafish model. *Life Sciences*, v. 357, p. 123099, 2024.

REPIK, Caio Ferreira et al. A resistência antimicrobiana na produção animal: alerta no contexto da saúde única. *Pubvet,[SL]*, v. 16, n. 4, p. 1-6, 2022.

RODRÍGUEZ, Erika Andrea; JIMÉNEZ-QUICENO, Judy Natalia. Resistencia bacteriana a antibióticos en ambientes acuáticos: origen e implicaciones para la salud pública. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, v. 41, n. 3, 2023

20

ROSA, Sofia Clara Lage; CARVALHO, Nathália Irffi; DUANI, Helena. Aprendizado de máquinas para predição de resistência microbiana. *Journal of Health Informatics*, v. 16, n. Especial, 2024

SANTOS, Renata Rangel Ferreira et al. Os impactos da pandemia no Brasil na resistência a antibióticos: uma revisão de Literatura. *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, v. 11, n. 1, p. 1768-1771, 2023.

SILVA, João Luis Almeida da et al. Resistência microbiana a medicamentos em uma Instituição de Longa Permanência para Idosos. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 35, p. eAPE03751, 2022..

SHENOY, Avinash et al. The brilliance of the zebrafish model: perception on behavior and Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, v. 16, p. 861155, 2022.

SUKMARINI, Linda; ATIKANA, Akhirta; HERTIANI, Triana. Antibiofilm activity of marine microbial natural products: potential peptide-and polyketide-derived molecules from marine microbes toward targeting biofilm-forming pathogens. *Journal of Natural Medicines*, v. 78, n. 1, p. 1-20, 2024.

VIANA, Eulália Carla et al. Relação da resistência antimicrobiana com o uso inadequado de antibióticos. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 9, n. 8, p. 997-1018, 2023.

XAVIER, Lilian de Arruda Lima et al. Perfil de resistência microbiana em uroculturas de pacientes internados em hospital militar de Pernambuco. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 26, p. 101953, 2022.

WILSMANN, Daiane Elisa et al. Atividade antibiofilme in vitro da água eletroquimicamente ativada contra biofilmes de *Salmonella* Heidelberg em superfícies de poliestireno. *Ciência Animal Brasileira*, v. 25, p. 78564E, 2024.