

UNILEÃO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CICERO LUCAS MARQUES DE MACEDO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA E  
TOXICOLÓGICA DO ÓLEO E EXTRATO DOS GOMOS *Citrus bergamia* (Risso &  
Poiteau)**

Juazeiro do Norte – CE  
2024

CICERO LUCAS MARQUES DE MACEDO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO E EXTRATO DOS GOMOS *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau)**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Me. José Walber Gonçalves Castro

CICERO LUCAS MARQUES DE MACEDO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO E EXTRATO DOS GOMOS *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau)**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Me. José Walber Gonçalves Castro

**Data de aprovação:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof.:** \_\_\_\_\_

**Me. José Walber Gonçalves Castro**  
**Orientador**

**Profa.:** \_\_\_\_\_

**Me. Plinio Bezerra Palacio**  
**Examinador 1**

**Profa.:** \_\_\_\_\_

**Esp. Lariza Leisla Leandro Nascimento**  
**Examinador 2**

# PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA E TOXICOLÓGICA DO ÓLEO E EXTRATO DOS GOMOS *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau)

Cicero lucas marques de macedo<sup>1</sup>, José Walber Gonçalves Castro<sup>2</sup>

## RESUMO

Análise do perfil químico e atividades antibacteriana, modificadora e toxicológica do óleo e extrato dos gomos *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau). Os frutos foram selecionados e levados para o processo de liofilização, logo após submersos em etanol P.A para extração a frio para obtenção do extrato bruto. Em seguida, a prospecção fitoquímica foi realizada para identificar classes de metabólitos secundários. Os gomos foram triturados e submetidos a hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger* modificado para obtenção do óleo essencial. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição frente a bactérias Gram positivas e negativas. Por fim o potencial modificador foi determinado utilizando os antibióticos da classe aminoglicosídeos (Amicacina e gentamicina) e beta-lactâmicos (Benzil penicilina e cefalotina). A atividade toxicológica foi realizada utilizando *Artemia salina* (Leach), através de testes em diferentes concentrações do produto. Os resultados mostram que nas bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), a principal atividade foi a sinergia, destacada em *E. coli* 06 com  $\beta$ -lactâmicos e o óleo essencial. Nas Gram-positivas, a principal atividade foi a modificação da CIM de gentamicina combinada com o extrato e o óleo essencial. A análise fitoquímica revelou flavonoides, taninos e monoterpenos, com propriedades antibacterianas. Esses compostos desestabilizam membranas e inibem enzimas essenciais. Em Gram-negativas, observou-se sinergia entre  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos; já nas Gram-positivas, a modificação da CIM foi evidente com gentamicina. Os resultados reforçam o potencial terapêutico de compostos naturais e a importância de explorar atividades com antimicrobianos para criar estratégias contra infecções.

**Palavras-chave:** Antibacteriano. Bergamota. *Citrus bergamia*. Potencial modificador. Perfil químico.

## CHEMICAL PROFILE AND ANTIBACTERIAL, MODULATORY, AND TOXICOLOGICAL ACTIVITIES OF THE OIL AND EXTRACT FROM *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau) SEGMENTS

### ABSTRACT

Analysis of the Chemical Profile and Antibacterial, Modulatory, and Toxicological Activities of the Oil and Extract from *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau) Segments. The fruits were selected and subjected to a lyophilization process, followed by immersion in P.A ethanol for cold extraction to obtain the crude extract. Subsequently, a phytochemical screening was conducted to identify classes of secondary metabolites. The segments were crushed and subjected to hydrodistillation using a modified Clevenger-type apparatus to obtain the essential oil. The antibacterial activity was evaluated using the microdilution method against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The modulatory potential was determined by combining the extract and essential oil with antibiotics from the aminoglycoside class (Amikacin and Gentamicin) and the beta-lactam class (Benzylpenicillin and Cefalotin). The toxicological activity was assessed using *Artemia salina* (Leach) through tests with different product concentrations. The results revealed that, in Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*),

<sup>1</sup>Discente do curso de Biomedicina, cicerolucasm@gmail.com, Centro Universitário Leão Sampaio

<sup>2</sup>Docente do curso de Biomedicina, josewalber@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário Leão Sampaio

the main activity observed was synergy, particularly in *E. coli* 06 with beta-lactams and the essential oil. For Gram-positive bacteria, the main activity was the modification of the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of gentamicin in combination with the extract and essential oil. Phytochemical analysis identified the presence of flavonoids, tannins, and monoterpenes, which are known for their antibacterial properties. These compounds destabilize bacterial membranes and inhibit essential enzymes. In Gram-negative bacteria, synergy was observed between beta-lactams and aminoglycosides, while in Gram-positive bacteria, a significant modification of the MIC was observed with gentamicin. These results highlight the therapeutic potential of natural compounds and emphasize the importance of exploring their interactions with antimicrobials to develop new strategies against infections.

**Keywords:** Antibacterial. Bergamot. *Citrus bergamia*. Modulatory potential. Chemical profile.

## 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia tem ganhado destaque como uma abordagem terapêutica alternativa, oferecendo uma série de benefícios em comparação com os medicamentos convencionais. Reconhecidos por sua menor incidência de efeitos adversos, os medicamentos fitoterápicos têm conquistado a confiança tanto de médicos quanto de pacientes. Sua utilização abrange uma ampla variedade de condições de saúde, abrangendo desde o tratamento do câncer até distúrbios hepáticos, proporcionando uma opção natural e acessível (Guo *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

A partir disso, a diversidade e distribuição geográfica da família Rutaceae oferecem um vasto campo de estudo para a fitoterapia. Muitas espécies dentro dessa família têm sido tradicionalmente utilizadas como fontes de medicamentos em diversas culturas ao redor do mundo. A floração em plantas perenes é influenciada por diversos fatores, como a carga de frutos e as condições ambientais. Além disso, a relação entre a carga de frutos e o processo de floração em plantas perenes podem alterar componentes ativos e conseqüentemente o seu uso como fitoterápico, vindo a depender das características da espécie (Junior *et al.*, 2023; Mesejo *et al.*, 2021).

Dentre as principais espécies capazes de serem utilizadas como fitoterápicos podemos destacar as pertencentes a família Rutaceae sendo os cítricos seu gênero de destaque, como laranjas, toranjas e tangerinas, na qual, são principalmente misturas de espécies ancestrais, especialmente pomelo (*Citrus maxima*) e tangerina (*Citrus reticulata*). As variedades mais conhecidas incluem a laranja doce (*Citrus sinensis*), limão (*Citrus limon*) e a toranja (*Citrus paradisi*) (Ibeas *et al.*, 2021; Velasco; Licciardello, 2014).

Desta forma é possível destacar a bergamota (*Citrus bergamia*), uma pequena árvore perene que pode crescer até 5 metros de altura, com caule ereto, ramos irregulares e folhas aromáticas. Suas folhas são simples, alternadas, coriáceas, e apresentam glândulas de óleo

visíveis. O fruto trata-se de uma baga ligeiramente achatada, varia de subglobosa a piriforme, com casca verde brilhante que se torna amarelo pálido quando maduro, contendo numerosas glândulas de óleo essencial (Rapisarda; Germanò, 2013; Quirino *et al.*, 2022; Tsiokanos *et al.*, 2021).

O interesse em compostos de origem natural como fontes promissoras para lidar com a crescente resistência antimicrobiana nos últimos anos, têm enfrentado desafios importantes e proporcionado novas oportunidades na pesquisa farmacêutica. Ao longo da história, os produtos naturais e seus derivados estruturais desempenharam um papel crucial na terapêutica, oferecendo contribuições substanciais no tratamento de condições como câncer e doenças infecciosas (Atanasov *et al.*, 2021). Diante disso é de suma importância para a comunidade científica e o público geral, pois o gradual aumento de bactérias multirresistentes a antibióticos, torna a procura por métodos que ultrapassem essa capacidade bacteriana e possa minimizar a mortalidade durante infecções, assim como podendo auxiliar para a diminuição do uso indiscriminado de partes da bergamota sem o conhecimento adequado, evitando o uso de placebo para o público que acredita em suas capacidades antimicrobianas. Por fim esta pesquisa tem como objetivo analisar o perfil químico e atividades antibacteriana, modificadora e toxicológica do óleo e extrato dos gomos *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau).

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 METODOLOGIA**

#### **2.1.1 Tipo e local de estudo**

Esta pesquisa tratou-se de um estudo experimental, que incluiu uma pré-tese para testar uma hipótese. Os resultados encontrados contribuíram no aprimoramento de novas técnicas científicas que também tiveram finalidade de descobrir algo inexplorado, variáveis contidas neste estudo foram manipuladas a fim de permitir o efeito e a causas de um determinado evento (Dodt *et al.*, 2015). Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e Bromatologia do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, Campus Saúde.

### **2.1.2 Seleção, coleta e identificação do material vegetal**

Os frutos frescos de *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau) foram coletadas no sítio Malhada, Barbalha - CE e levadas para o laboratório de microbiologia do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO no município de Juazeiro do Norte – CE, para realização dos testes. Em seguida foram pré-selecionados de acordo com o estado de amadurecimento e condições do fruto, após essa seleção uma exsicata do material botânico foi depositada no herbário Dárdaro de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA), para a obtenção do registro do tombamento.

### **2.1.3 Preparação do extrato**

Os segmentos dos frutos da espécie *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau) foram selecionados e em seguida triturados para aumentar a superfície de contato, em seguida foi realizado o processo de liofilização, em decorrência da alta concentração de água, após a retirada da água o material foi submerso em etanol P.A para extração a frio por um período de 72 horas, de acordo com Simões *et al.* (2010). A mistura foi submetida a filtração para retirada das impurezas, e a destilação do solvente ocorreu em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura controlada entre 30-40 °C. O rendimento do extrato foi calculado com base no peso seco do extrato em comparativo com o peso dos frutos antes da extração com solvente.

#### **2.1.3.1 Prospecção fitoquímica**

A prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia de Matos (2009) e Simões *et al.* (2010) com o intuito de elucidar classes de metabólitos secundários como flavonóides, alcaloides, taninos, dentre outros. Esse ensaio baseou-se na observação visual, intensificação da cor ou formação de precipitado após adição de reagentes específicos nas soluções das amostras.

### **2.1.4 Extração do óleo essencial**

Os segmentos ainda frescos foram triturados e submetidos a hidro destilação em aparelho tipo *Clevenger* modificado, por 2 horas. O rendimento foi obtido com base no peso do

óleo em relação ao peso do material antes do procedimento de extração. O óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e armazenado em frasco âmbar exposto à refrigeração até o momento das análises (Simões *et al.*, 2010).

### **2.1.5 Avaliação antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)**

A atividade antibacteriana foi avaliada através do método de microdiluição com base no CLSI (2012). Foram utilizadas bactérias padrão, sendo duas Gram (+): *Staphylococcus aureus* ATCC 12624 e *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e duas Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Além disso foi utilizado bactérias multirresistentes: *Staphylococcus aureus* 10, *Enterococcus faecalis* isolado clínico, *Escherichia coli* 06 e *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico. Todas as linhagens foram concedidas pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais-LPPN da Universidade Regional do Cariri-URCA mediante a solicitação, disponibilidade e aprovação da coordenação do laboratório.

As linhagens bacterianas foram ativadas em meio *Brain Heart Infusion Broth* (BHI 3,8 %) e mantidas na estufa por 24 horas. Após o primeiro cultivo o inóculo foi padronizado a partir da concentração de aproximadamente de 1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (turbidez da escala de McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída em caldo BHI a 10 % e volumes de 100 µL foram adicionados e homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido da concentração de 1024 µg/ mL do produto vegetal. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico utilizando 25 µL de resazurina sódica (0,01%) após o período de incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento bacteriano (Salvat, 2001).

### **2.1.6 Avaliação do potencial modificador**

O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do composto natural através de microdiluição em triplicata. Para avaliar a atividade modificadora foi utilizada a CIM/8, do extrato etanólico e óleo essencial frente aos antibióticos da classe aminoglicosídeos (Amicacina e gentamicina) e beta-lactâmicos (Benzil penicilina e cefalotina).

A quantidade de óleo essencial ou extrato etanólico foi calculada pela concentração sub inibitória (CIM/8). Os inóculos bacterianos em BHI a 10 % foram distribuídos na microplaca seguido da microdiluição de 100 µL das soluções de antibióticos (1024 µg/ mL). Houve a realização de seguidas diluições obtendo as concentrações do antibiótico que variam de 512 a 0,5 µg/ mL.

O teste foi monitorado com um controle positivo contendo apenas os antibióticos e os microrganismos. As placas microdiluídas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a leitura foi procedida com auxílio resazurina sódica como descrito anteriormente (Coutinho *et al.*, 2008).

### **2.1.7 Avaliação da atividade toxicológica**

A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo *Artemia salina* (Leach). O teste foi realizado em triplicata, com as concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL, acompanhado de um controle positivo preparado com dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), e um controle negativo com água marinha. Após 24 horas foi feita a leitura de larvas sobreviventes. O cálculo da CL<sub>50</sub> foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando CL<sub>50</sub> < 1000 µg/mL (Meyer *et al.*, 1982; Hirota *et al.*, 2012).

### **2.1.8 Análises estatísticas**

Os resultados dos ensaios foram avaliados através do modelo de regressão linear e teste de *Tukey* por comparação múltipla, sendo analisados pelo ANOVA bidirecional seguida pelo teste de *Bonferroni* utilizando *software GraphPad Prism 7.0*. Os resultados em p < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

## **2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.2.1 Perfil químico**

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico do liofilizado dos frutos de *Citrus bergamia* apresentou diversos compostos em sua composição, estando identificados no Quadro 1.

**Quadro 1:** Perfil químico do Extrato Etanólico do liofilizado dos frutos *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau) (E.E.L.F.C.B).

CLASSE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>E.E.L.F.C.B</b>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1: Fenóis; 2: Taninos hidrolisáveis; 3: Taninos condensados; 4: Antocianinas; 5: Antocianidinas; 6: Flavonas; 7: Flavonóis; 8: Xantonas; 9: Chalconas; 10: Auronas; 11: Flavononóis; 12: Leucoantocianidinas; 13: Catequinas; 14: Flavononas; 15: Alcalóides.

(+) presente; (-) ausente

**Fonte:** Própria do autor.

A análise fitoquímica da espécie *Citrus bergamia* revela uma composição rica em compostos como flavonoides, polifenóis e taninos, os quais desempenham papéis importantes em atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacteriana como evidenciado por Gattuso *et al.* (2023), Remigante *et al.* (2023) e Russo *et al.* (2021).

De acordo com Pisoschi; Pop (2015) o estresse oxidativo ocorre quando há um excesso de espécies reativas de oxigênio que ultrapassam a capacidade antioxidante celular, causando danos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Segundo Kumar; Pandey (2013) a capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio é uma atividade biológica presentes nos flavonoides, devido a sua capacidade de doação de elétrons para a formação de radicais estáveis.

Os taninos têm um efeito antimicrobiano, na qual, desestabilizam membranas bacterianas e atuam na precipitação de proteínas, o que interfere nos processos metabólicos bacterianos. Os taninos mostraram-se eficazes em algumas cepas Gram-positivas, como *Staphylococcus spp* (Akiyama, 2001).

Em estudos realizados por Baron *et al.* (2021), determinou a presença de 4.5% de fenóis, 21,6 % de flavonas e 58,2% de flavononas além de outros compostos não fenólicos, corroborando para o resultado indicado. Alguns compostos flavonoides como hesperitina, narigenina, neoeriocitrina e apigenina foram evidenciados no suco da bergamota por Vedova *et al.* (2023).

Segundo Baron *et al.* (2021) e Caputo *et al.* (2020) compostos como a naringina e a neoeriocitrina são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e protetoras vasculares, enquanto compostos como o limoneno e o  $\gamma$ -terpineno contribuem para atividades antibacterianas e anti-inflamatórias. Estudo realizado por Quirino (2015), avalia a concentração

de 30,20% de limoneno e 11,95% de  $\gamma$ -terpineno enquanto monoterpenos cíclicos encontrados no extrato destilado da bergamota. Esses compostos atuam potencialmente na inibição de enzimas bacterianas, modificação da permeabilidade da membrana, diminuição de porinas na membrana celular, prevenção da formação de biofilme bacteriano e na desestabilização de membranas celulares de patógenos segundo Ioannou; Baliou (2024) e Jucá *et al.* (2020).

Embora alguns compostos não encontrados como antocianinas exibam atividade antibacteriana, seu mecanismo costuma ser mais leve ou atuar sinergicamente em concentrações específicas, possivelmente inibindo o crescimento bacteriano sem eliminá-lo completamente como indicado por Liga; Paul; Fráncisc Péter (2023).

### 2.2.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do extrato liofilizado da bergamota e do óleo essencial foi testada contra quatro cepas de bactérias multirresistentes (*Staphylococcus aureus* 10, *Enterococcus faecalis* isolado clínico, *Escherichia coli* 06 e *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico) e quatro cepas ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 12624, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442). A concentração inibitória mínima encontrada foi acima de 1024ug/ml para todas as cepas.

Os microrganismos testados apresentaram baixa sensibilidade ao extrato liofilizado dos gomos da bergamota. Tais resultados indicam que a presença dos compostos bactericidas, como flavonóis e taninos, em baixas concentrações são incapazes de inibir o crescimento das cepas multirresistentes e das cepas padrão, a ausência de antocianinas e antocianidinas combinado com compostos antioxidantes como os polifenóis pode estar relacionado a baixa susceptibilidade encontrada nos testes como indica Liga; Paul; Fráncisc Péter (2023) e Shamsudin *et al.* (2022).

Estudos realizados por Aparna *et al.* (2014) e Tian *et al.* (2016) afirmam que embora compostos como flavonóides e alcaloides presentes em *Citrus bergamia* tenham potencial antibacteriano, as bombas de efluxo em Gram-negativas tornam esses compostos menos eficazes em comparação com sua ação em Gram-positivas. Pesquisas indicam que mesmo em altas concentrações, muitos desses fitoquímicos são rapidamente expulsos pelas bombas de efluxo em *P. aeruginosa* e *E. coli*, reduzindo a sua ação antimicrobiana.

Em testes realizados por Fratianni *et al.* (2019) indicam que a atividade metabólica de cepas como *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram inibidas em concentrações iguais ou

superiores à 7.0g/ml, sendo a *P. aeruginosa* reportada como a atividade antibacteriana menos efetiva.

A resistência de bactérias Gram negativas esta principalmente relacionada a conformação de sua membrana externa, na qual, restringe a permeabilidade de inúmeros compostos antimicrobianos, como os flavonóis e limoneno, que em concentrações abaixo de 1024ug/ml do produto é incapaz de penetrar em quantidade letal para esses patógenos, principalmente em cepas multirresistentes, tais mecanismos são descritos por Cebi; Erarslan (2023) e Thobunluepop *et al.* (2009).

A CIM encontrada por Adamczak; Ożarowski; Karpiński (2019) através de compostos bioativos isolados como flavonas, narigina e quercetina foi acima de 500µg/mL, enquanto alguns compostos não mostraram atividade significativa contra as espécies *S. aureus* e a *E. faecalis*, corroborando para o resultado encontrado através do extrato sem a utilização de isolamento de substâncias.

Os testes realizados por Nigam; Singh (2023) utilizando o óleo essencial de bergamota identificou uma CIM de 0.4mg/ml, sendo a menor concentração eficaz na inibição de cepas como *S. aureus*, enquanto *P. aeruginosa* apresentou uma CIM de 25mg/ml, resultados que justificam a ausência de inibição em concentrações abaixo de 1024ug/ml.

Segundo Caputo *et al.* (2020) o óleo essencial de *Citrus bergamia* é conhecido principalmente por compostos como limoneno, linalol e acetato de linalila. Estudos realizados por Cebi; Erarslan (2023) apontam que esses compostos são abundantes em monoterpenos e têm atividades antimicrobianas, mas sua eficácia contra bactérias Gram-negativas pode ser limitada devido a barreiras estruturais dessas bactérias, como a presença de uma membrana externa protetora e mecanismos de resistência.

Além disso, o efeito antibacteriano dos terpenos, presentes nos óleos essenciais, é amplamente conhecido. Segundo Thobunluepop *et al.* (2009) esses compostos alteram a estrutura multicamada de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios na parede celular bacteriana, tornando a membrana citoplasmática mais permeável. Essa ação promove a perda de íons e reduz o potencial de membrana, o que afeta a bomba de prótons e esgota o pool de ATP, levando, eventualmente, à lise celular.

De acordo com Quirino (2015) as atividades antimicrobianas do extrato e do óleo essencial da bergamota estão situadas em alguns compostos, são o limoneno, um monoterpene cíclico, o linalol e o acetato de linalila, encontrados em ambos os produtos. Alguns terpenos como mentol, timol e acetato de linalina demonstram a capacidade de afetar a permeabilidade

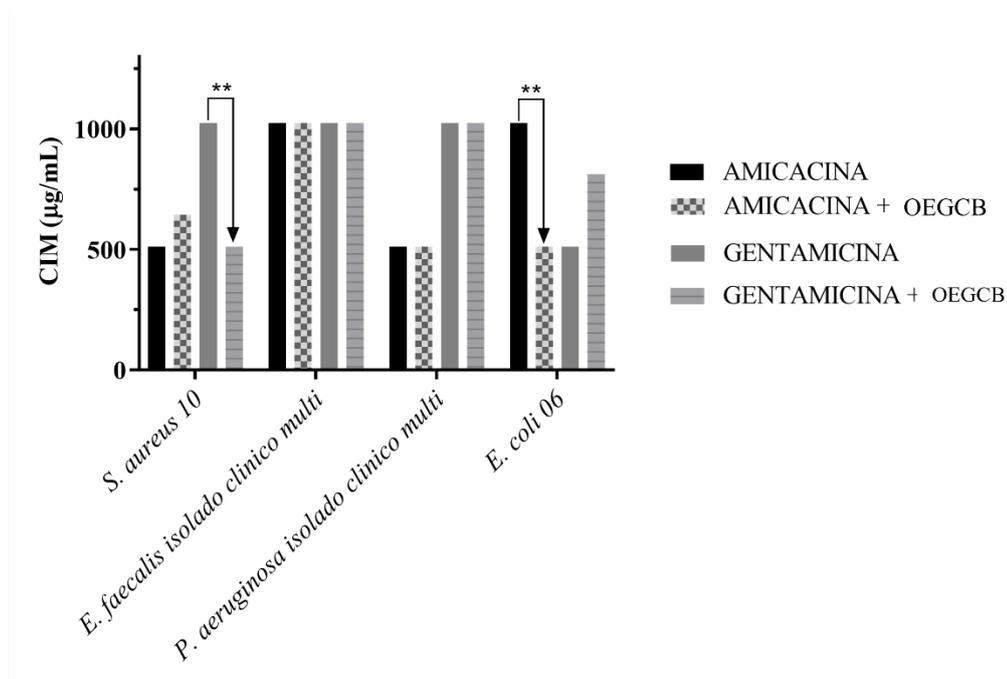
da membrana bacteriana, sendo responsável pelo extravasamento do material intracelular e consequente morte bacteriana segundo Trombetta *et al.* (2002).

### 2.2.3 Atividade modificadora

A atividade modificadora foi realizada a partir dos resultados obtidos através da concentração inibitória mínima encontrada somente para as bactérias multirresistentes, levando em consideração seus mecanismos intrínsecos e a problemática no atual cenário farmacológico.

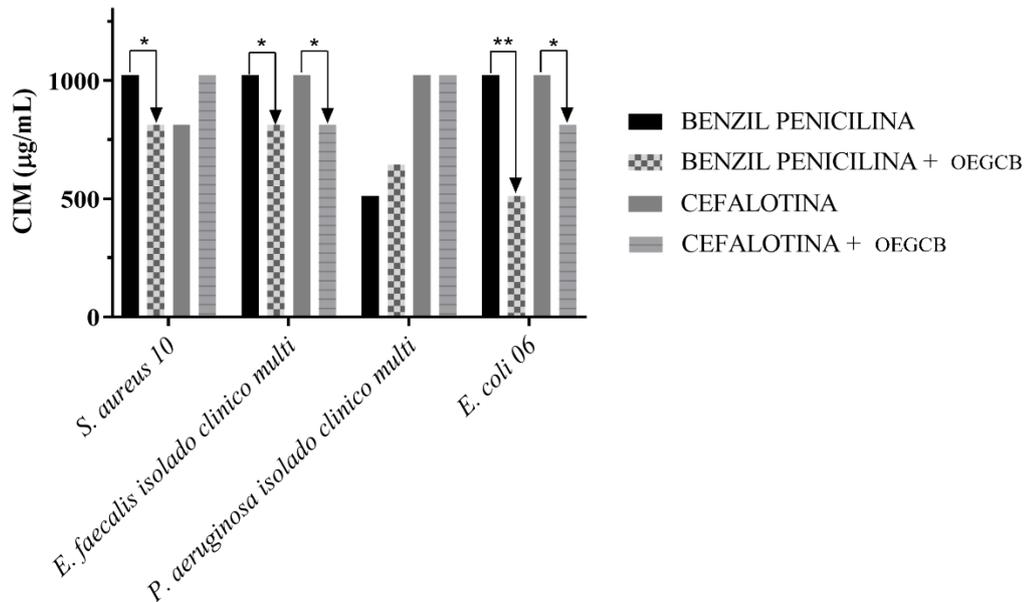
Os resultados encontrados gráfico 1 e 2 correspondem aos aminoglicosídeos (Amicacina e gentamicina) e beta-lactâmicos (Benzil penicilina e cefalotina) em conjunto com o óleo essencial dos gomos de *Citrus bergamia* (OEGCB) e as cepas de escolha. Já gráfico 3 e 4 correspondem aos testes utilizando o extrato etanólico liofilizado dos frutos *Citrus bergamia* (EELFCB).

**Gráfico 1.** Resultado do potencial modificador do OEGCB na atividade antibiótica de aminoglicosídeos frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 10 (Multirresistente), *Enterococcus faecalis* isolado clínico (Multirresistente), *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico (Multirresistente), *Escherichia coli* 06 (Multirresistente).



**Fonte:** Própria do autor. ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, usando o software *GraphPad Prism* 7.0. \*\*\*\*p < 0,0001.

**Gráfico 2.** Resultado do potencial modificador do OEGCB na atividade antibiótica de beta-lactâmicos frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 10 (Multirresistente), *Enterococcus faecalis* isolado clínico (Multirresistente), *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico (Multirresistente), *Escherichia coli* 06 (Multirresistente).



**Fonte:** Própria do autor. ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, usando o software *GraphPad Prism* 7.0. \*\*\*\*p <0,0001.

Os resultados encontrados no gráfico acima indicam uma capacidade sinérgica do óleo essencial com os aminoglicosídeos e os  $\beta$ -lactâmicos. O óleo essencial em conjunto com a amicacina na concentração acima 512 $\mu$ g/ml foi capaz de inibir o crescimento bacteriano da cepa de *E. coli* 06, entretanto para as outras cepas bacterianas testadas não houve quaisquer atividades. De mesma maneira a gentamicina em conjunto com o óleo essencial apresentaram atividade sinérgica, havendo a inibição do crescimento bacteriano na concentração de 512 $\mu$ g/ml.

Segundo Krause *et al.* (2016) e Ramirez; Tolmasky (2010) os aminoglicosídeos, como amicacina e gentamicina, são antibióticos que inibem a síntese proteica bacteriana de forma específica e irreversível. Eles se ligam à subunidade ribossomal 30S, uma parte essencial do ribossomo, que é a máquina de produção de proteínas da bactéria.

A atividade sinérgica pode ser explicada devido a presença de monoterpenos que possuem a capacidade de alterar a permeabilidade da membrana bacteriana. Essas mudanças estruturais facilitam a entrada de antibióticos na célula bacteriana, potencializando o efeito dos

aminoglicosídeos, que atuam inibindo a síntese proteica nos ribossomos bacterianos como afirma Trombetta *et al.* (2005).

A CIM encontrada na amostra controle para a *S. aureus* foi  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$  (Benzil penicilina), indicando resistência ao  $\beta$ -lactâmico, porém ao adicionar o produto houve certa resposta, estando acondicionado em  $\leq 1024\mu\text{g/ml}$  (Benzil penicilina + OEGCB), demonstrando ação sinérgica frente aos mecanismos de resistência da cepa *S. aureus* utilizada. Entretanto para a cefalotina houve uma resposta antagônica, levando a CIM de  $\leq 1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina) para  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina + OEGCB).

A resistência da *S. aureus* aos  $\beta$ -lactâmicos como as penicilinas é bastante comum, cepas conhecidas como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) ocorrem a expressão do gene *mecA*, gerando uma proteína com baixa afinidade pelos  $\beta$ -lactâmicos como a penicilina e as cefalosporinas como descrito por Lee *et al.* (2018), justificando a CIM encontrada em ambos os testes.

Os  $\beta$ -lactâmicos são antibióticos muito utilizados para infecções bacterianas, sendo divididos em quatro grupos: Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Devido ao seu uso a resistência bacteriana contra essa classe é bastante difundida como citado por Yap *et al.* (2014). Por consequência os mecanismos de resistência são comuns, sendo as  $\beta$ -lactamases o principal exemplo de resistência, na qual estas enzimas hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico essencial, tornando o antibiótico inativo de acordo com Drawz; Bonomo (2010).

A capacidade do óleo essencial de inibir o mecanismo de resistência utilizado pela *S. aureus* frente à penicilina G, pode ser explicado pela presença de compostos como limoneno e linalol, que desestabilizam a membrana bacteriana, ocorrendo desta forma uma maior permeabilidade e ação do antibiótico. Segundo Quirino *et al.* (2018), a atividade antagônica pode ser explicada pela disputa com os antibióticos por locais de ligação ou interferir nos mecanismos de ação, levando a uma menor eficácia.

Os resultados obtidos para os aminoglicosídeos foram CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina) para CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina + OEGCB), CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina) para CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina + OEGCB). Estes resultados indicam atividade sinérgica do produto frente a gentamicina, podendo ser explicada pela presença de compostos como o limoneno que potencializa o efeito antibacteriano do antibiótico, indo de acordo com o estudo feito por Sreepian *et al.* (2022) em isolados de limoneno.

Os resultados obtidos para a cepa de *E. faecalis* isolado clínico multirresistente frente aos aminoglicosídeos foi de  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$  havendo à ausência de atividade modificadora do óleo. Os resultados indicam alta resistência ao antibiótico, isso deve-se principalmente pela

produção de fatores que impedem a absorção do antibiótico e de enzimas que inativam alguns aminoglicosídeos como a gentamicina e a amicacina, como descreve Miller; Munita; Arias (2014), além de outros mecanismos como as bombas de efluxo, que eliminam as substâncias do espaço intracelular bacteriano, corroborando para os resultados encontrados. Já para os  $\beta$ -lactâmicos houve atividade sinérgica, apresentado uma CIM  $\leq 1024\mu\text{g/ml}$ , esse resultado pode ter ocorrido devido a ação de composto sobre as  $\beta$ -lactamases, inibindo as mesmas, assim como também o aumento da permeabilidade da membrana na presença de compostos como o limoneno e o linalol.

Os antibióticos (Cefalotina, amicacina e gentamicina) em conjunto com o OEGCB contra a cepa de *P. aeruginosa* não mostraram atividade modificadora, mantendo a mesma CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina/ Gentamicina + OEGCB), CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina / Cefalotina + OEGCB) e a CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina / Amicacina + OEGCB), enquanto para a Penicilina G houve o efeito antagônico, na qual pode estar relacionado as vias bioquímicas dos compostos presentes e do antibiótico, havendo uma competição por sítios de ligação, assim como possíveis mecanismos de resistência específicos para o antibiótico.

Em *E. coli* 06 observamos a atividade sinérgica entre os  $\beta$ -lactâmicos e os aminoglicosídeo(amicacina) em conjunto com OEGCB, a CIM de  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$ (Benzil penicilina) para  $512\mu\text{g/ml}$  (Benzil penicilina + OEGCB), CIM de  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina) para  $\leq 1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina + OEGCB) e CIM de  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$  (Amicacina) para  $512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina + OEGCB), também foi evidenciado a CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina) para  $\geq 512\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina + OEGCB) revelando atividade antagônica.

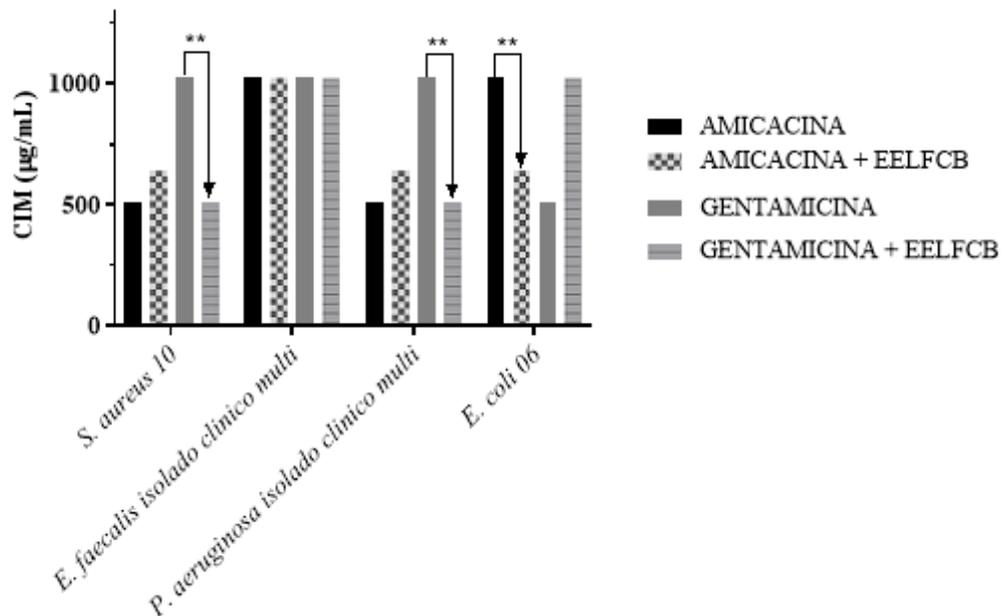
Em testes realizados por Sena *et al.* (2024) utilizando o óleo essencial extraído da bergamota, foram encontrados atividade sinérgica para a Ceftriaxona ( $\beta$ -lactâmico) e Estreptomicina (Aminoglicosídeo), havendo também efeito aditivo para a Eritromicina (Macrolídeo) frente as cepas de *E. coli*, o sinergismo encontrado nos resultados para a benzil penicilina e a cefalotina podem ser explicados devido aos mecanismos de ação semelhantes dos  $\beta$ -lactâmicos, sendo ambos inibidores da síntese de peptidoglicano por terem alvos as proteínas de ligação à penicilina como afirma Mora-Ochomogo; Lohans (2021), de forma semelhante é possível indicar a atividade sinérgica dos aminoglicosídeos como estreptomicina e a amicacina frente ao OEGCB, devido a pertencerem a mesma classe farmacológica.

A sinergia pode ser atribuída também à alteração da atividade da bomba de efluxo por certos constituintes do óleo essencial, mas também à capacidade do carvacrol, na qual, seu mecanismo de ação está diretamente relacionado a ruptura da membrana citoplasmática da *E.*

*coli*, o que aumenta sua permeabilidade e despolariza seu potencial, permitindo a interação do antibiótico no meio intracelular como descreve Xu *et al.* (2008).

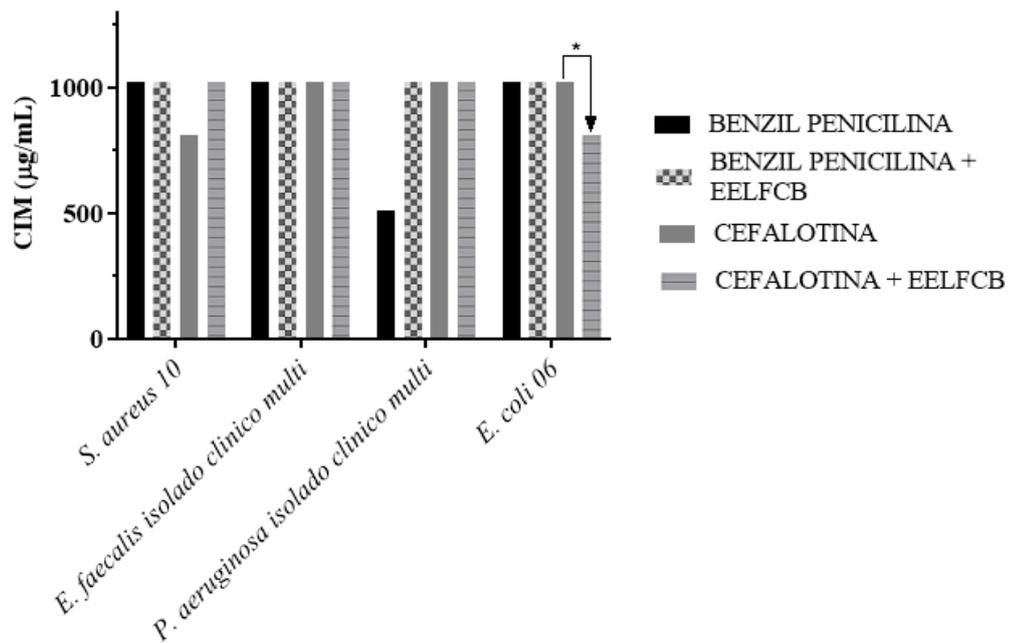
Alguns fatores como o aumento da permeabilidade da membrana podem ter interferido na ligação da gentamicina ao seu local alvo ou alterar a captação da gentamicina na célula bacteriana, situações como disputa pelos sítios de ação podem ter relação para a atividade antagônica encontrada.

**Gráfico 3.** Resultado do potencial modificador do EELFCB na atividade antibiótica de aminoglicosídeos frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 10 (Multirresistente), *Enterococcus faecalis* isolado clínico (Multirresistente), *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico (Multirresistente), *Escherichia coli* 06 (Multirresistente).



**Fonte:** Própria do autor. ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, usando o *software GraphPad Prism 7.0*. \*\*\*\*p <0,0001.

**Gráfico 4.** Resultado do potencial modificador do EELFCB na atividade antibiótica de beta-lactâmicos frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 10 (Multirresistente), *Enterococcus faecalis* isolado clínico (Multirresistente), *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico (Multirresistente), *Escherichia coli* 06 (Multirresistente).



**Fonte:** Própria do autor. ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, usando o software *GraphPad Prism* 7.0. \*\*\*\*p <0,0001.

Em *S. aureus* 10 é possível observar os seguintes resultados, CIM de 1024µg/ml (Gentamicina) para CIM de 512µg/ml (Gentamicina + EELFCB), CIM de 512µg/ml (Amicacina) para CIM de ≥512µg/ml (Gentamicina + EELFCB), CIM de 1024µg/ml (Benzil penicilina) para CIM de 1024µg/ml (Benzil penicilina + EELFCB) e CIM de ≤ 1024µg/ml (Cefalotina) para CIM de 1024µg/ml (Cefalotina + EELFCB). O sinergismo encontrado com a utilização da gentamicina pode estar relacionado a alteração da permeabilidade da membrana e precipitação de proteínas, efeitos encontrados nos taninos como citado por Akiyama (2001), que estão presentes no EELFCB.

Outros resultados encontrados se dão principalmente pelos mecanismos de resistência encontrados nas cepas multirresistentes da *S. aureus*, como as bombas de efluxo, produção de β-lactamases e expressão do gene *mecA* como afirma Mlynarczyk-Bonikowska *et al.* (2022). Alguns compostos presentes no EELFCB podem interferir na atividade do antibiótico acarretando o efeito antagônico.

Os resultados para *E. faecalis* indicaram ausência de atividade modificadora, apresentando CIM  $\geq 1024\mu\text{g/ml}$  em todos os antibióticos testados, mostrando a possível ineficácia dos compostos em potencializar os mecanismos antibacterianos dos antibióticos ou a prevalência dos mecanismos de resistência presentes nessa cepa bacteriana.

Segundo Chow (2000) a resistência em *E. faecalis* é comumente mediada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como acetiltransferases e fosfotransferases, que alteram quimicamente o antibiótico, impedindo sua ligação com o ribossomo bacteriano e, assim, inibindo a síntese proteica. De acordo com Beganovic *et al.* (2018) para os beta-lactâmicos, o principal mecanismo é a modificação da proteína ligadora de penicilina, reduzindo a afinidade do antibiótico e dificultando sua ação inibitória na síntese da parede celular bacteriana.

Os resultados obtidos para *P. aeruginosa* indicam ausência de atividade modificadora para amicacina, gentamicina e Cefalotina, tendo suas respectivas CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina / Cefalotina + EELFCB), CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina) para CIM de  $\geq 512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina + EELFCB) e CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina) para CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina + EELFCB), enquanto houve atividade antagônica para a benzil penicilina, CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Benzil penicilina) para CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Benzil penicilina + EELFCB).

Estes resultados indicam que os compostos presentes no EELFCB não apresentam interação modificadora aos  $\beta$ -lactâmicos frente a cepa utilizada, podendo ser explicada devido aos mecanismos presentes, envolvendo fatores como baixa permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo do tipo Mex e  $\beta$ -lactamase AmpC, as super expressão das bombas de efluxo pode ocorrer frente ao agressor externo como o antibiótico, como citado por Elfadadny *et al.* (2024), inibindo e inativando os efeitos dos compostos, sendo a atividade antagônica uma possível resposta a agressão externa, ocorrendo a expressão desses mecanismos de resistência.

Segundo os resultados apenas a gentamicina em conjunto com o EELFCB apresentou atividade antagônica, podendo ser explicada pela presença de compostos que alteram a permeabilidade da membrana, a ausência de resposta dos mecanismos de resistência pode estar relacionada.

A atividade modificadora apresentada na *E. coli* 06 é representada pelas CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Amicacina) para CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Amicacina + EELFCB) e CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina) para CIM de  $\leq 1024\mu\text{g/ml}$  (Cefalotina + EELFCB), apresentando também ausência de atividade na CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Benzil penicilina / Benzil penicilina + EELFCB) e ocorrência de efeito antagônico na CIM de  $512\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina) para CIM de  $1024\mu\text{g/ml}$  (Gentamicina + EELFCB).

Houve sinergismo frente a amicacina e a cefalotina, indicando que os compostos presentes no extrato auxiliaram para a potencialização do efeito bactericida, podendo estar relacionado ao efeito desestabilizador de membrana causado pelos compostos como o limoneno, aumentando a permeabilidade para a entrada do antibiótico.

O efeito antagônico e a ausência de atividade podem ser explicados devido aos diversos mecanismos de resistência presentes nessa cepa bacteriana, a presença de beta-lactamases incluindo as enzimas da classe TEM e CTX-M, que hidrolisam antibióticos como penicilinas e cefalosporinas, assim como a presença de bombas de efluxo que reduzem a concentração do antibiótico no ambiente intracelular, como descreve Gauba; Rahman (2023).

#### **2.2.4 Atividade toxicológica**

A Concentração letal 50% (Cl50) obtida a partir dos testes utilizando o EELFCB foi de 1000µg/ml, enquanto do OEGCB foi de 500µg/ml, indicando uma baixa toxicidade frente aos microcrustáceos, tais achados podem ser justificados pela composição química do EELFCB, na qual é rico em flavonoides como o limoneno, compostos que possuem alta atividade antioxidante e cito protetora como afirma Dias; Pinto; Silva (2021) e Shen *et al.*, (2023).

De acordo com Mccarty; Borgert; Burgoon (2020) e Mückter (2003) a toxicidade não é uma característica fixa, mas sim uma propriedade multifatorial que resulta da interação entre as propriedades químicas do composto, o organismo-alvo e as condições ambientais específicas.

Desta maneira a sobrevivência das *Artemias* salinas pode estar atrelada aos efeitos produzidos pelos compostos presentes em cada produto, além de compostos fenólicos ligados a capacidade antioxidante como descrito por Sun; Shahrajabian (2023), a baixa toxicidade é refletida pelos mecanismos protetores dos compostos que compõe o extrato impedindo a ação de radicais livres.

De acordo com Panche; Diwan; Chandra (2016) ao reduzir o estresse oxidativo, flavonoides minimizam o risco de danos ao DNA, prevenindo mutações que podem levar a alterações celulares consequente apoptose.

Segundo Testa *et al.* (2000) compostos lipofílicos interagem de maneira distinta com sistemas biológicos, enfatizando propriedades como permeabilidade, acúmulo em tecidos e interações moleculares específicas.

Afirma Chmiel *et al.* (2019) que os compostos lipofílicos possuem capacidade elevada de permeabilidade em comparação aos hidrofóbicos, facilitando sua entrada em membranas

celulares, assim como sua permanência no organismo devido sua alta taxa de reabsorção. A diferença na quantidade de compostos voláteis e a natureza lipofílica do OEGCB, pode ter influenciado em uma atividade toxica maior em relação ao EELFCB.

De acordo com Melliou *et al.* (2009) o acetato de linalila e o  $\gamma$ -terpineno foram os constituintes dos óleos que conferem a maior parte da sua toxicidade, destacando também a diferença das concentrações dos compostos a partir do método de extração do óleo essencial.

A presença de compostos de natureza antioxidante como polifenóis e flavonoides como afirma Bava *et al.* (2023), desempenhando um papel cito protetor na captura de espécies reativas de oxigênio, reduzindo o estresse oxidativo, tais compostos são encontrados em baixa quantidade ou ausentes em produtos como o OEGCB, de acordo com Aziz *et al.* (2018) e Cordeiro *et al.* (2024), justificando a CI50 menor encontrada no OEGCB, causando uma maior toxicidade e afetando os organismos aquáticos levando a morte celular.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo ressalta o grande potencial da bergamota (*Citrus bergamia*) como uma alternativa natural no enfrentamento de bactérias multirresistentes. Seus derivados, incluindo o óleo essencial (OECB) e o extrato liofilizado (EELFCB), mostraram capacidade de sinergia significativa com antibióticos, especialmente aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos. Essas combinações permitiram a redução da concentração necessária de alguns medicamentos para inibir o crescimento bacteriano, demonstrando o papel ativo da bergamota na potencialização da eficácia terapêutica.

A composição química da bergamota, rica em compostos bioativos como limoneno e flavonoides, foi determinante para esses efeitos positivos. Esses compostos alteram a permeabilidade da membrana das bactérias e auxiliam na superação de alguns mecanismos de resistência, reforçando a aplicabilidade da bergamota como uma ferramenta de apoio na terapia antimicrobiana. Além disso, sua baixa toxicidade confere segurança ao uso em diferentes áreas, ampliando seu potencial de aplicação.

Embora tenham sido observados efeitos antagônicos em algumas interações, como com determinados  $\beta$ -lactâmicos, esses resultados não diminuem a relevância da bergamota, mas sim indicam a necessidade de investigações mais aprofundadas. Estudos futuros devem explorar com maior detalhe os mecanismos moleculares envolvidos, buscando maximizar os benefícios e minimizar possíveis limitações.

Diante do crescente desafio da resistência bacteriana, a bergamota demonstra potencial como um complemento em estratégias antimicrobianas, especialmente em combinações com antibióticos. No entanto, é fundamental que estudos futuros avaliem com mais profundidade suas interações químicas e os mecanismos de ação envolvidos, além de determinar condições específicas para sua aplicação prática. Embora promissora, sua utilização ainda requer cautela e validação científica adicional antes de ser amplamente adotada em terapias clínicas ou outras áreas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZAK, A.; OŻAROWSKI, M.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, 31 dez. 2019.
- AKIYAMA, H. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 487–491, 1 out. 2001.
- APARNA, V. *et al.* Identification of Natural Compound Inhibitors for Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Using In Silico High-Throughput Virtual Screening and In Vitro Validation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101840, 15 jul. 2014.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 jan. 2021.
- AZIZ, Z. A. A. *et al.* Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100–1110, 23 nov. 2018.
- BARON, G. *et al.* Analytical Profile and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Enriched Polyphenol Fractions Isolated from Bergamot Fruit and Leave. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 141, 20 jan. 2021.
- BAVA, R. *et al.* Protective Role of Bergamot Polyphenolic Fraction (BPF) against Deltamethrin Toxicity in Honeybees (*Apis mellifera*). **Animals**, v. 13, n. 24, p. 3764–3764, 6 dez. 2023.
- BEGANOVIC, M. *et al.* A Review of Combination Antimicrobial Therapy for *Enterococcus faecalis* Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 2, p. 303–309, 30 jan. 2018.
- CAPUTO, L. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three Citrus Species. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1890, 19 abr. 2020.
- CEBI, N.; ERARSLAN, A. Determination of the Antifungal, Antibacterial Activity and Volatile Compound Composition of *Citrus bergamia* Peel Essential Oil. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 203, 3 jan. 2023.

CHMIEL, T. *et al.* The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 393–406, maio 2019.

CHOW, J. W. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 586–589, 1 ago. 2000.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-. Ninth Edition. CLSI document Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CORDEIRO, K. C. *et al.* Characterization of bergamot essential oil: chemical, microbiological and colloidal aspects. **Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia**, v. 83, p. e275622, 2024.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, v. 54, n. 4, p. 1250-1318, 2008.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5377, 4 set. 2021.

DODT, R. C. M. *et al.* Estudo experimental de uma intervenção educativa para promover a autoeficácia materna na amamentação. *Revista latino-americana de enfermagem*, v. 23, n. 4, p.725-732, 2015.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 1 jan. 2010.

ELFADADNY, A. *et al.* Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. **Frontiers in microbiology**, v. 15, 5 abr. 2024.

FRATIANNI, F. *et al.* Polyphenols, Antioxidant, Antibacterial, and Biofilm Inhibitory Activities of Peel and Pulp of *Citrus medica* L., *Citrus bergamia*, and *Citrus medica* cv. Salò Cultivated in Southern Italy. **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 4577, 13 dez. 2019.

GATTUSO, A. *et al.* Recovery of Bioactive Compounds from Calabrian Bergamot Citrus Waste: Selection of Best Green Extraction. **Agriculture**, v. 13, n. 5, p. 1095, 20 maio 2023.

GAUBA, A.; RAHMAN, K. M. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 11, p. 1590, 3 nov. 2023.

GUO, M. *et al.* Herbal Medicine Nanocrystals: A Potential Novel Therapeutic Strategy. **Molecules**, v. 28, n. 17, p. 6370–6370, 31 ago. 2023.

IBEAS, D. G. *et al.* Shaping the biology of citrus: I. Genomic determinants of evolution. **The plant genome**, v. 14, n. 3, 18 jul. 2021.

IOANNOU, P.; BALIOU, S. The Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential of Cranberry, D-Mannose, and Flavonoids against Infectious Diseases: The Example of Urinary Tract Infections. **Antibiotics**, v. 13, n. 7, p. 593–593, 26 jun. 2024.

JUCÁ, M. M. *et al.* Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. **Natural Product Research**, v. 34, n. 5, p. 692–705, 1 mar. 2020.

JUNIOR, C. M. S. *et al.* Coumarins from Rutaceae: Chemical diversity and biological activities. **Fitoterapia**, v. 168, p. 105489, 1 jul. 2023.

KRAUSE, K. M. *et al.* Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, jun. 2016.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 162750, p. 1–16, 2013.

LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews. Disease Primers**, v. 4, n. 18033, p. 18033, 2018.

LIGA, S.; PAUL, C.; FRÁNCISC PÉTER. Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. **Plants**, v. 12, n. 14, p. 2732–2732, 23 jul. 2023.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental, 3ª. ed. Fortaleza: UFC, 2009.

MCCARTY, L. S.; BORGERT, C. J.; BURGOON, L. D. Evaluation of the Inherent Toxicity Concept in Environmental Toxicology and Risk Assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, n. 12, 28 set. 2020.

MELLIU, E. *et al.* Correction: Eleni, M. *et al.* High Quality Bergamot Oil from Greece: Chemical Analysis Using Chiral Gas Chromatography and Larvicidal Activity against the West Nile Virus Vector. *Molecules* 2009, 14(2), 839-849. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1948–1949, 25 maio 2009.

MESEJO, C. *et al.* Reversion of fruit-dependent inhibition of flowering in *Citrus* requires sprouting of buds with epigenetically silenced *CcMADS19*. **New phytologist**, v. 233, n. 1, p. 526–533, 1 set. 2021.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, 9 set. 2014.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 1 jan. 2022.

MORA-OCHOMOGO, M.; LOHANS, C. T.  $\beta$ -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1623–1639, 4 ago. 2021.

MÜCKTER, H. What is toxicology and how does toxicity occur? **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 17, n. 1, p. 5–27, mar. 2003.

NIGAM, V.; SINGH, S. Essential oils of *Citrus bergamia* as antibacterial agents against some human pathogenic bacteria. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 1319–1328, 15 mar. 2023.

- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. e47, 29 dez. 2016.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 5 jun. 2015.
- QUIRINO, A. *et al.* Citrus bergamia: Kinetics of Antimicrobial Activity on Clinical Isolates. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 361, 1 mar. 2022.
- QUIRINO, A. *et al.* Synergistic and antagonistic effects of *Citrus bergamia* distilled extract and its major components on drug resistant clinical isolates. **Natural Product Research**, v. 34, n. 11, p. 1626–1629, 22 dez. 2018.
- QUIRINO, A. In Vitro Antimicrobial Activity of Natural Essence and Distilled Extract of Bergamot against Drug Resistance Clinical Isolates. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 01, n. s3, 2015.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, dez. 2010.
- RAPISARDA, A.; GERMANÒ, M. Citrus × bergamia Risso & Poiteau botanical classification, morphology and anatomy. **Citrus bergamiabergamot and its derivatives**, v. 51, p. 9–11, 1 jan. 2013.
- REMIGANTE, A. *et al.* Mechanisms underlying the anti-aging activity of bergamot (*Citrus bergamia*) extract in human red blood cells. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 30 jun. 2023.
- RUSSO, C. *et al.* The Second Life of Citrus Fruit Waste: A Valuable Source of Bioactive Compounds. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5991, 2 out. 2021.
- SALVAT A.A. *et al.* Screenng of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32 p. 293-297, 2001.
- SENA, G. *et al.* Essential Oils from Southern Italian Aromatic Plants Synergize with Antibiotics against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* Cell Growth and Biofilm Formation. **Antibiotics**, v. 13, n. 7, p. 605–605, 28 jun. 2024.
- SHAMSUDIN, N. F. *et al.* Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1149, 9 fev. 2022.
- SHEN, C. *et al.* A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 4982–4982, 25 jun. 2023.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento, 6ª ed. Florianópolis. Editora da UFSC, 2010.
- SREEPIAN, A. *et al.* Antibacterial Activities and Synergistic Interaction of *Citrus Essential Oils* and Limonene with Gentamicin against Clinically Isolated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal**, v. 2022, p. e8418287, 28 fev. 2022.

SUN, W.; SHAHRAJABIAN, M. H. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1845, 15 fev. 2023.

TESTA, B. *et al.* The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 19, n. 1, p. 179–211, 2000.

THOBUNLUEPOP, P. *et al.* **Asian Journal of Food and Agro-Industry Screening for The Antifungal Activity of Essential Oils from Bergamot oil (*Citrus hystrix DC.*) and Tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) Against Economically Rice Pathogenic Fungi: A Driving Force of Organic Rice cv. KDML 105 ProductionAs. J. Food Ag-Ind.** [s.l: s.n.]. Acesso em: 3 nov. 2024.

TIAN, Z.-X. *et al.* CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical nalB-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005932, 1 out. 2016.

TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 25 maio 2005.

TROMBETTA, D. *et al.* Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha,beta-unsaturated aldehydes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 285–290, 1 out. 2002.

TSIOKANOS, E. *et al.* Phytochemical characteristics of bergamot oranges from the Ionian islands of Greece: A multi-analytical approach with emphasis in the distribution of neohesperidose flavanones. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128400, maio 2021.

VEDOVA, L. D. *et al.* Chemical, Nutritional and Biological Evaluation of a Sustainable and Scalable Complex of Phytochemicals from Bergamot By-Products. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 7, p. 2964, 26 mar. 2023.

VELASCO, R.; LICCIARDELLO, C. A genealogy of the citrus family. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 640–642, jul. 2014.

XU, J. *et al.* The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174–179, set. 2008.

YAP, P. S. X. *et al.* Essential Oils, a New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, p. 6–14, 7 fev. 2014.

ZHANG, J. *et al.* Traditional herbal medicine and nanomedicine: Converging disciplines to improve therapeutic efficacy and human health. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 178, p. 113964, nov. 2021.