

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA ÓLEOS ESSENCIAIS

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION FOR ESSENTIAL OILS

<sup>1</sup>SHIINA, Fernando Henrique Keiji Abe; <sup>2</sup>FRANCISCO, Odair  
<sup>1e2</sup>Curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos

### RESUMO

A utilização de extratos oleosos obtidos de plantas, tem sido cada vez maior, como forma alternativa para o controle de bactérias. Tal fato justifica-se, devido à enorme diversidade genética que apresentam estes microrganismos e também por apresentar maior probabilidade de seleção artificial. O objetivo deste presente trabalho é verificar o potencial de ação antimicrobiano de extratos de óleos essenciais adquiridos no comércio, como extratos oleosos de cravo, melaleuca, eucalipto e nim. Foram testadas as espécies *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As bactérias foram cultivadas a partir de uma cepa padrão, as quais foram posteriormente cultivadas inicialmente em Caldo TBS, quantificadas por espectrofotometria e diluídas até 108 UFC/mL e pcultivadas em placas de Petri, em meio Mueller Hinton. Os discos de papel de 5 mm forma embebidos em 4 diferentes concentrações, com os extratos diluídos em óleo de girassol autoclavado, os quais posteriormente, foram passados para a cultura. O diâmetro dos halos foram dimensionados após 24 horas após a inoculação, com um paquímetro digital. Observou-se que houve formação de halos com maiores diâmetros quando testados em óleo de cravo e óleo de eucalipto, com diferenças estatísticas significantes, tanto quando analisados em ANOVA como também para as diferentes concentrações comparadas em análise de regressão linear, no Programa Estatístico Minitab for Windows Release 10.1. Concluiu-se que o óleo de cravo foi muito eficiente, mesmo em menores concentrações, seguido do óleo de eucalipto. O óleo de Melaleuca e de Nim não mostraram efetividade para o controle antimicrobiano das espécies todas as bactérias testadas.

**Palavras-chave:** Óleos Essenciais. Óleo de Cravo. Óleo de Melaleuca. Óleo de Eucalipto. Óleo de Nim. Plantas. Antimicrobiano.

### ABSTRACT.

The use of oily extracts obtained from plants had increased as an alternative way to control bacteria. This fact is justified, due to the enormous genetic diversity that these microorganisms present and also because they present a greater probability of artificial selection. The objective of this work is to verify the antimicrobial potential of extracts of commercially available essential oils, such as oil extracts of clove, melaleuca, eucalyptus and neem. The species *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were tested. Bacteria were cultured from a standard strain, which were further cultured in TBS Broth, quantified by spectrophotometry and diluted to 108 CFU / mL and plated on Petri dishes in Mueller Hinton medium. The 5 mm paper disks were soaked in 4 different concentrations, with the extracts diluted in autoclaved sunflower oil, which were then passed into the culture. The diameter of the halos were dimensioned after 24 hours after inoculation with a digital caliper. It was observed that halos with larger diameters were formed when tested in clove oil and eucalyptus oil, with significant statistical differences, both when analyzed in ANOVA and also for the different concentrations compared in linear regression analysis in the Minitab Statistical Program Windows Release 10.1. It was concluded that clove oil was very efficient, even at lower concentrations, followed by eucalyptus oil. The oil of Melaleuca and Nim did not show effectiveness for the antimicrobial control of the species all the bacteria tested.

**Keywords:** Essential Oils. Indian Clove Oil. Melaleuca Oil. Eucalyptus Oil. Nim Oil. Plants. Antimicrobial

### INTRODUÇÃO

A OMS (Organização Mundial da Saúde) define planta medicinal como qualquer vegetal que apresenta substâncias com potencial de serem utilizadas com

fins terapêuticos, ou ainda, que sejam precursores de fármacos semissintéticos (OMS, 1998).

Essas substâncias também são conhecidas como metabólitos secundários das plantas, as quais podem ser identificadas após estudos específicos. Tais substâncias têm historicamente sido utilizadas como medicamentos, inseticidas, repelentes, antimicrobianos, entre outras atividades, nas mais diversas civilizações. (SAITO,2004).

A utilização das plantas medicinais no Brasil, tem sido utilizadas cada vez mais, principalmente para combater microrganismos que, pela enorme diversidade genética, também apresentam maior probabilidade de seleção artificial, por meio do uso indiscriminado de antibióticos. Tal fato, evolui ao passar do tempo, o surgimento de espécies de microrganismos resistentes aos medicamentos, historicamente utilizados. (SARTORATTO et al., 2004)

O estudo de substâncias antimicrobianas alternativas, obtidas de extratos vegetais e voltadas ao uso como conservantes de alimentos, são também muito importantes, visto que, podem substituir os compostos químicos sintéticos utilizadas para este fim, que muitas vezes são carcinogênicos. Portanto, o estudo para obtenção de novas substâncias faz-se necessário e são imprescindíveis na profilaxia de possíveis doenças causadas pelo uso de alguns conservantes. (MOREIRA et al., 2005).

Além disso, os extratos vegetais também podem ser usados para o controle de insetos, que muitas vezes são encontrados como pragas em plantas, utilizadas como alimentos. Desta maneira, tais insetos causam muito prejuízos ao homem e ao meio ambiente, pois apresentam substâncias nocivas como metais pesados, agentes oncogênicos e teratogênicos. (SAITO,2004).

Assim, Almeida et al. (2014) avaliaram a eficiência de óleo de cravo como agente antimicrobiano, onde observou experimentalmente grande eficiência deste extrato vegetal em para o controle de *Staphylococcus aureus* em carne moída de ovinos.

O emprego de óleos essenciais, extraídos a partir de vegetais, demanda grande interesse para as indústrias Farmacêutica e de Alimentos, visto que, muitas entre estes estratos vegetais, apresentam atividades antimicrobianas, as quais podem contribuir para a redução da expressão de fatores de virulência, causados por

alguns microrganismos, como as enterotoxinas A e B e  $\alpha$ -toxina produzidas por *Staphylococcus aureus*. (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 2004).

Oliveira et al. (2011), realizaram uma revisão da literatura acerca de óleo de Melaleuca e relataram que tal extrato vegetal apresenta considerável ação antibacteriana in vitro contra microrganismos bucais. No entanto, pesquisas as quais envolvam o estudo do mecanismo de ação sobre as células microbianas ou estudos in vivo, necessitam ser realizados, devido à escassez de informações acerca desse produto, o qual pode ser útil na odontologia, seja na manutenção química da higiene ou prevenção de doenças bucais.

Os eucaliptos configuram-se como árvores de grande porte, as quais apresentam odor ativo, agradável e balsâmico. Existem várias espécies do gênero *Eucalyptus*, as quais são fonte de matéria-prima para as indústrias madeireira e de celulose, assim como também são produtoras de óleos essenciais, são-no também para as indústrias farmacêutica e da perfumaria. No seu conjunto, estes produtos de elevado valor acrescentado, têm um grande impacto económico na indústria farmacêutica. (FIGUEIREDO et al., 2013).

Óleo de nim *Azadirachta indica* tem sido frequentemente empregado em controle de insetos. Tal planta é já era utilizada há 5.000 anos, a qual pode ser empregada contra mais de 430 espécies de pragas que ocorrem em diversos países. Suas ações apresentam-se de forma muito variada e pode causar múltiplos efeitos, tais como: repelência, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, atraso no desenvolvimento, redução na fertilidade e fecundidade, e várias outras alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos que podem levá-los a morte. Seu uso medicinal também tem sido indicado como anti-séptico, tônico, vermífugo, na cura da diabetes, malária, problemas dermatológicos, combate a sarna, pulga e outras doenças. (MARTINEZ, 2002).

Assunção (2016) utilizou Extratos de Nim para o controle antimicrobiano de rações para frangos de corte, onde a partir de ensaios *in vivo*, observou que a torta de nim servido aos animais, controlou de forma muito eficiente a *Salmonella* sp, enquanto não influenciou no controle de *Escherichia coli*. Verificou também que houve excelente metabolismo das aves e além de manter a espécie natural *Escherichia coli*, também manteve outras espécies de bactérias que compõem a microbiota normal do intestino da ave e por outro lado, combateu a altamente patogênica *Salmonella* sp.

O objetivo deste trabalho consiste em verificar o potencial de ação antimicrobiano de extratos de óleos essenciais adquiridos no comércio, como extratos oleosos de cravo, melaleuca, eucalipto e nim.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos foram comprados no comércio local, entre os quais, o óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) foi da Marca Panizza Lote 19013172 (validade até 03/2019). O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), também foi da Marca Panizza Lote 19017177 (validade até 09/2019). O óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globosus*) foi da Marca Panizza Lote 19018172 (validade até 06/2019). e posteriormente, foram testados a partir de discos embebidos e sobrepostos em culturas de bactérias, em placas de Petri, para as espécies de *Escherichia coli* NEWP 0022, *Streptococcus pyogenes* NEWP 0015, *Staphylococcus aureus* NEWP 0023 e *Staphylococcus epidermidis* NEWP 0128.

O teste positivo foi realizado a partir de discos de Amoxicilina 10% e os Teste negativo foi realizado a partir de óleo de girassol autoclavado.

Foram testados diferentes concentrações: 100%; 75%; 50% e 25%. As diluições foram realizadas em óleo de girassol autoclavado. Os inóculos das bactérias foram preparados a partir de cepas de microrganismos padrões, que foram transferidas com auxílio de uma pinça estéril para 5mL de caldo Müller Hinton e colonizado por 24 horas em 37 °C.

Após este período de incubação, foi retirada uma amostra de 1 mL de cada tudo contendo as cepas e aferida sua absorbância em 625 nm, que foram acertadas de acordo com o padrão de turbidez McFarland 0,5, que obtém uma absorbância entre 0,08 e 0,10 neste comprimento de onda. Tal procedimento resultou em uma suspensão com aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Acertada então a suspensão bacteriana, esta foi diluída em 1:10, com solução salina 0,9%, que resultou em uma diluição de  $10^7$  UFC/mL, de modo que esta suspensão, que assim, foi inoculada junto à placa de petri, em meio sólido de ágar Müller Hinton, com auxílio de uma alça de Drigasky.

A colonização das bactérias foi realizada em meio Müller Hinton, junto aos discos confeccionados a partir de papel de filtro de porosidade de  $3\mu$  da empresa Nalgon®, com diâmetro de 5 mm de diâmetro.

Os resultados foram observados a partir do dimensionamento do diâmetro do halo formado ao redor do disco. As dimensões do diâmetro do halo foram tomadas com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram analisados em ANOVA, como também foram comparados para as diferentes concentrações comparadas em

análise de regressão linear, no Programa Estatístico Minitab for Windows Release 10.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos, verificou-se que, o óleo de cravo mostrou maior eficiência, quando avaliado para o controle das 4 espécies de bactérias.

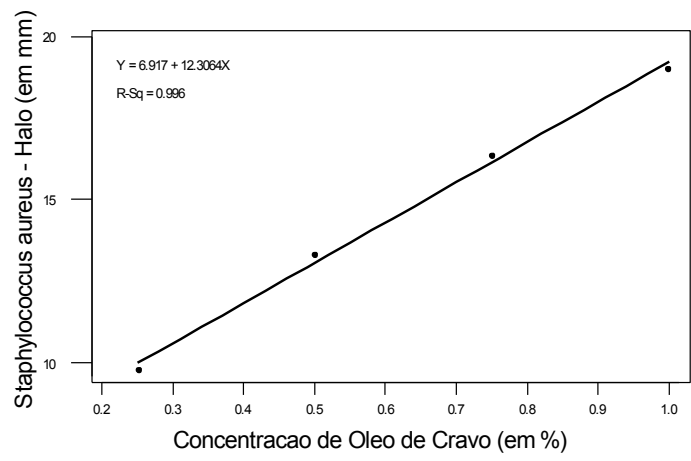
Observou-se que houve eficiência tanto na bactéria Gram-Negativa *Escherichia coli*, assim como nas bactérias Gram-Positivas testadas neste experimento.

Seguem avaliações realizadas para as diferentes concentrações para os 4 óleos essenciais estudados, assim como também sua eficácia nas 4 diferentes espécies de bactérias.

### I) Para *Staphylococcus aureus*:

Quando testado, o óleo de cravo mostrou-se muito eficiente para controle de *Staphylococcus aureus*, para o qual foi observado o maior halo em óleo de cravo puro (100%), com o maior valor de média de 19 mm (SD= 3.470) de halo, enquanto o menor valor da média observada para óleo de cravo, foi constatada em concentração de 25% com 9.767 mm (SD=3,420) de diâmetro. Quando testado para outros 4 óleos, não foi verificada nenhuma eficiência para óleo de nim, onde não foi observada qualquer formação de halo ao redor dos discos embebidos nas 4 diferentes diluições. Quando comparadas as medias obtidas em ANOVA, verificou-se que houve Diferença significativa, quando tratou-se *Staphylococcus aureus*, entre os diferentes óleos e em diferentes concentrações, com  $p < 0,05$ , onde obteve-se  $F=12,54$  ( $p=0,000$ ;  $p < 0,001$ ), o qual mostrou-se altamente significativo e indica que as médias foram diferentes entre si.

**Figura 1.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Cravo, testados em Culturas de *Staphylococcus aureus*.



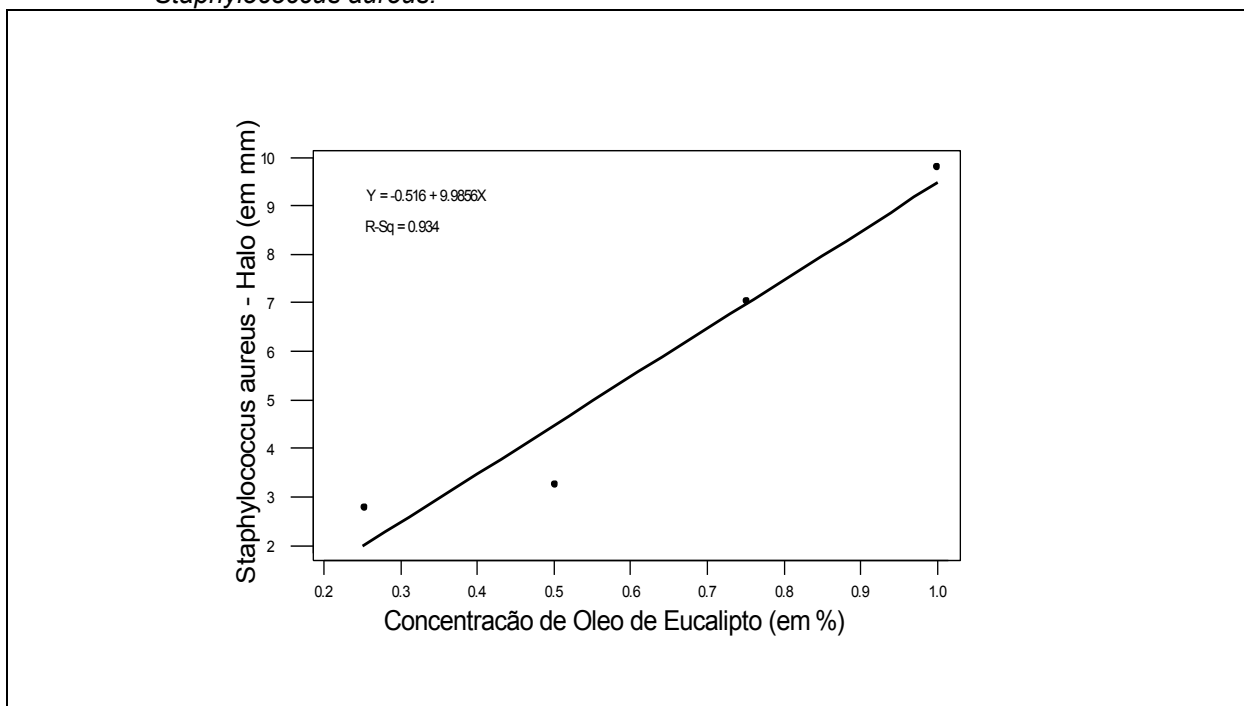
Também foi observado um valor altamente significativo para análise de Regressão Linear, quando testou-se *Staphylococcus aureus* para as 4 diferentes concentrações de óleo de cravo com  $p < 0,05$ , onde apresentou-se  $F = 467,31$  ( $p = 0,002$ ;  $p < 0,01$ ), altamente significativo, conforme pode ser observado na Figura 1.

Foi observado um valor de  $R^2$  altamente significativo para a reta calculada a partir da equação, onde a equação da reta foi  $y = 6,917 + 12,3064 X$ , com  $R^2 = 0,996$ . Tais resultados mostram que os valores observados foram muito próximos aos valores estimados da reta, a partir da equação obtida.

Foi observado também para *Staphylococcus aureus* que, para as 4 diluições de óleo de eucalipto, houve resultado altamente significativo estatisticamente, quando realizada a análise de regressão, onde verificou-se  $F = 28,10$  ( $p = 0,034$ ;  $p < 0,05$ ).

Também para eucalipto testado em *Staphylococcus aureus*, observou-se um valor de  $R^2$  altamente, com a equação da reta foi  $y = -0,52 + 9,99 X$ , com  $R^2 = 0,934$ . Assim, assim como para óleo de cravo, para óleo de eucalipto, também foi verificado um valor estimado para reta muito próximos dos valores observados, com  $R^2$  muito próximo de 1,00 (100%), conforme pode ser observado na Figura 2.

**Figura 2.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Eucalipto, testados em Culturas de *Staphylococcus aureus*.





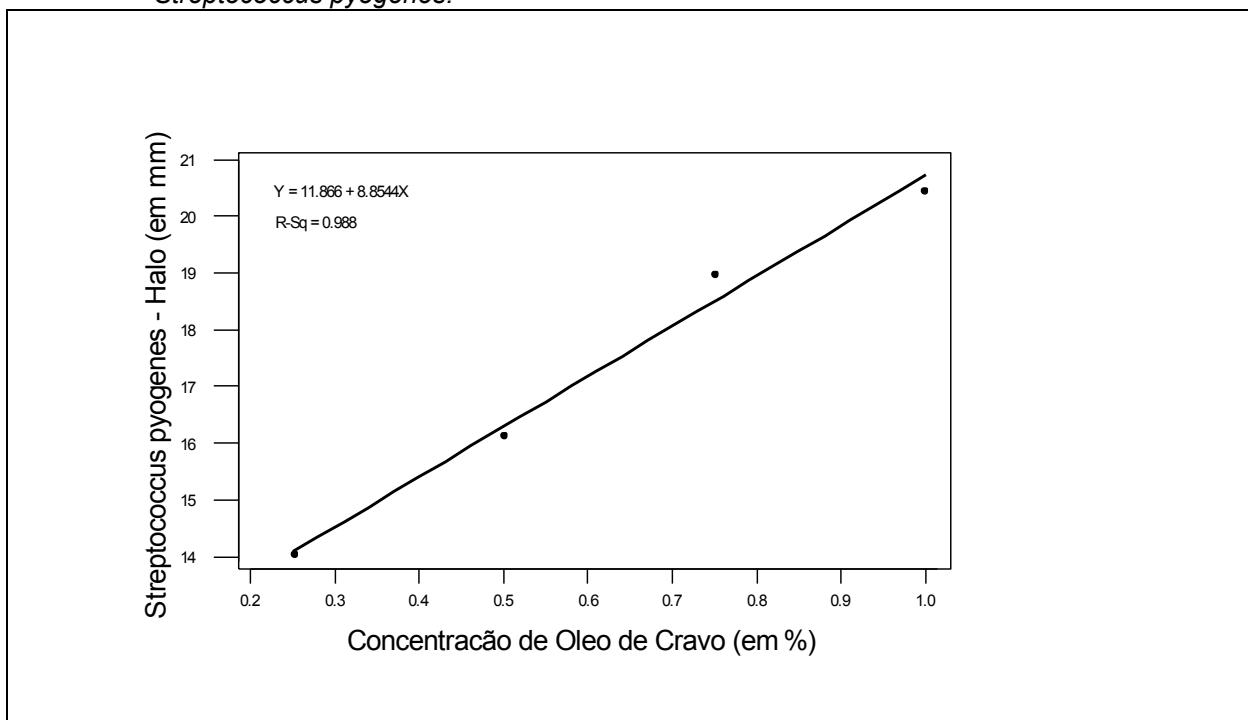
## II) Para *Streptococcus pyogenes*:

Verificou-se que entre as amostras, houve diferença significativa, quando testadas as quatro concentrações (100%; 75%; 50% e 25%) entre os diversos antimicrobianos testados, onde observou-se ANOVA com  $F=4.16$  (com  $P = 0.000; P < 0,001$ ).

Para as diferentes concentrações de óleo de cravo, observou-se para *Streptococcus pyogenes* uma media maior, entre três amostras para a concentração de 100% de óleo de cravo ( $\bar{X}=20,467$  mm); enquanto verificou-se halo com média de 14,033 mm, quando a bactéria era tratada com óleo de cravo em concentração de 25%.

Foi realizada uma Análise de Regressão Linear, na qual verificou-se um valor de  $F=161,27$  (com  $P=0,006; P < 0,05$ ), valor que denota um valor significativo para Análise de Regressão. Observou-se também que os valores estimados podem ser calculados pela equação:  $Y = 11,866 + 8,8544X$ , com  $R^2 = 0,988$ , conforme denota-se na Figura 3.

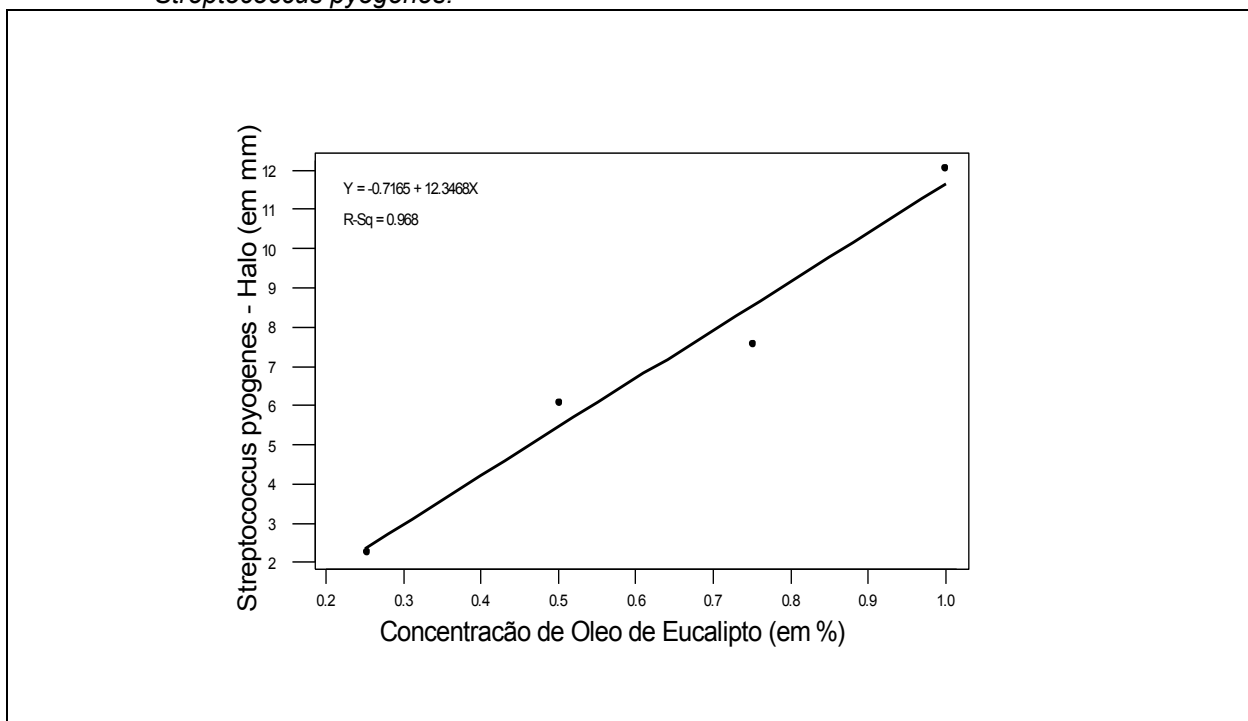
**Figura 3.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Cravo, testados em Culturas de *Streptococcus pyogenes*.



Quando avaliado para óleo de Eucalipto, verificou-se também eficiência entre as 4 concentrações testadas entre os outros tratamentos verificados, com  $F=4,16$  ( $P=0,000$ ;  $P<0,001$ ), com media maior observada para a concentração de 100% de óleo de eucalipto, com halo com media de 12,067 mm ( $SD=5,749$  mm).

Quando analisado em Análise de regressão Linear, observou-se valores significativos, com a reta estimada segundo a equação:  $Y = 0,7165 + 12,3468X$ , com  $F = 60,74$  ( $P=0,016$ ;  $P<0,05$ ).

**Figura 4.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Eucalipto, testados em Culturas de *Streptococcus pyogenes*.



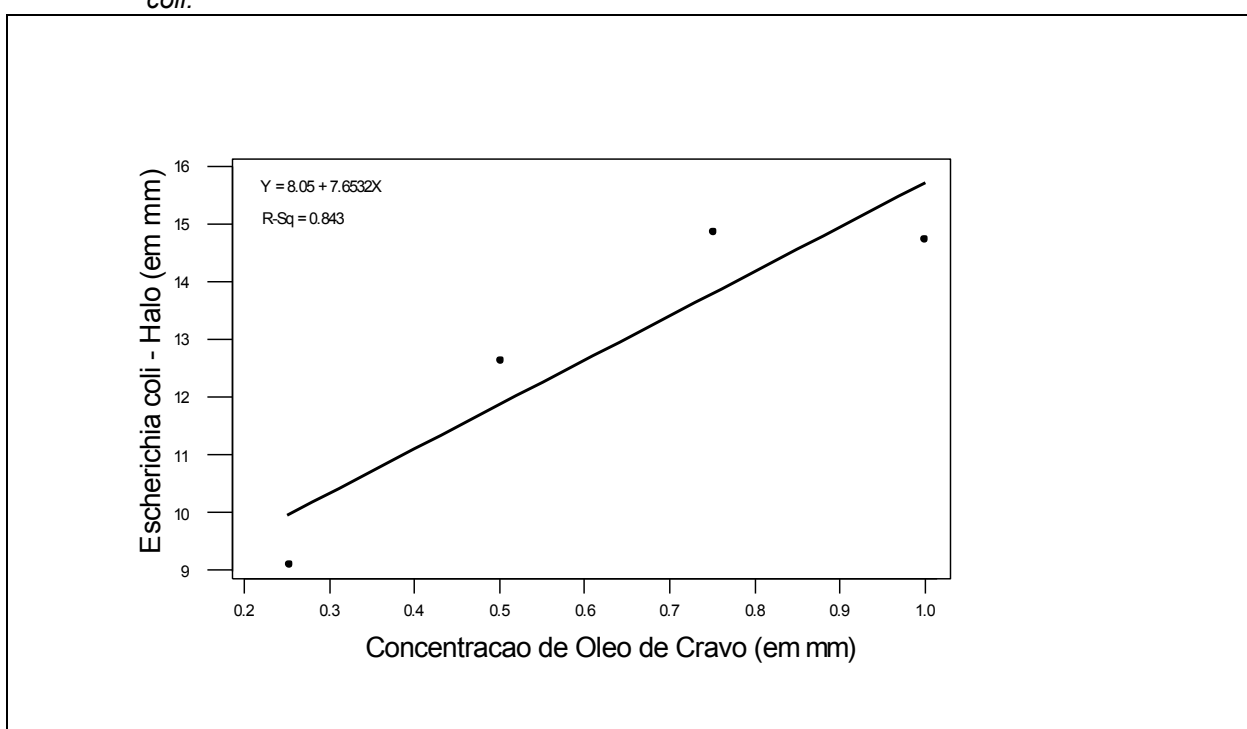
### III) Para *Escherichia coli*:

Quando analisadas em ANOVA, verificou-se que as medias entre as diferentes concentrações de óleo de cravo, atuaram com valores diferentes entre outros tratamentos e concentrações para *Escherichia coli*, com  $F=14,47$  ( $P=0,000$ ;  $P<0,001$ ). Verificou-se que os valores observados para esta bactéria em 100% e 75% de óleo de cravo foram muito próximos. Quando tratada com óleo de cravo a 100%, a média observada de 14,733 mm ( $SD=2,974$ ) e observou-se que em 75%, a media observada para o halo formado foi até um pouco maior, com media de 14,867 ( $SD=1,069$ ). Tal

fato pode ter ocorrido porque *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, assim já seria mais sensível em concentrações menores.

A Análise de Regressão Linear para essa bactéria, também foi significativa, com a reta estimada pela equação:  $Y = 8,05 + 7,6532 X$ , com  $F=10,71$  ( $P=0,082$ ; NS  $P>0,05$ ). No entanto, embora a equação da reta não seja significativa em  $P<0,05$ , o valor de  $R^2$  foi bem representativo, com  $R^2$  acima de 0,80; ou seja,  $R^2$  igual a 0,843, conforme mostra a Figura 5.

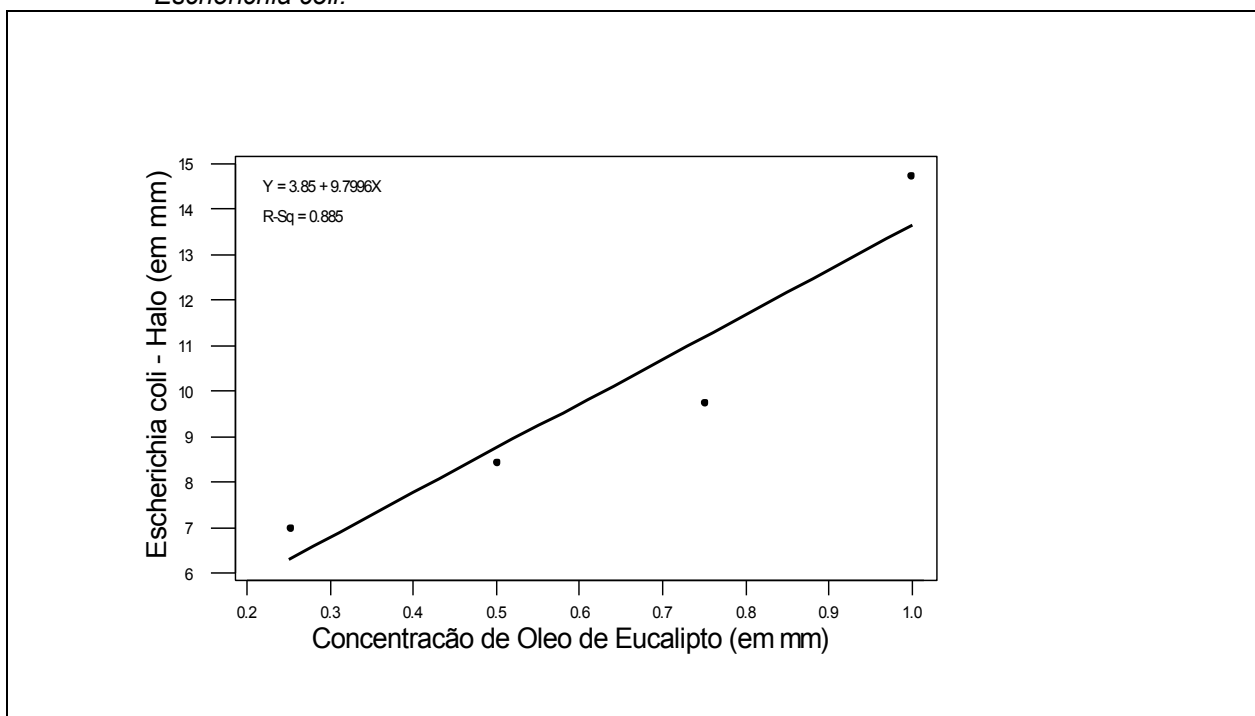
**Figura 5.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Cravo, testados em Culturas de *Escherichia coli*.



Quando avaliadas para eucalipto nas 4 concentrações em ANOVA, verificou-se também uma diferença significativa entre os outros tratamentos e concentrações, com  $F=14,47$  ( $P=0,000$ ;  $P<0,001$ ).

A Análise de Regressão Linear mostrou os valores calculados com a equação  $Y=3,85 + 9,7986X$ ; com  $F=15,33$  ( $P = 0,059$ ;  $P>0,05$ ; NS), no entanto com valor de  $R^2$  igual a 0,885, portanto acima de 0,80, conforme observado na Figura 6.

**Figura 6.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Eucalipto, testados em Culturas de *Escherichia coli*.

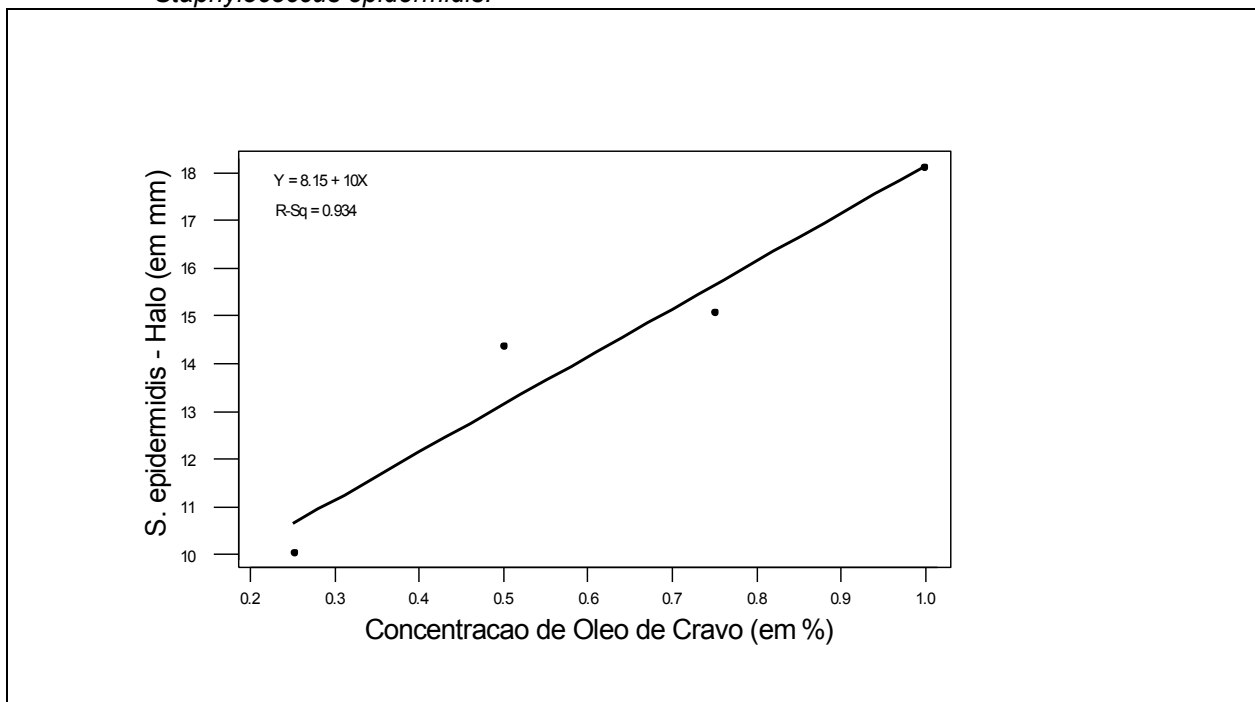


#### **IV) Para *Staphylococcus epidermidis*:**

Também foi observado valores diferentemente significativos para *Staphylococcus epidermidis*, quando testados entre todos os agentes antimicrobianos e entre todas as concentrações. Assim, verificou-se em ANOVA um valor de  $F=7,67$  (com  $P=0,000$ ;  $P<0,001$ ), fato que denota que houve diferença entre as médias obtidas.

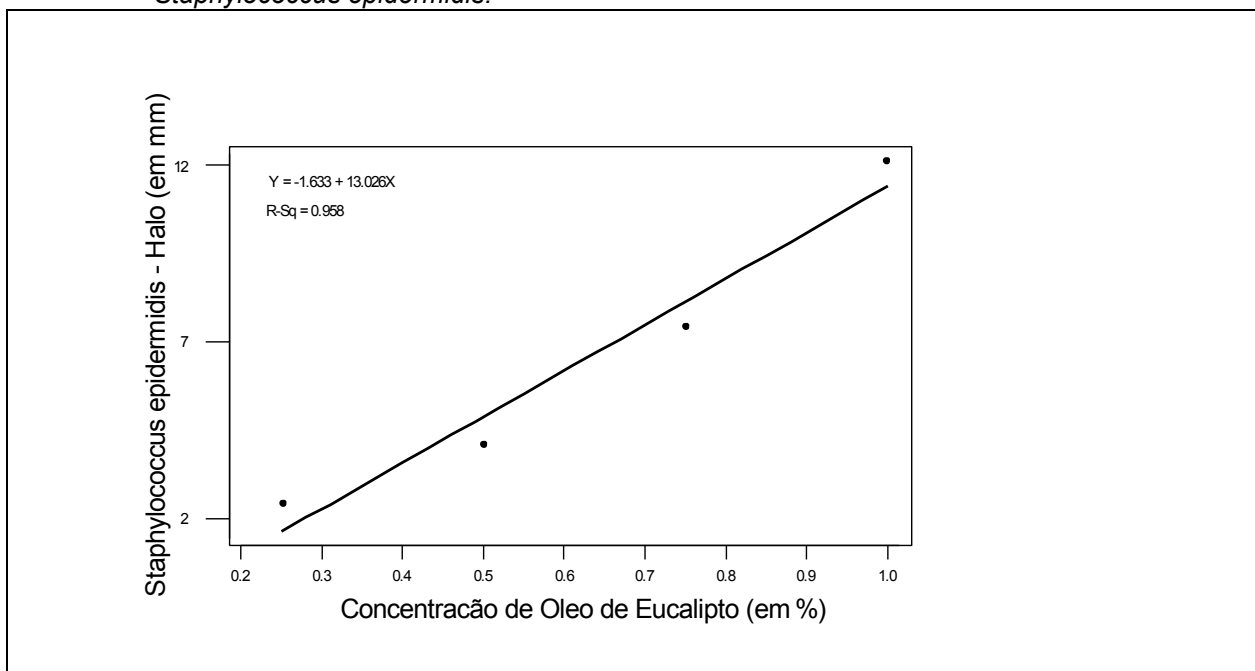
Em Análise de Regressão, quando considerados os valores obtidos para Óleo de cravo, obteve-se os valores calculados para a reta por meio da Equação:  $Y=8,15 + 10,0 X$ , com o valor de  $F=28,38$  ( $P=0,033$ ;  $P<0,05$ ). Além disso, o valor do  $R^2$  foi igual a 0,934.

**Figura 7.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Cravo, testados em Culturas de *Staphylococcus epidermidis*.



Por outro lado, ainda para *Staphylococcus epidermidis*, quando as médias foram verificadas em Análise de Regressão Linear, para as quatro concentrações de óleo de eucalipto, também observou-se valores significativos, com  $F=45,98$  ( $P=0,021$ ;  $P<0,05$ ).

**Figura 8.** Análise de Regressão Linear para o diâmetro do halo (em mm), analisados em Quatro Diferentes Concentrações (em %) de Óleo de Eucalipto, testados em Culturas de *Staphylococcus epidermidis*.



Os valores da reta calculada, foram obtidos por meio da Equação:  $Y=1,633 + 13,026 X$  (com  $R^2 = 0,958$ ), conforme mostra a Figura 8.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que, entre os 4 possíveis óleos essenciais testados como antimicrobianos, o óleo de cravo e o óleo de eucalipto foram os mais eficientes, para as quatro espécies de bactérias verificadas. Por outro lado, óleo de melaleuca mostrou pouca eficiência e óleo de nim, não mostrou qualquer eficiência para o controle antimicrobiano, nas quatro espécies testadas.

## REFERÊNCIAS

ASSUNÇÃO, P. S. **Utilização Da Torta De Neem (*Azadirachta indica*) Como Antimicrobiano em Rações de Frangos de Corte**. 2016. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), Goiânia, 2016.

CARLI, M.C. **Compostos orgânicos voláteis e extrato de alho no controle de *Meloidogyne incognita***. 2011. 61 folhas. Dissertação programa de pós graduação em Agronomia/ Fitopatologia. Universidade Federal de Lavras – Lavras.

DAS, K. et al. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobials agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research.**, Lagos, Nigéria, v.4, n. 2, p. 104-11, 2010.

FIGUEIREDO, A.C; PEDRO, L.G.; BARROSO, J.G; TRINDADE, H.; SANCHES, J.; OLIVEIRA, C.; CORREIA, M. Óleos Essenciais de Espécies de *Eucalyptus*. **AGROTEC**, Porto, Portugal, v. 8, p. 96-100, 2013.

MARTINEZ, S. S. **O Nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 142p., 2002.

MOREIRA, M.R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, Athens, Ga, USA, v.38, p.565-70, 2005.

OLIVEIRA, A.C.M.; FONTANA, A.; NEGRINI, T.C.; NOGUEIRA, M.N.M.; BEDRAN, T.B.L.; ANDRADE, C.R.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.4, p.492-499, 2011.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Quality control methods for medicinal plants methods**. Hong Kong: WHO, 1998, p. 41 – 43.

SAITO, M.L. **As plantas praguicidas**: Alternativas para o Controle de Pragas da Agricultura. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 2004.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, SP, v.35, p.275-80, 2004.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, UK, v. 53, p. 1023–1027, 2004.

THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIN, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, São Paulo, SP, v. 17, n. 1, p. 13– 17, 2000.

## One-Way Analysis of Variance – *Streptococcus pyogenes* - Cravo

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1592.9	106.2	4.16	0.000
Error	32	816.2	25.5		
Total	47	2409.1			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
S Pyo Cr	3	20.467	5.749	11.85	29.08
S Pyo Me	3	9.700	3.051	5.50	13.90
S Pyo Eu	3	12.067	0.950	10.17	13.96
S Pyo Ni	3	7.733	7.221	-1.71	17.18
S Pyo Cr	3	18.967	5.831	11.20	26.73
S Pyo Me	3	5.367	4.654	-3.52	14.19
S Pyo Eu	3	7.567	6.553	-4.92	20.00
S Pyo Ni	3	7.933	6.992	-1.99	17.86
S Pyo Cr	3	16.133	4.735	10.66	21.61
S Pyo Me	3	4.767	4.128	-3.39	12.86
S Pyo Eu	3	6.100	5.534	-3.33	15.53
S Pyo Ni	3	6.333	5.742	-3.08	15.71
S Pyo Cr	3	14.033	4.508	9.02	19.05
S Pyo Me	3	0.000	0.000	0.00	0.00
S Pyo Eu	3	2.267	3.926	-3.69	8.16
S Pyo Ni	3	2.967	5.138	-4.17	14.17

Pooled StDev = 5.051

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

## Regression - *Streptococcus pyogenes* - Cravo

The regression equation is

$$y = 11.9 + 8.85 x$$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	11.8660	0.4774	24.86	0.002
x	8.8544	0.6972	12.70	0.006

S = 0.3898

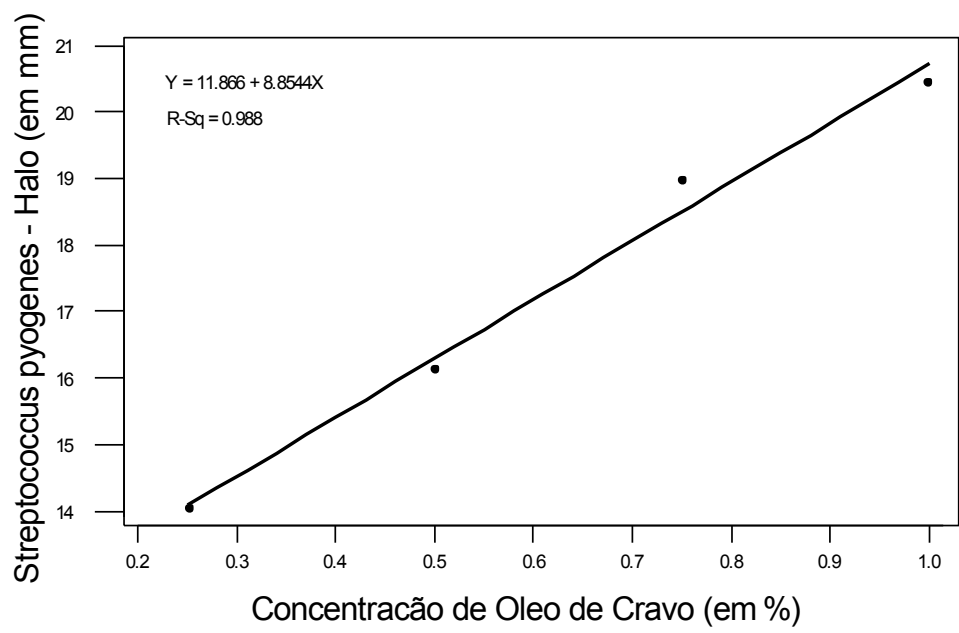
R-Sq = 98.8%

R-Sq(adj) = 98.2%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	24.500	24.500	161.27	0.006
Error	2	0.304	0.152		
Total	3	24.804			





## One-Way Analysis of Variance - *Staphylococcus aureus*- Cravo

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1756.59	117.11	12.54	0.000
Error	32	298.74	9.34		
Total	47	2055.33			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
S Aur Cr	3	19.000	3.470	11.000	27.000
S Aur Me	3	9.633	1.767	6.100	13.166
S Aur Eu	3	9.833	2.212	5.410	14.256
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Cr	3	16.367	2.566	11.234	21.500
S Aur Me	3	7.767	0.321	7.125	8.409
S Aur Eu	3	7.033	6.126	-5.057	19.123
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Cr	3	13.300	1.277	10.746	15.854
S Aur Me	3	2.367	4.099	-5.765	10.731
S Aur Eu	3	3.267	5.658	-7.124	10.590
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Cr	3	9.767	3.420	3.927	15.607
S Aur Me	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Eu	3	2.767	4.792	-6.758	11.224
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000

Pooled StDev = 3.055

0.0      8.0      16.0      24.0

## Regression *Staphylococcus aureus*- Cravo

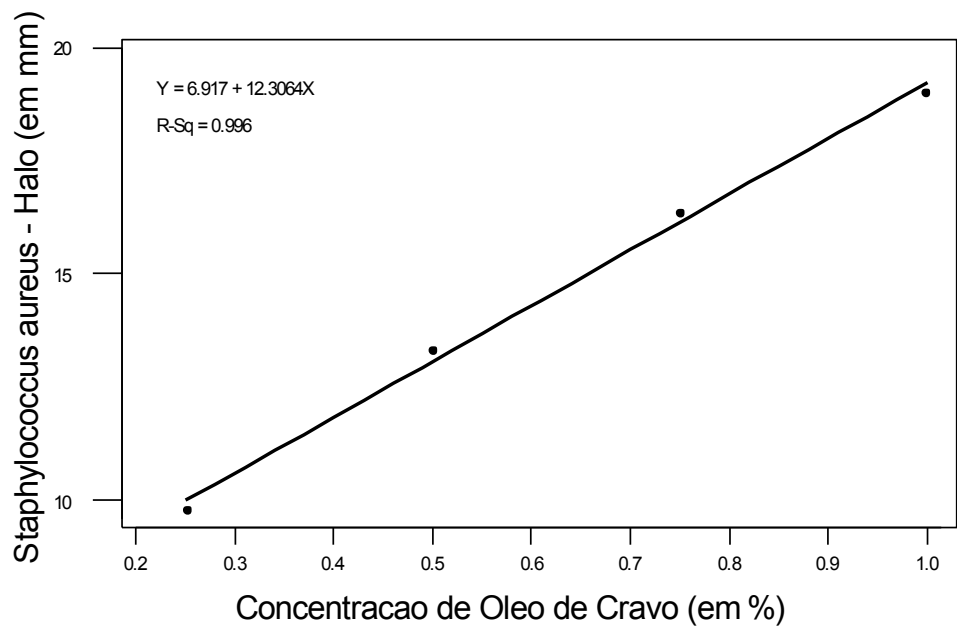
The regression equation is  
 $y = 6.92 + 12.3 x$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	6.9170	0.3898	17.75	0.003
x	12.3064	0.5693	21.62	0.002

S = 0.3182      R-Sq = 99.6%      R-Sq(adj) = 99.4%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	47.327	47.327	467.31	0.002
Error	2	0.203	0.101		
Total	3	47.530			



## One-Way Analysis of Variance – *Escherichia coli*- Cravo

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1259.38	83.96	14.47	0.000
Error	32	185.63	5.80		
Total	47	1445.01			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
E Coli C	3	14.733	2.974	11.759	17.707
E Coli M	3	9.567	2.811	6.756	12.378
E Coli E	3	14.733	5.300	8.433	21.033
E Coli N	3	2.367	4.099	-1.732	6.400
E Coli C	3	14.867	1.069	13.798	15.936
E Coli M	3	7.833	0.351	7.481	8.185
E Coli E	3	9.733	2.055	7.678	11.788
E Coli N	3	0.000	0.000	0.000	0.000
E Coli C	3	12.633	2.103	10.530	14.736
E Coli M	3	7.267	0.289	6.978	7.556
E Coli E	3	8.433	2.050	6.383	10.483
E Coli N	3	0.000	0.000	0.000	0.000
E Coli C	3	9.100	0.200	8.900	9.300
E Coli M	3	2.367	4.099	-1.732	6.400
E Coli E	3	7.000	0.361	6.639	7.361
E Coli N	3	0.000	0.000	0.000	0.000

Pooled StDev = 2.409

0.0      6.0      12.0      18.0

## Regression – *Escherichia coli*- Cravo

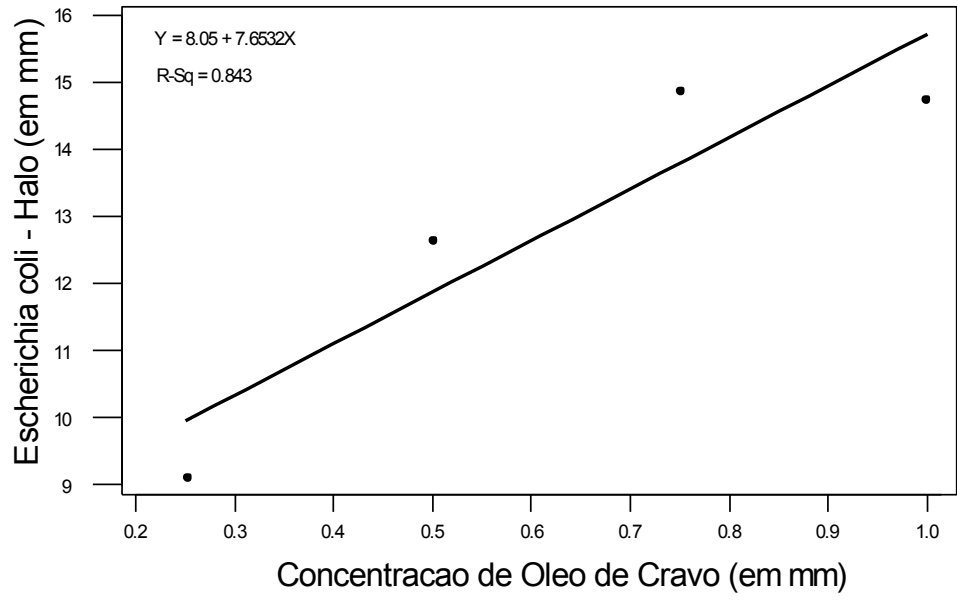
The regression equation is  
 $y = 8.05 + 7.65 x$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	8.050	1.601	5.03	0.037
x	7.653	2.339	3.27	0.082

S = 1.307      R-Sq = 84.3%      R-Sq(adj) = 76.4%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	18.304	18.304	10.71	0.082
Error	2	3.419	1.709		
Total	3	21.722			



## One-Way Analysis of Variance – *Staphylococcus epidermidis* - Cravo

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1545.8	103.1	7.67	0.000
Error	32	430.0	13.4		
Total	47	1975.8			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
S Epider	3	18.133	1.629	14.875	21.391
S Epider	3	7.633	0.513	6.607	8.660
S Epider	3	12.133	1.845	8.443	15.823
S Epider	3	2.533	4.388	-6.222	11.156
S Epider	3	15.067	2.802	11.463	18.671
S Epider	3	4.733	4.099	-3.633	13.133
S Epider	3	7.433	6.442	-5.276	20.176
S Epider	3	3.200	5.543	-7.683	11.283
S Epider	3	14.367	2.272	11.823	16.911
S Epider	3	2.133	3.695	-4.858	9.591
S Epider	3	4.067	7.044	-9.911	11.777
S Epider	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Epider	3	10.033	2.610	6.813	13.253
S Epider	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Epider	3	2.400	4.157	-5.357	10.557
S Epider	3	0.000	0.000	0.000	0.000

Pooled StDev = 3.666

0.0 8.0 16.0 24.0

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

## Regression – *Staphylococcus epidermidis* - Cravo

The regression equation is

$$y = 8.15 + 10.0 x$$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	8.150	1.285	6.34	0.024
x	10.000	1.877	5.33	0.033

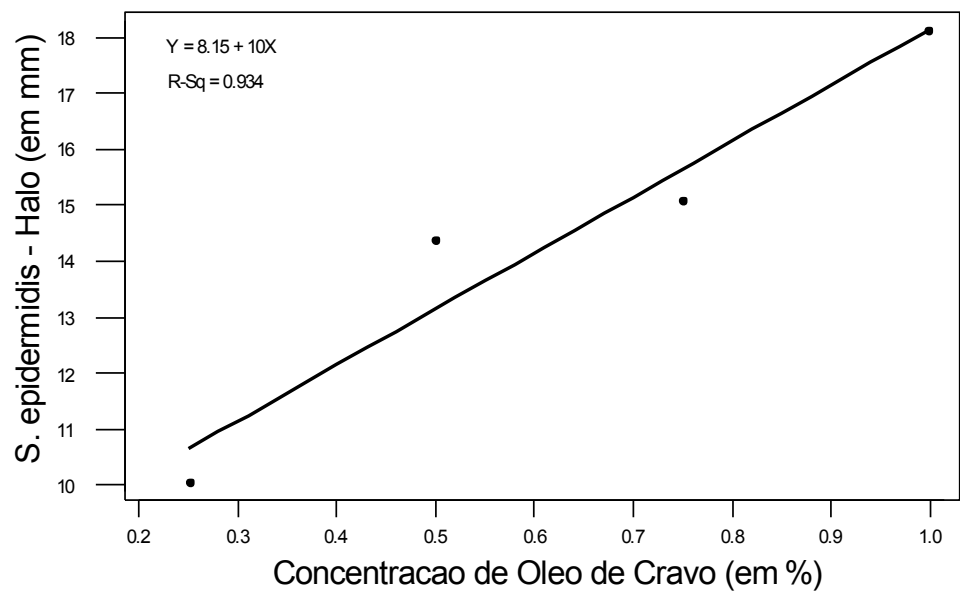
S = 1.049

R-Sq = 93.4%

R-Sq(adj) = 90.1%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	31.250	31.250	28.38	0.033
Error	2	2.202	1.101		
Total	3	33.452			



## One-Way Analysis of Variance – *Streptococcus pyogenes* - Eucalipto

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1592.9	106.2	4.16	0.000
Error	32	816.2	25.5		
Total	47	2409.1			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
S Pyo Cr	3	20.467	5.749	11.5	29.4
S Pyo Me	3	9.700	3.051	5.2	14.2
S Pyo Eu	3	12.067	0.950	10.2	13.9
S Pyo Ni	3	7.733	7.221	-1.7	17.2
S Pyo Cr	3	18.967	5.831	11.3	26.6
S Pyo Me	3	5.367	4.654	-3.5	14.2
S Pyo Eu	3	7.567	6.553	-4.4	19.4
S Pyo Ni	3	7.933	6.992	-1.9	17.8
S Pyo Cr	3	16.133	4.735	10.6	21.7
S Pyo Me	3	4.767	4.128	-3.4	12.9
S Pyo Eu	3	6.100	5.534	-3.3	15.5
S Pyo Ni	3	6.333	5.742	-3.1	15.8
S Pyo Cr	3	14.033	4.508	8.9	19.2
S Pyo Me	3	0.000	0.000	0.0	0.0
S Pyo Eu	3	2.267	3.926	-3.4	7.9
S Pyo Ni	3	2.967	5.138	-3.2	9.1

Pooled StDev = 5.051

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

## Regression - *Streptococcus pyogenes* - Eucalipto

### Regression

The regression equation is

$$y = -0.72 + 12.3 x$$

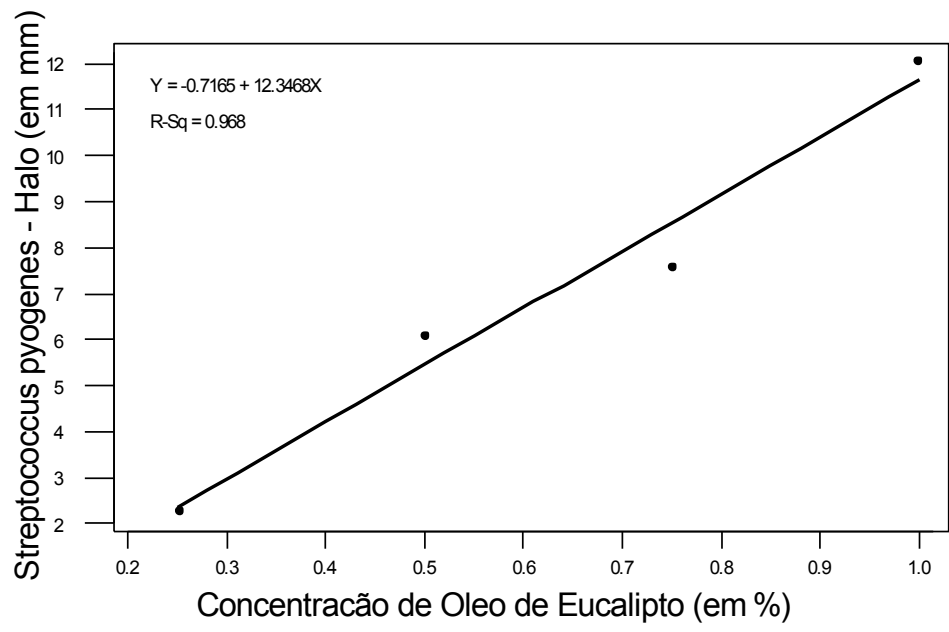
Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	-0.716	1.085	-0.66	0.577
x	12.347	1.584	7.79	0.016

S = 0.8856      R-Sq = 96.8%      R-Sq(adj) = 95.2%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	47.639	47.639	60.74	0.016
Error	2	1.569	0.784		
Total	3	49.207			





## One-Way Analysis of Variance - *Staphylococcus aureus*- Eucalipto

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1756.59	117.11	12.54	0.000
Error	32	298.74	9.34		
Total	47	2055.33			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
S Aur Cr	3	19.000	3.470	11.500	26.500
S Aur Me	3	9.633	1.767	6.100	13.166
S Aur Eu	3	9.833	2.212	5.410	14.256
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Cr	3	16.367	2.566	11.234	21.500
S Aur Me	3	7.767	0.321	7.125	8.409
S Aur Eu	3	7.033	6.126	-5.057	19.123
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Cr	3	13.300	1.277	11.746	14.854
S Aur Me	3	2.367	4.099	-5.765	10.731
S Aur Eu	3	3.267	5.658	-7.724	11.190
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Cr	3	9.767	3.420	2.927	16.607
S Aur Me	3	0.000	0.000	0.000	0.000
S Aur Eu	3	2.767	4.792	-6.758	11.224
S Aur Ni	3	0.000	0.000	0.000	0.000

Pooled StDev = 3.055

0.0      8.0      16.0      24.0

## Regression *Staphylococcus aureus*- Eucalipto

### Regression

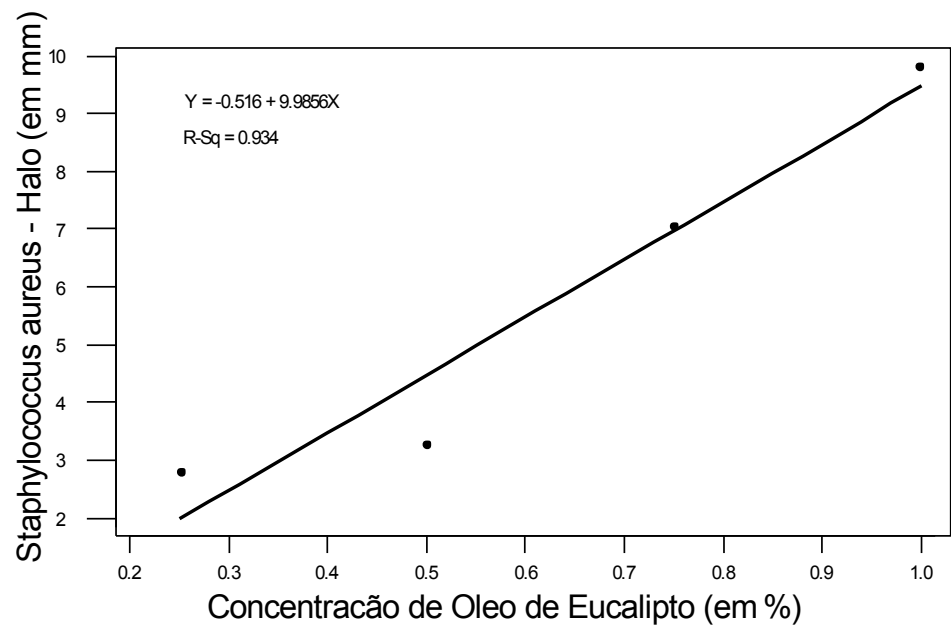
The regression equation is  
 $y = -0.52 + 9.99x$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	-0.516	1.290	-0.40	0.728
x	9.986	1.884	5.30	0.034

S = 1.053      R-Sq = 93.4%      R-Sq(adj) = 90.0%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	31.160	31.160	28.10	0.034
Error	2	2.218	1.109		
Total	3	33.378			



## One-Way Analysis of Variance – *Escherichia coli*- Eucalipto

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1259.38	83.96	14.47	0.000
Error	32	185.63	5.80		
Total	47	1445.01			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
E Coli C	3	14.733	2.974	11.759	17.707
E Coli M	3	9.567	2.811	6.756	12.378
E Coli E	3	14.733	5.300	9.433	20.033
E Coli N	3	2.367	4.099	-1.732	6.400
E Coli C	3	14.867	1.069	13.798	15.936
E Coli M	3	7.833	0.351	7.481	8.185
E Coli E	3	9.733	2.055	7.678	11.788
E Coli N	3	0.000	0.000	0.000	0.000
E Coli C	3	12.633	2.103	10.530	14.736
E Coli M	3	7.267	0.289	6.978	7.556
E Coli E	3	8.433	2.050	6.383	10.483
E Coli N	3	0.000	0.000	0.000	0.000
E Coli C	3	9.100	0.200	8.900	9.300
E Coli M	3	2.367	4.099	-1.732	6.400
E Coli E	3	7.000	0.361	6.639	7.361
E Coli N	3	0.000	0.000	0.000	0.000

Pooled StDev = 2.409

0.0      6.0      12.0      18.0

## Regression – *Escherichia coli*- Eucalipto

### Regression

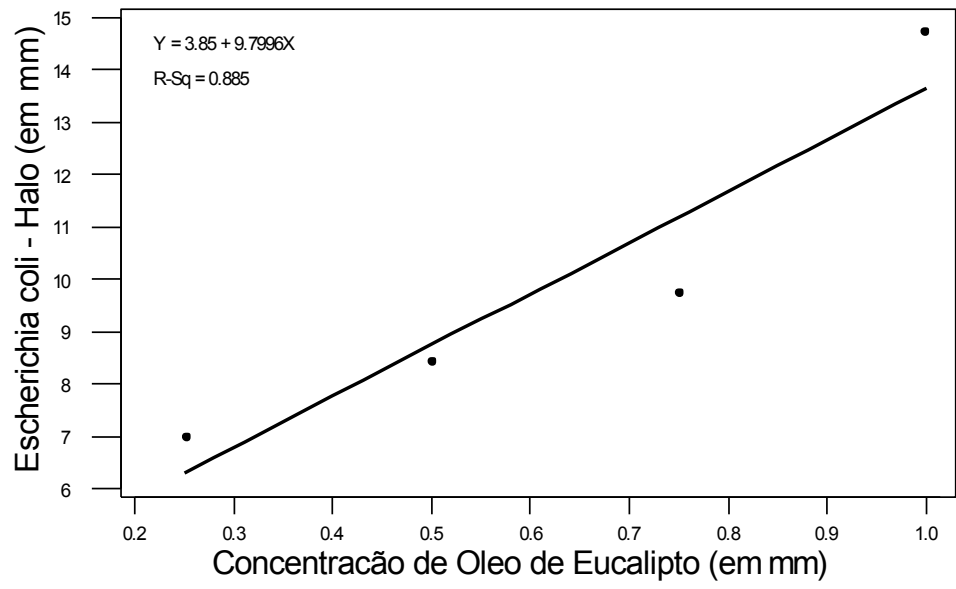
The regression equation is  
 $y = 3.85 + 9.80 x$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	3.850	1.714	2.25	0.154
x	9.800	2.503	3.92	0.059

S = 1.399      R-Sq = 88.5%      R-Sq(adj) = 82.7%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	30.010	30.010	15.33	0.059
Error	2	3.915	1.958		
Total	3	33.926			



## One-Way Analysis of Variance – *Staphylococcus epidermidis* - Eucalipto

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	15	1545.8	103.1	7.67	0.000
Error	32	430.0	13.4		
Total	47	1975.8			

### Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
S Epider	3	18.133	1.629	14.875	21.391
S Epider	3	7.633	0.513	6.607	8.659
S Epider	3	12.133	1.845	8.443	15.823
S Epider	3	2.533	4.388	-6.221	11.155
S Epider	3	15.067	2.802	11.463	18.671
S Epider	3	4.733	4.099	-3.633	13.167
S Epider	3	7.433	6.442	-5.271	20.205
S Epider	3	3.200	5.543	-7.683	11.283
S Epider	3	14.367	2.272	11.823	16.911
S Epider	3	2.133	3.695	-4.857	9.591
S Epider	3	4.067	7.044	-9.911	11.777
S Epider	3	0.000	0.000	-0.000	0.000
S Epider	3	10.033	2.610	6.813	13.253
S Epider	3	0.000	0.000	-0.000	0.000
S Epider	3	2.400	4.157	-5.357	10.557
S Epider	3	0.000	0.000	-0.000	0.000

Pooled StDev = 3.666

0.0 8.0 16.0 24.0

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

Saving worksheet in file: C:\MTBWIN\DATA\Fernando 01.mtw

\* NOTE \* Existing file replaced.

## Regression – *Staphylococcus epidermidis* - Eucalipto

### Regression

The regression equation is

$$y = -1.63 + 13.0x$$

Predictor	Coef	StDev	T	P
Constant	-1.633	1.315	-1.24	0.340
x	13.026	1.921	6.78	0.021

S = 1.074

R-Sq = 95.8%

R-Sq(adj) = 93.7%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	53.024	53.024	45.98	0.021
Error	2	2.306	1.153		
Total	3	55.330			

