

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ítalo Diego Rebouças de Araújo

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ÓLEO
ESSENCIAL E EXTRATOS ORGÂNICOS PROVENIENTES DA
Myracrodruon urundeuva (AROEIRA-DO-SERTÃO).**

Natal/RN
Janeiro de 2017

ÍTALO DIEGO REBOUÇAS DE ARAÚJO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ÓLEO
ESSENCIAL E EXTRATOS ORGÂNICOS PROVENIENTES DA
Myracrodruon urundeuva (AROEIRA-DO-SERTÃO).**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária na área de Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Sousa Andrade
Coorientador: Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes

Natal, 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro de Biociências - CB

Araújo, Ítalo Diego Rebouças de.

Atividade antimicrobiana e citotóxica de óleo essencial e extratos orgânicos provenientes da *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira-do-sertão) / Ítalo Diego Rebouças de Araújo. - Natal, 2017.

127 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Sousa Andrade.

Coorientador: Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes.

1. Plantas medicinais - Dissertação. 2. Alfa-pineno - Dissertação. 3. Concentração inibitória mínima - Dissertação. 4. Atividade bactericida - Dissertação. 5. Atividade citotóxica - Dissertação. I. Andrade, Vânia Sousa. II. Fernandes, José Veríssimo. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ÓLEO
ESSENCIAL E EXTRATOS ORGÂNICOS PROVENIENTES DA
Myracrodruon urundeuva (AROEIRA-DO-SERTÃO).**

elaborada por Ítalo Diego Rebouças de Araújo

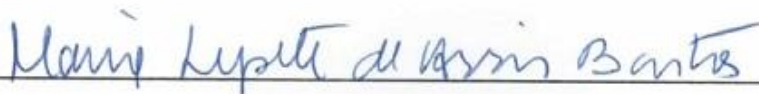
e aprovada por todos os membros da banca examinadora como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Natal, 30 de janeiro de 2017


BANCA EXAMINADORA



Dr^a. Vânia Sousa Andrade – UFRN (Orientadora)



Dr^a. Maria Lysete de Assis Bastos – UFAL



Dr^a. Vanessa de Paula Rachetti – UFRN

*Dedico aos meus maiores tesouros:
A Deus,
e aos meus pais,
Inecila Rebouças Ferreira de Araújo e Manoel de Araújo Filho.*

“Senhor, fazei de mim um instrumento de vossa Paz!”

São Francisco de Assis

Agradeço:

A Deus, fonte de sabedoria, refúgio, fortaleza e luz nos meus caminhos e decisões;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária (PPgBP) da UFRN;

À UFRN e a todos os professores do PPgBP, Vânia Andrade, José Veríssimo, Paulo Guedes, Josélio Araújo, Renata Gama; Maria Celeste de Melo, Antônia Claudia Jacome, Janeusa Trindade, Lilian Giotto, Raquel Cordeiro e Valter Andrade.

A minha orientadora Profa. Dra. Vânia Sousa Andrade que, com zelo, rigor e dedicação, me conduziu brilhantemente no percurso desse trabalho;

Às professoras Lysete Bastos e Vanessa Rachetti, por terem aceitado o convite para compor minha banca de defesa;

À professora Renata Mendonça e aos alunos do Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos Orgânicos (LISCO) do Instituto de Química, Mariane Barreto e Rusceli Diego, pelo fornecimento do material vegetal analisado e pela caracterização química do óleo essencial;

Aos professores Kleber Farias e Raimundo Araújo e aos alunos Renato Ferreira e Andreza Guerra, por colaborarem na realização dos ensaios de citotoxicidade;

Ao professor Paulo Roberto pela colaboração no tratamento estatístico do meu trabalho;

Aos colegas de mestrado, Laíse Brandão, Nayana Luiza, Camila Nobre, Ciro Fagundes, Kércia Monaline, Polyanna Silva, Maria da Conceição e Hilton Daniel pelos bons momentos compartilhados durante o curso;

À minha tia Valderice e família por todo acolhimento e suporte durante esse tempo;

Aos que acreditaram em mim e me deram todo apoio e incentivo para prosseguir: pais, familiares, amigos e irmãos da Comunidade Católica Shalom, em especial minhas autoridades Wilton Vieira, Jackeleide, Viviane Formiga e Gionara, todos os meus irmãos de célula e, em especial, aos mais próximos que acompanharam de perto minhas lutas: Élica Dias, Jefferson Ricardo, Artur Oliveira, José Lucas, Victor Guedes, Antônio Felipe, Denner Augusto, Dayanna Carvalho, Felipe Américo, Lucileno Souza, Antônio Alexandre.

Aos colegas do Laboratório de Ensaio Antimicrobianos e de Citotoxicidade (LEAC), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP), Centro de Biociências (CB), Leandro Dantas, Nayara Ribeiro, Jéssica Campos e Monalisa Sousa, com quem tive a oportunidade de colaborar nos seus experimentos e receber deles todo o auxílio necessário durante o mestrado.

Ítalo Diego Rebouças de Araújo

RESUMO

Atualmente, vêm intensificando-se os estudos na área de química medicinal com intuito de elucidar novos fitofármacos, seja através da obtenção de extratos, frações, compostos isolados ou óleos essenciais que apresentem algum tipo de atividade biológica. Neste contexto, destaca-se a aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*), da família Anacardiaceae, já estudada quanto ao potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e cicatrizante. Motivado por novas alternativas terapêuticas, considerando a crescente resistência microbiana, esse estudo avaliou a atividade antimicrobiana de produtos naturais obtidos das folhas da referida planta. Dentre estes está um óleo essencial, que foi extraído por hidrodestilação, caracterizado por RMN e GC-MS, e avaliado quanto à citotoxicidade, além de extratos orgânicos, que foram analisados quanto à atividade antimicrobiana: metanólico liofilizado, obtido por decocção; clorofórmico e acetato de etila, extraídos à temperatura ambiente com seus respectivos solventes e filtrados sob pressão reduzida. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica da microdiluição em caldo, na qual as CIMs foram determinadas utilizando CTT (cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazolium) como revelador do crescimento bacteriano, e as CBMs por meio da análise do crescimento do conteúdo dos poços em ágar BHI. A citotoxicidade do óleo foi avaliada pelo método do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio. O óleo, na caracterização química, dentre os terpenos identificados, apresentou como constituinte majoritário o α -pineno (87,85%). Além disso, tal óleo mostrou atividade antibacteriana frente a todas as cepas testadas, onde para algumas destas ocorreu equivalência entre os valores de CIM e CBM, que foram de 0,22 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, 0,44 mg/mL para *Salmonella* Enteritidis e 7 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Já para *Staphylococcus epidermidis* a CIM foi 0,11 mg/mL e a CBM 0,22 mg/mL. *Escherichia coli* foi inibida com CIM de 0,88 mg/mL e CBM de 1,75 mg/mL. Equivalência entre CIM e CBM foi observada para extrato metanólico frente a *S. epidermidis* (9,75 mg/mL). Para *S. aureus*, a CIM deste extrato foi de 9,75 mg/mL e a CBM 78 mg/mL. Foram resistentes a tal extrato: *E. coli*, *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa*. Os extratos clorofórmico e acetato de etila foram bacteriostáticos frente às cinco cepas, porém, o clorofórmico inibiu todas estas

com CIM de 15 mg/mL, enquanto o acetato de etila apresentou CIMs de 7,56 mg/mL para *S. aureus*, 1,89 mg/mL para *S. epidermidis*, 15,12 mg/mL para *S. Enteritidis* e 30,25 mg/mL tanto para *E. coli* quanto para *P. aeruginosa*. Quanto à citotoxicidade, o óleo essencial comprometeu a viabilidade celular da linhagem Vero E6, apenas na maior concentração, 4,4 mg/mL, inibindo cerca de 93,91% em 24h e 94,26% em 48h. Nas células HeLa, em 24h o óleo nessa mesma dose, teve inibição de 21%, que após 48h aumentou para 44,3%, mostrando possível ação antitumoral. Para a linhagem de células não tumorais HEK-293, o óleo não exerceu efeito tóxico sobre as mesmas. Conclui-se que os resultados são promissores, abrindo perspectivas futuras dos produtos das folhas de *M. urundeuva* serem farmacologicamente viáveis.

Palavras-chave: α -pineno; plantas medicinais; concentração inibitória mínima; atividade bactericida; atividade citotóxica.

ABSTRACT

Nowadays, studies in the field of medicinal chemistry have been intensified to elucidate new phytopharmaceuticals, by either obtaining extracts, fractions, isolated compounds or essential oils that present some type of biological activity. In this context, stands out the aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*), of the family Anacardiaceae, studied regarding the antimicrobial, anti-inflammatory and cicatrizing potential. Motivated by new therapeutic alternatives, considering the growing microbial resistance, this study evaluated the antimicrobial activity of natural products obtained from the leaves of said plant. Among these is an essential oil, which was extracted by hydrodistillation, characterized by NMR and GC-MS, and evaluated for cytotoxicity, in addition, organic extracts, which were analyzed for antimicrobial activity: lyophilized methanolic obtained by decoction; Chloroform and ethyl acetate, extracted at room temperature with their respective solvents and filtered under reduced pressure. The antibacterial activity was evaluated by the microdilution technique in broth, in which the MICs were determined using CTT (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) as a bacterial growth promoter, and the CBMs were analyzed by growth analysis of the contents of wells on BHI agar. The cytotoxicity of the oil was evaluated by the MTT method, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. The oil had as main constituent the α -pinene (87.85%) among the terpenes identified in the chemical characterization. In addition, this oil showed antibacterial activity against all strains tested, where for some of these, equivalence between MIC and MBC values, which were 0.22 mg/mL for *Staphylococcus aureus*, 0.44 mg/mL for *Salmonella* Enteritidis and 7 mg/mL for *Pseudomonas aeruginosa*. For *Staphylococcus epidermidis* the MIC was 0.11 mg/mL and the MBC was 0.22 mg/mL. *Escherichia coli* was inhibited with MIC of 0.88 mg/mL and MBC of 1.75 mg/mL. Equivalence between MIC and MBC was observed for methanolic extract against *S. epidermidis* (9.75 mg/mL). For *S. aureus*, the MIC of this extract was 9.75 mg/mL and the MBC 78 mg/mL. They were resistant to such extract: *E. coli*, *S. Enteritidis* and *P. aeruginosa*. Chloroform and ethyl acetate extracts were bacteriostatic against the five strains, but chloroform inhibited them all with MICs of 15 mg/mL, while ethyl acetate had MICs of 7.56 mg/mL for *S. aureus*, 1.89 mg/mL for *S. epidermidis*, 15.12 mg/mL

for *S. Enteritidis* and 30.25 mg/mL for *E. coli* and *P. aeruginosa*. Regarding cytotoxicity, the essential oil compromised the cell viability of the Vero E6 line, only at the highest concentration, 4.4 mg/mL, inhibiting about 93.91% in 24h and 94.26% in 48h. In HeLa cells, in 24h the oil at the same dose had inhibition of 21%, which after 48h increased to 44.3%, showing a possible antitumor action. For the non-tumor cell line HEK-293, the oil had no toxic effect. It is concluded that the results are promising, opening future prospects for *M. urundeuva* leaf products being pharmacologically viable.

Key-words: α -pinene; medicinal plants; minimum inhibitory concentration; bactericidal activity; cytotoxic activity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SIGLAS	15
1. REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1 Plantas medicinais no Brasil x fitoterapia	17
1.2 Óleos essenciais	19
1.3 <i>Myracrodruon urundeuva</i> – aspectos farmacobotânicos.....	20
1.4 Características dos microrganismos testados.....	21
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	21
1.4.2 <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis	25
1.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
1.5 Importância clínica dos microrganismos testados.....	30
1.6 Tratamento e Resistência.....	34
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Material vegetal	42
4.2 Obtenção do óleo essencial e dos demais extratos	42
4.3 Caracterização química do óleo essencial	44
4.4 Microrganismos.....	44
4.5 Teste da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	45
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	47
4.7 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	47
4.8 Ensaio de Citotoxicidade.....	48
4.9 Análise estatística	50
5. RESULTADOS	51
5.1 Caracterização química do óleo essencial	51

5.2	Determinação das CIMs e das CBMs.....	52
5.3	Avaliação <i>in vitro</i> da Citotoxicidade do OE de <i>M. urundeuva</i>	53
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÕES	70
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS	95
	ANEXO A – ARTIGO.....	115
	ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia da *Myracrodruon urundeuva*. Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/66517430>.

Figura 2. Esquema do hidroddestilador do tipo Clevenger. Fonte: acervo próprio.

Figura 3. Representação da distribuição das concentrações em mg/mL na diluição seriada para o óleo essencial de *M. urundeuva*, realizadas na microdiluição em caldo em placa de 96 poços.

Figura 4. Representação da distribuição das concentrações em mg/mL na diluição seriada para os extratos de *M. urundeuva*, realizadas na microdiluição em caldo em placa de 96 poços

Figura 5. Reação de redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ao formazam (Adaptado de Opwis et al., 2012).

Figura 6. Esquema do semeio do conteúdo dos poços selecionados da microplaca em ágar BHI. Fonte: acervo próprio.

Figura 7. Espectro do óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva* obtido por NMR ¹H (Fonte: acervo próprio).

Figura 8. Percentual de viabilidade de células VERO tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 24h (Fonte: acervo próprio).

Figura 9. Percentual de viabilidade de células VERO tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 48h (Fonte: acervo próprio).

Figura 10. Percentual de viabilidade de células HeLa tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 24h (Fonte: acervo próprio).

Figura 11. Percentual de viabilidade de células HeLa tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 48h (Fonte: acervo próprio).

Figura 12. Percentual de viabilidade de células HEK-293 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 24h (Fonte: acervo próprio).

Figura 13. Percentual de viabilidade de células HEK-293 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 48h (Fonte: acervo próprio).

Figura 14. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (Fonte: Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do óleo essencial identificados por CG-MS (quantificados por CG-FID). aValores são expressos em porcentagens; Estruturas obtidas do programa ChemSketch.

Tabela 2. Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do controle positivo (gentamicina) e das amostras obtidas da Myracrodruon urundeuva: óleo essencial (OE), extrato metanólico (EM), extrato clorofórmico (EC) e extrato acetato de etila (EAE).

Tabela 3. Viabilidade (%) das células VERO tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de Myracrodruon urundeuva. Média e desvio padrão obtidos do Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

Tabela 4. Viabilidade (%) das células HeLa tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de Myracrodruon urundeuva. Média e desvio padrão obtidos do Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

Tabela 5. Viabilidade (%) das células HEK-293 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de Myracrodruon urundeuva. Média e desvio padrão obtidos do Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

LISTA DE SIGLAS

ASA	Ágar sangue
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Controle crescimento
CG-DIC	Cromatografia Gasosa Acoplada a detector de ionização de chamas
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standart Institute
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DAEC	<i>E. coli</i> difusivamente aderente
DEC	<i>E. coli</i> diarreiogênica
DMEM	Meio Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAE	Extrato acetato de etila
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EC	Extrato clorofórmico
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EM	Extrato metanólico
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EXPEC	<i>E. coli</i> associada a infecções extraintestinais
IMP	Imipenem
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITU	Infecção do trato urinário
KIA	Ágar ferro de Kingler
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácidos lipoteicóicos

MBLs	Metalo-beta-lactamases
MC	Ágar MacConkey
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MSCRAMM	Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
OEs	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PER	<i>Pseudomonas</i> extended resistance
PBP	Penicillin-binding proteins
PIA	Polysaccharide intercelular adhesin
ppm	Partes por milhão
PS/A	Polysaccharide adhesin
PT	Fagotipo
RI	Índice de retenção de Kovat
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome
SE	Staphylococcal enterotoxins
SFB	Soro fetal bovino
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
SIM	Sulfeto-indol-motilidade
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
TSI	Ágar tríplice açúcar ferro
TSST-1	Toxic shock syndrome toxin -1
VIM	Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase
VM	Vermelho de metila
VP	Voges-Proskauer
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Plantas medicinais no Brasil x fitoterapia

As plantas medicinais, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), compreendem “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998). A utilização desses vegetais com fins terapêuticos, visando tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das formas mais comuns de praticar medicina na humanidade desde os tempos mais antigos (VEIGA JR. et al., 2005). Esta prática se tornou uma tradição que foi sendo transmitida e incorporada ao longo de gerações até os dias atuais (LORENZI e MATOS, 2002).

No Brasil, a utilização das plantas medicinais é observada desde o período colonial, onde produtos de origem natural eram empregados no controle de diversas enfermidades que assolavam os habitantes das terras brasileiras. Já em meados do século XVIII, as propriedades dessas plantas foram estudadas e divulgadas no mundo científico, contribuindo para o início da construção de uma ampla rede de informações a respeito das possíveis aplicações das drogas naturais na medicina do Brasil (SANTOS, 2008). Isso foi possível pelo fato do país possuir um patrimônio genético e cultural significativo correspondente a 20% das espécies vegetais do planeta (BORGES et al., 2010). Plantas de biomas brasileiros, tais como Floresta Amazônica, Mata Atlântica e o Cerrado, têm sido utilizadas pelas populações locais como fármacos naturais no tratamento de várias doenças tropicais, como esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES et al., 2000).

Até o século XX, no Brasil já se tinha um amplo conhecimento acerca do uso das plantas medicinais com fins curativos. Entretanto, com o advento da industrialização e com o avanço da tecnologia foi deixado um pouco de lado o uso tradicional de plantas medicinais, que passaram a ser vistas como atraso tecnológico. Isso decorre do fato de que, nessa época, ocorreu uma grande

ascensão na elaboração de fármacos sintéticos, que passaram a substituir em muitos casos o uso dessa fonte natural (LORENZI e MATOS, 2002).

Atualmente, a cultura do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas vem sendo novamente valorizada. Mesmo que as drogas sintéticas ainda representem a maioria dos medicamentos utilizados pela população, os fitoterápicos também têm conseguido espaço cada vez maior na farmácia caseira (TOMAZZONI et al., 2006; ANTONIO et al., 2014). Sabendo-se que a população brasileira possui acesso limitado a medicamentos, a utilização dessa prática terapêutica traz variadas vantagens, como baixo custo, fácil acesso, diminuição de efeitos adversos e redução dos riscos de intoxicação por uso inadequado (FURLAN, 1998).

É importante que haja uma clara distinção entre planta medicinal e fitoterápico. Diferentemente do conceito de plantas medicinais, citado pela OMS (WHO, 1998), a Resolução RDC nº14, de 31 de março de 2010, emitida pela ANVISA, propõe uma nova definição de medicamento fitoterápico, que está em vigor até os dias de hoje. A resolução preconiza que os fitoterápicos, para serem considerados medicamentos, devem ser obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas (previsto no § 1º). Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (previsto no § 2º). Além disso, não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (previsto no § 3º).

A fitoterapia é uma das práticas da medicina que mais tem crescido ao longo dos anos. A razão para tal crescimento se deve aos estudos científicos químicos e farmacológicos, nos quais se analisa a eficácia das plantas medicinais. Dentre as plantas estudadas, as de maior destaque nessas descobertas são as utilizadas pela população com finalidade terapêutica (FILHO e YUNES, 1998).

O aumento considerável do consumo de plantas como alternativa no tratamento de algumas doenças decorre, principalmente, das terapias naturais, através do uso de compostos de plantas com finalidades farmacêuticas. Ademais, a utilização de fitoterápicos se deve, em parte, ao surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos empregados rotineiramente na prática médica (PEREIRA et al., 2004). Dentre as diversas substâncias naturais com potencial antimicrobiano, destacam-se os óleos essenciais.

1.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais consistem em misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, que apresentam monoterpenos e sesquiterpenos nas suas composições (SIMÕES e SPITZER, 2003). Tais compostos compreendem os metabólitos secundários de plantas aromáticas, que além de possuírem propriedades conhecidas como anti-inflamatórios, analgésicos, antiespasmódicos, antissépticos, anestésicos e sedativos (EDRIS, 2007; BAKKALI et al., 2008), estão envolvidos no metabolismo secundário das plantas atuando em diversas funções importantes à sobrevivência vegetal, como, por exemplo, na defesa contra microrganismos (LIMA et al., 2006).

Estudos mostram que os óleos essenciais desempenham atividade antimicrobiana *in vitro* (REICHLING et al., 2009; UPADHYAY, DWIVEDI e AHMAD, 2010; LANG e BUCHBAUER, 2012; SOUSA et al., 2012; XIONG et al., 2013), sendo, portanto, uma alternativa para superar a crescente resistência de agentes patogênicos. Os óleos essenciais também vêm sendo investigados por alguns pesquisadores quanto ao seu potencial anticâncer (SYLVESTRE et al., 2005; SYLVESTRE et al., 2006). Entretanto, para aplicações futuras dos óleos essenciais na terapêutica medicinal existe a necessidade de melhor elucidar suas ações biológicas (PACKER e LUZ, 2007).

O óleo essencial extraído das folhas da *Myracrodruon urundeuva* compreende uma mistura de terpenos que ainda não foram totalmente elucidados. Com base nas

premissas, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* as atividades antimicrobiana e citotóxica de um óleo essencial extraído das folhas de *M. urundeuva* cultivadas no nordeste do Brasil.

1.3 *Myracrodruon urundeuva* – aspectos farmacobotânicos

A *Myracrodruon urundeuva* - aroeira-do-sertão (Figura 1) é uma planta pertencente à família *Anacardiaceae* que vem despontando nos estudos fitoquímicos. Trata-se de uma árvore endêmica da caatinga, largamente distribuída no território brasileiro, pelas Regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, e estendendo-se até a região chaquenha da Bolívia, Paraguai e Argentina. Na sua fase adulta, esta planta pode atingir uma altura entre 5 e 20m variando de acordo com a região onde ocorre (NUNES et al, 2008).



Figura 1. Fotografia da *Myracrodruon urundeuva*. Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/66517430>.

Estudos destacam a importância da *M. urundeuva* quanto às suas propriedades medicinais no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias,

urinárias e distúrbios no sistema digestório (LORENZI e MATOS, 2002). É confirmado em dados científicos que esta espécie apresenta ação antiinflamatória, cicatrizante (RODRIGUES, 1999; ALBUQUERQUE et al., 2004), analgésica (VIANA et al., 2003) e antiulcerogênica (CARLINI et al., 2010).

Esse vegetal vem se destacando quanto ao seu potencial antimicrobiano. O estudo de Alves et al. (2009) relata a ação inibitória de extratos hidroalcoólicos *M. urundeuva* sobre a formação de biofilme dental de algumas bactérias e fungos. Atividade semelhante é constatada por Menezes et al. (2010), que, *in vivo*, observaram uma redução na formação de biofilme a partir da administração oral de um extrato aquoso desse vegetal. Em um ensaio *in vitro*, Pinho et al (2012) evidenciaram que os extratos hidroalcoólicos das folhas da *M. urundeuva* apresentavam ação frente à espécie *Staphylococcus aureus*, relatando ainda que o extrato era composto por esteróides, fenóis simples, flavonas, flavonoides, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, saponinas, taninos e xantonas. Os autores sugerem que, possivelmente, um ou alguns desses compostos desenvolvem atividade antimicrobiana, isoladamente, ou interagindo entre si, motivando pesquisas na possível utilização destas substâncias na fitoterapia, com o intuito de tratar as infecções causadas por bactérias de importância médica, como as descritas no presente trabalho.

1.4 Características dos microrganismos testados

1.4.1 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis* são integrantes da microbiota anfibiótica, sendo encontrados colonizando pele e mucosas do homem e animais. Pertencem ao Filo Firmicutes e compreendem o Gênero I da Família V (“Staphylococcaceae”), Ordem I (Bacillales^{AL}), na Classe III (“Bacilli”) (GARRITY et al., 2004). São imóveis, não esporulados e catalase-positivos. São vistos aos pares, tétrades, cadeias curtas e, principalmente agregados em forma semelhante a cachos

de uva. Possuem diâmetro que varia entre 0,5 a 1,5 μm (KONEMAN et al., 2008). São Gram-positivos, apresentando parede celular composta por proteínas, ácidos teicóicos, lipoteicóicos (LTA) e peptidoglicano, no qual constitui 90% desta composição. Esta forma uma estrutura compacta e rígida, onde se ligam resíduos de ácido N-acetilmurâmico por meio de resíduos de glicina (TRABULSI et al., 2008).

O *S. aureus* é considerado uma das bactérias mais resistentes dentre as não formadoras de esporos, permitindo sobreviver por longos períodos em objetos inanimados e secos que frequentemente entram em contato com o homem (SCHAECHTER, et al., 2002). Já o *S. epidermidis* é a espécie mais ubíqua dentre os estafilococos de importância médica. Embora seja mais presente em quadros infecciosos, quando comparado ao *S. aureus*, se mostra menos patogênico que este, por possuir uma quantidade inferior de fatores de virulência. Além disso, é encontrado na pele de humanos de forma mais abundante que outras bactérias do mesmo Gênero, uma vez que secretam bacteriocinas, antibióticos que atuam contra outros Gram-positivos, favorecendo sua dominância nos mesmos nichos de colonização (EIFF, PETERS e HEILMANN, 2002).

As estruturas de superfície desses dois estafilococos correspondem aos seus próprios fatores de virulência no hospedeiro. No *S. aureus*, a virulência desta bactéria é conferida por componentes de superfície celular e toxinas (SCHAECHTER et al., 2002). A cápsula, de natureza polissacarídica, tem por função antifagocítica. Os ácidos teicóicos e lipoteicóicos (LTA) da parede estimulam a produção de citocinas através da ativação da via alternativa do complemento. A proteína A se liga à porção Fc dos anticorpos, impedindo a fagocitose pelas células de defesa (LOWY, 1998).

Outras estruturas que atuam como fatores de virulência dessa bactéria são as proteínas que se ligam à fibronectina, ao colágeno e ao fibrinogênio, também conhecidas por MSCRAMM (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules), adesinas atuantes na colonização do *S. aureus* nos tecidos e na fixação em superfícies inanimadas. A proteína que se liga ao fibrinogênio, conhecida como fator *clumping*, liga-se ao fibrinogênio livre. (FOSTER e HOOK, 1998).

Quanto aos fatores de virulência produzidos de forma livre pelo *S. aureus*, temos as toxinas e as enzimas. Existem três principais classes de toxinas: citotoxinas, superantígenos e as que degradam moléculas de adesão das células do epitélio cutâneo. Como destaque entre as citotoxinas, temos a α -toxina e a leucocidina, ambas destroem leucócitos, liberando suas citocinas no meio extracelular, o que possivelmente desencadeiam o choque séptico. Outras citotoxinas produzidas por esta bactéria, são as que lisam hemácias, como beta, gama e delta hemolisinas (LOWY, 1998).

As toxinas que são superantígenos são assim chamadas porque estimulam nos linfócitos T a produção de citocinas que causam choque. São conhecidos dois tipos de toxinas superantígenos: TSST-1 (toxic shock syndrome toxin -1), que causa febre e síndrome do choque tóxico estafilocócico; e as enterotoxinas estafilocócicas (SE – staphylococcal enterotoxins), responsáveis por quadros de intoxicação alimentar estafilocócica. As toxinas que degradam moléculas de adesão do epitélio cutâneo, são conhecidas como esfoliatinas, que causam a síndrome da pele escaldada (LOWY, 1998).

Além das toxinas esse Gram-positivo produz enzimas extracelulares promovem a hidrólise de moléculas teciduais. Tal mecanismo, além de facilitar a disseminação desta bactéria nos tecidos, gera nutrientes importantes para seu metabolismo e proliferação. Dentre estas enzimas, a mais conhecida é a coagulase, que promove a coagulação do plasma, caracterizando a espécie. Além desta estão a catalase, lipases, DNase, hialuronidase, proteases e estafiloquinase (LOWY, 1998).

Quanto aos fatores de virulência do *S. epidermidis*, diferentemente do *S. aureus*, não há uma grande gama de produtos extracelulares como enzimas e toxinas. Por este motivo, tal bactéria tende a desenvolver um quadro infeccioso subagudo ou crônico. O que promove de forma mais eficaz a patogênese do *S. epidermidis* é a sua grande capacidade de formar biofilme ao aderir às superfícies de polímero, através de uma molécula chamada de PS/A (polysaccharide adhesin), e aderir umas às outras formando camadas, através de uma molécula denominada PIA (polysaccharide intercelular adhesin). Portanto, o biofilme destaca-se como o principal fator de virulência desse patógeno. (HEILMANN et al., 1996; MACK, 1999). Tal fator, além de proteger a bactéria dos mecanismos de defesa do hospedeiro,

dificulta a penetração de antimicrobianos e cria um microambiente próprio para a proliferação exclusiva dessa espécie, uma vez que as bacteriocinas produzidas impedem a proliferação de outros microrganismos no interior do biofilme formado (EIFF, PETERS e HEILMANN, 2002).

Além do biofilme, sabe-se que a patogenia do *S. epidermidis* também é conferida pela ação de uma toxina, a δ -toxina, que causa a lise celular de eritrócitos; a cisteína protease, que degrada proteínas do sistema imune do hospedeiro; e as lipases GehC e GehD, que são proteínas que se ligam ao colágeno, possivelmente favorecendo a colonização na pele (VUONG e OTTO, 2002).

Para o diagnóstico laboratorial, no isolamento primário do *S. aureus*, as colônias apresentam-se com tamanho grande, com borda circular, convexas, opacas, consistência cremosa, com odor característico de queijo e formando halo de beta-hemólise em ágar sangue (ASA) (OPLUSTIL et al., 2000). No isolamento seletivo em ágar manitol sais, as colônias são amareladas com halo amarelo em volta decorrente da presença de ácido produzido a partir da fermentação do manitol (KONEMAN et al., 2008).

De acordo com a literatura, o *S. aureus* já foi isolado de diversas amostras clínicas de humanos tais como: abscessos cutâneos (COELHO, DINIZ e FILHO, 2009), aspirado traqueal (FERREIRA, 2013), escarro (KLEIN e GOULART, 2008), lavado broncoalveolar (NOGUEIRA et al., 2009), secreção traqueal (MORAES e SANTOS, 2003), biópsias (LEAL et al., 2003), cateter (NETTO et al., 2009), sêmen (IKEAGWU, et al., 2008), fezes (ANDRADE e ZELANTE, 1989), líquido peritoneal (JACOBOWSKI et al., 2005), líquido cefalorraquidiano (HÖRNER et al., 2008), sangue (TIZOTTI et al., 2010), secreção de feridas (KEMPFER et al., 2010) e urina (SOARES et al., 2006).

Quanto à morfologia e aspecto das colônias no isolamento inicial de *S. epidermidis*, assim como os demais estafilococos coagulase negativos, estas se apresentam com tamanho médio, elevadas, com borda circular, opacas, consistência cremosa, geralmente com ausência de hemólise em ASA, com odor de queijo e, em ágar manitol sais, são brancas sem halo de fermentação em volta (OPLUSTIL et al., 2000).

O *S. epidermidis*, segundo estudos já foi possível isolá-lo das seguintes amostras clínicas humanas: abscessos cutâneos (CARVALHO et al., 2007), lavado broncoalveolar (GRANDE et al., 2002), secreção traqueal (MORAES e SANTOS, 2003), biópsias (LEAL et al., 2003), cateter (PEDROLO et al., 2011), sêmen (MORETTI et al., 2009), líquido peritoneal (ALMEIDA et al., 2007), líquido cefalorraquidiano (HÖRNER et al., 2008), sangue (MORAES e SANTOS, 2003), secreção de feridas (KEMPFER et al., 2010) e urina (CORREIA et al., 2007).

Na identificação presuntiva dos cocos Gram-positivos, inicialmente realiza-se o teste da catalase para diferenciar estafilococos de outros cocos Gram-positivos. A detecção da presença dessa enzima, através da formação de bolhas devido à conversão do peróxido em água e oxigênio gasoso, indica que o microrganismo possivelmente pertencente ao Gênero *Staphylococcus* spp. (TU e PALUTKE, 1976).

Uma vez identificado o Gênero *Staphylococcus* spp., para diferenciar o *S. aureus* dos estafilococos coagulase-negativos, é feito o teste da coagulase, que consiste na detecção da presença desta enzima pela visualização da formação de coágulo, decorrente da conversão de fibrinogênio em fibrina (LANDAU e KAPLAN, 1980).

Para identificar os estafilococos coagulase-negativos, sendo estes detectados previamente pelo teste da coagulase, existe uma série de provas bioquímicas possíveis para este fim. No entanto, na rotina clínica se faz uso principalmente do teste de sensibilidade à novobiocina, para diferenciar fenotipicamente o *S. epidermidis* (sensível) de outros estafilococos coagulase-negativos frequentemente presentes nos isolados clínicos, como, por exemplo, o *S. saprophyticus* (resistente) (GOLDSTEIN et al., 1983).

1.4.2 *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis

A Família Enterobacteriaceae, se encontra dentro da Ordem Enterobacteriales (GARRITY et al., 2004). São bastonetes Gram-negativos fermentadores que estão presentes no homem, predominantemente na microbiota

normal do intestino (MOURA et al., 2012). Dentre as enterobactérias, a *Escherichia coli*, cujo comprimento varia entre 1,5 µm e 7,6 µm e a largura varia entre 0,8 µm e 1,6 µm (OSIRO et al., 1998), constitui uma das espécies bacterianas mais abundantes da microbiota intestinal do homem, sendo relatada também em outros animais de sangue quente. Trata-se de um microrganismo ubíquo largamente distribuído na natureza, em plantas, na água e no solo (TANNOCK, 1995), mostrando sensibilidade elevada a ambientes secos. Tal sensibilidade provavelmente decorre do fato dessa bactéria não ser esporulada, ou seja, em condições ambientais adversas, não formar esporos, tornando-se mais vulnerável a uma desidratação (SOUZA et al., 2001). É o membro mais comum e importante do Gênero *Escherichia*, também denominada de bactéria entérica ou coliforme (TRABULSI et al., 2008).

Outros Gram-negativos pertencentes a este grupo são as bactérias do Gênero *Salmonella* spp., que possuem entre 2 e 5 µm de comprimento e entre 0,7 e 1,5 µm de largura (CASTILLA, 2003). São móveis, anaeróbios facultativos, crescem adequadamente a 37°C, a um pH 7,0, que é o ideal, mas pode variar de 4,0 a 9,0. Assim como a *E. coli*, também são sensíveis a ambientes secos, por não serem formadores de esporos (BACK e ISHIZUKA, 2010). Trata-se de um Gênero de grande participação nas toxinfecções por veiculação de alimentos contaminados, pelo fato de ser uma bactéria ubíqua de ampla distribuição na natureza (BERSOT, 2006), onde as aves são seus principais reservatórios, cuja bactéria permanece ativa nos seus subprodutos (SU et al., 2011). Nesses animais as *Salmonella* spp. integram a microbiota intestinal, colonizando a porção do íleo (THOMPSON e APPLGATE, 2006).

O Gênero *Salmonella* está subdividido em duas espécies principais: *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori*. *S. enterica* divide-se em 6 subespécies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica*. O termo Enteritidis é designado pela sorotipagem. Portanto, a *Salmonella* Enteritidis pertence à espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis. Para facilitar, usa-se geralmente a abreviação Gênero e sorotipo: *Salmonella* Enteritidis (POPOFF e LE MINOR, 1997). Juntamente com a *Salmonella* Thyphimurium, a *S. Enteritidis*

constitui um dos principais sorotipos que estão relacionados a salmonelose humana (BORSOI et al., 2011).

Como todas as bactérias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, a *E. coli* e a *S. Enteritidis* apresentam membrana citoplasmática, espaço periplasmático, uma camada delgada de peptidoglicano e uma membrana externa. A membrana externa contém porinas, lipopolissacarídeos (LPS), além de fímbrias e adesinas que possibilitam a sua fixação. Além disso, apresentam uma estrutura capsular que envolve a membrana externa. Possui múltiplos filamentos flagelares que partem do citoplasma (TRABULSI et al., 2008).

Essas estruturas celulares mencionadas apresentam comportamento antigênico *in vivo*. Os flagelos são chamados de antígenos H, a cápsula é chamada de antígeno K e no LPS estão contidos o antígeno somático O, que compreende o polissacarídeo de cadeia lateral dessa molécula; o antígeno comum, que trata-se do polissacarídeo central; e o lipídio A, que é uma endotoxina. Tais antígenos, assim como para os demais membros da família Enterobacteriaceae, representam a base para a identificação sorológica dessas bactérias (TRABULSI et al., 2008). Além dessas estruturas antigênicas, as enterobactérias produzem outras moléculas como enterotoxinas, hemolisinas, fímbrias e pili que, *in vivo*, atuam como fatores de virulência, desencadeando os quadros clínicos da doença (TIBA et al., 2008).

No diagnóstico laboratorial, as colônias da *E. coli* são de tamanho médio, com borda circular, achatadas, opacas, de consistência seca, com odor de vinagre, apresentam beta-hemólise em ASA e coloração rosa no meio MacConkey (MC), devido à fermentação da lactose. Para amostras de urina, esta bactéria cresce em meio CLED (OPLUSTIL et al., 2000). No homem, a *E. coli* já foi isolada a partir das seguintes amostras clínicas: abscessos cutâneos (COELHO, DINIZ e FILHO, 2009), biópsias (LEAL et al., 2003), sêmen (SANOCKA-MACIEJEWSKA, et al., 2005), urina (RODRIGUES e BARROSO, 2011), fezes (SCALETSKY et al., 2001), secreções do trato respiratório (OLIVEIRA et al., 2007), líquido cefalorraquidiano (HÖRNER et al., 2008), líquido peritoneal (ALMEIDA et al., 2007), cateter (PEDROLO et al., 2011) e secreções de feridas (KEMPFER et al., 2010).

No diagnóstico laboratorial das bactérias do Gênero *Salmonella* spp., dentre as quais se encontra a *S. Enteritidis*, no isolamento primário são observadas colônias pequenas, circulares, convexas, translúcidas, brilhantes, sem odor característico, sem hemólise no ASA e incolores no MC, por não fermentar lactose (OPLUSTIL et al., 2000). No meio seletivo, ágar *Salmonella-Shigella* (SS), comumente usado para isolar seletivamente os Gêneros *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., as colônias de *S. Enteritidis* são incolores com o centro negro, devido à produção de sulfetos (KING e METZGER, 1968). *S. Enteritidis* presente em isolados humanos, conforme mostrado em estudos, já foi detectada em amostras de sangue (TAVECHIO et al., 1996) e fezes (PERESI et al., 1998).

Na identificação presuntiva dos bacilos Gram-negativos fermentadores, pertencentes à família das Enterobacteriaceae, na qual estão incluídas a *E. coli* e a *S. Enteritidis*, as principais provas bioquímicas realizadas rotineiramente no laboratório clínico na pré-triagem destes microrganismos são: fermentação de carboidratos, produção de gás, produção de sulfeto, citrato, motilidade, indol, urease e fenilalanina desaminase.

Na fermentação de açúcares, geralmente é avaliada nos meios ágar tríplice açúcar ferro (TSI) ou ágar ferro de Kingler (KIA), a *E. coli* se apresenta como fermentadora tanto de glicose, quanto de lactose, gerando acidez em todo meio, que fica amarelo. Já as bactérias do Gênero *Salmonella* spp., como a *S. Enteritidis*, são fermentadoras da glicose, gerando acidez no fundo do tubo, e não fermentam a lactose, permanecendo inalterada a coloração da superfície inclinada. Além disso, são produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S), que dá ao meio uma coloração negra. Tanto para *E. coli*, quanto *S. Enteritidis* observa-se a produção de gás, devido ao processo de fermentação (KONEMAN et al., 2008).

Na prova do citrato, a *S. Enteritidis* é citrato positiva, devido a atividade da enzima citratase, cuja mudança na coloração de verde para azul é resultante do aumento do pH do meio. A *E. coli* geralmente é citrato negativa. Tanto *E. coli* quanto *S. Enteritidis* são urease e fenilalanina desaminase negativas, por não produzirem tais enzimas. No meio SIM (Sulfeto-indol-motilidade), onde é possível observar que ambas bactérias são móveis, apenas *S. Enteritidis* produz sulfeto e apenas *E. coli* é indol positiva, por ser capaz de promover a reação do indol com o reagente p-

dimetilaminobenzaldeído, conferindo coloração vermelha ao meio devido à presença dos reagentes de Kovac e Erlich (MACFADDIN, 1980). Na prova de descarboxilação dos aminoácidos a *E. coli* realiza descarboxilação da lisina e da ornitina, com exceção da arginina, enquanto a *S. Enteritidis* é capaz de descarboxilar lisina, ornitina e arginina (CLSI, 2016).

1.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa*, trata-se de um bacilo Gram-negativo não formador de esporos, que apresenta-se isolado ou aos pares e possui aproximadamente 1,5 a 3,0 μm de comprimento e 0,5 a 0,7 μm de espessura, apresentando motilidade devido à presença de um único flagelo polar (TRABULSI et al., 2008). Este microrganismo pertence à Ordem Pseudomonadales, Família Pseudomonaceae e Gênero *Pseudomonas* (DUARTE, CARELI e SILVA, 2011). Fisiologicamente é uma bactéria aeróbia, podendo crescer anaerobicamente na presença de nitrato como acceptor final de elétrons. Uma vez que não é fermentadora, obtêm energia dos carboidratos por um processo oxidativo. É capaz de crescer numa ampla faixa de temperatura, 4 a 42°C (PITT e BART, 1997).

Esta espécie é ubíqua, sendo comumente encontrada em solo, água e vegetais, além de compor a microbiota normal da pele e garganta de indivíduos saudáveis. Pode ser considerada oportunista, uma vez que causa doença em indivíduos imunocomprometidos. Uma característica marcante dessa espécie é a formação de uma camada mucoide na superfície do meio de cultura, chamada *slime*, importante na formação de biofilme (TRABULSI et al., 2008).

Dentre os fatores de virulência produzidos pela *P. aeruginosa* estão os polissacarídeos extracelulares como o alginato, componente do *slime*, capaz de impedir a fagocitose, dificultar a difusão de antibióticos e facilitar a colonização pelo patógeno (WOODS et al., 1997). A toxina A tem a função de bloquear a síntese protéica e causar a destruição tecidual, sendo a mais prejudicial proteína extracelular desta bactéria. Outra proteína é a exoenzima-S, que inibe a síntese

protéica e está envolvida na patogênese. A maioria das cepas também produz um ou mais pigmentos, sendo o mais comum a piocianina, que retarda o crescimento de outras bactérias, facilitando sua colonização (TRABULSI et al., 2008). As fímbrias medeiam adesão às células epiteliais e as adesinas não fimbriadas aderem ao muco. Tal adesão é fundamental na colonização dos pulmões, sendo um fator importante para desencadear a fibrose cística (PIER, 1998).

Na identificação laboratorial de rotina da *Pseudomonas aeruginosa* alguns dos indícios devem ser avaliados para suspeitar de sua presença no isolamento primário, como a ausência de crescimento no MC e, no ASA, a formação β -hemólise com produção de pigmento esverdeado (piocianina) (KONEMAN et al., 2008), além de apresentar colônias médias, com bordas irregulares, achatadas, transparentes, brilhantes e com odor característico de uva (OPLUSTIL et al., 2000). Com base em dados da literatura, algumas das amostras clínicas nas quais já se fez o isolamento de *P. aeruginosa* foram: biópsias (LEAL et al., 2003), líquido peritoneal (JACOBOWSKI et al., 2005), secreção de feridas (KEMPFER et al., 2010), urina (NOGUEIRA et al., 2009), líquido cefalorraquidiano (HÖRNER et al., 2008), lavado broncoalveolar (NOGUEIRA et al., 2009) e cateter (NETTO et al., 2009).

Quanto às provas bioquímicas adicionais para identificação presuntiva da *P. aeruginosa*, não é observado crescimento no TSI ou no KIA, pelo fato de se tratar de um não fermentador (HUGH e LEIFSON, 1953). Trata-se de um microrganismo que diferencia-se das enterobactérias acima descritas, por ser positivo para a prova da urease, sendo capaz de hidrolisar a uréia liberando amônia, o que conseqüentemente eleva o pH do meio, que na presença do indicador fenolftaleína, observa-se uma coloração vermelho-rosa (CHRISTENSEN, 1946). Essa bactéria é capaz de descarboxilar apenas os aminoácidos arginina e ornitina, e não a lisina (CLSI, 2016).

1.5 Importância clínica dos microrganismos testados

Dentre os estafilococos, o *Staphylococcus aureus*, espécie coagulase-positiva, e as duas coagulase-negativas *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*, são as mais comumente observadas em infecções humanas (KONEMAN et al., 2008). A grande relevância do *S. aureus* na saúde pública está no fato deste ser um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas de origem, tanto comunitária, quanto hospitalar (ANDRADE, 2008), além de muitos dos seus portadores serem assintomáticos (CAVALCANTI et al., 2006).

Por o *S. aureus* ser um patógeno oportunista, a infecção é adquirida tanto por bactérias residentes na microbiota do próprio indivíduo, quanto por bactérias aderidas a superfícies de instrumentos médicos como catéteres e próteses, o que propicia que essa bactéria esteja envolvida na etiologia de um grande número de quadros clínicos, seja em nível de pele, como foliculite, furunculose, carbunculose, impetigo e infecções em sítios cirúrgicos; seja a nível sistêmico, como endocardites e bacteremias (CASEY, LAMBERT e ELLIOTT, 2007). É o agente etiológico da síndrome do choque tóxico (DINGES, ORWIN e SCHLIEVERT, 2000) e da síndrome da pele escaldada (LADHANI et al., 1999), além de participar de quadros de intoxicações alimentares (FISHER et al., 2007).

O *S. epidermidis*, dentre os estafilococos coagulase-negativos, é o mais frequentemente isolado de amostras clínicas (ARCHER, 2000). A sua sobrevivência em superfícies inócuas, como polímeros, está relacionada à sua capacidade potencial de produzir biofilme (EIFF, PETERS e HEILMANN, 2002; BERNARDI et al., 2007). Esse Gram-positivo tem atuado como patógeno em endocardites (KARCHMER, ARCHER e DISMUKES, 1988), infecções do trato urinário (SATO et al., 2005), oftálmicas (JANSEN et al., 1991), associadas a próteses e cateteres (PEDROLO et al., 2011), relacionadas à catéteres de diálise peritoneal (SIERADZKI et al., 1999), em meningites (MORAES e SANTOS, 2003) e em bacteremia (CUNHA et al., 2002).

A *E. coli* é um patógeno emergente de grande importância na saúde pública mundial. Geralmente, esse bacilo Gram-negativo permanece inócuo no lúmen intestinal. Entretanto, em hospedeiros imunossuprimidos, debilitados ou com as barreiras gastrointestinais violadas, as mesmas estirpes de *E. coli*, que antes se mostravam inofensivas, passam a causar infecções que podem limitar-se apenas a

nível de superfícies mucosas ou podem se disseminar por todo o corpo (NATARO e KAPER, 1998). Quando patogênica, causa infecção do trato urinário (SANTO et al., 2006), meningite (FARIA e FARHAT, 1999) e doenças diarreicas (SALVADORI et al., 2003), além de septicemias (ORSKOV, F. e ORSKOV, I., 1992). Das infecções agudas do trato urinário a *E. coli* é o principal agente etiológico (RODRIGUES e BARROSO, 2011).

A ampla diversidade patogênica da *E. coli* decorre principalmente da ação de cepas envolvidas com infecções intestinais, que foram denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC). Dentro dessa espécie, baseando-se em características clínicas, epidemiológicas e presença de fatores de virulência, as DEC são atualmente agrupadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusivamente aderente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998). Além destas, existe também uma categoria que está associada a infecções extraintestinais (EXPEC) (TRABULSI et al., 2008). Devido às diferenças entre as propriedades de virulência das cepas diarreio gênicas de *E. coli*, cada categoria desencadeia a diarreia por um mecanismo distinto, todas marcadas por náuseas e dores abdominais (SCHAECHTER et al., 2002).

A EPEC provoca diarreia acompanhada de vômito e febre, sendo a principal causa da diarreia infantil (NATARO e KAPER, 1998). A EHEC é o agente causador da colite hemorrágica caracterizada clinicamente por diarreia aguda sanguinolenta e febre baixa ou quase inexistente. Em alguns casos a enterocolite evolui para a síndrome hemolítica urêmica (SHU), uma doença grave caracterizada pela falência aguda dos rins e pela destruição das hemácias, chegando a ser letal (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A EHEC conhecida como O157:H7 pode desencadear um quadro de púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), caracterizada por febre, insuficiência renal, anemia hemolítica, trombocitopenia e manifestações neurológicas. (MENG et al., 2001).

A EIEC provoca gastroenterite semelhante à causada por *Shigella*, cujos sintomas são: mal estar, febre e presença de muco e sangue nas fezes (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Já a ETEC, provoca diarreia aquosa, chamada diarreia do viajante, normalmente acompanhada de febre baixa. Na forma mais severa da

doença, a perda excessiva de água nas fezes pode levar à desidratação (GATTI et al., 1989). A cepa EAEC está associada a diarreias crônicas, ocorrendo a presença de sangue em cerca de 11% dos casos (MENG et al., 2001). Os sinais e sintomas nas infecções com cepas DAEC consistem em diarreia aquosa com ausência de sangue e leucócitos (NATARO e KAPER, 1998).

A *Salmonella* Enteritidis, dentre os membros do Gênero, tem seu destaque na saúde pública por ser o principal agente etiológico da salmonelose, notificada em países de primeiro mundo (RABSCHA et al., 2001). Trata-se de uma enfermidade de caráter zoonótico, no qual as aves domésticas destinadas ao consumo humano constituem os principais reservatórios desse patógeno (ANDREATTI et al., 2009; SU et al., 2011). Os principais sinais clínicos desta doença são: diarreia sanguinolenta e quadro febril (ENDERSON et al., 1999). Clinicamente, *S. Enteritidis* está subdividida por critérios sorológicos, em vários fagotipos (PT). Entretanto estudos relatam predominância dos fagotipos 8 e 13a (PT-8 e PT-13a) nos EUA (HICKMAN-BRENNER, STUBBS e FARMER, 1991), e do fagotipo 4 (PT-4) na Europa (STEVENS et al., 1989) e no Brasil (IRINO et al., 1996).

A *S. Enteritidis* tem sido o principal agente isolado de alimentos envolvidos em surtos alimentares (GEIMBA et al., 2004), principalmente os de origem animal, derivados do frango (COSTALUNGA e TONDO, 2002), tornando evidente a necessidade de controle no processamento desses alimentos. De acordo com Medeiros et al. (1998), o uso de probióticos nas aves é capaz de reduzir a colonização intestinal nesses animais, e conseqüentemente diminuir a incidência dessa bactéria nas criações comerciais e frango, contribuindo na minimização da infecção alimentar em humanos.

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno nosocomial oportunista, envolvido em infecções hospitalares, sendo visto principalmente em pacientes imunocomprometidos (LOUREIRO, 2002), muitas vezes acompanhados de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias, que se tornam porta de entrada para esta bactéria (OLIVEIRA et al., 1998). Esta espécie tem sido associada a uma ampla variedade de infecções como: bacteremias, infecções do trato urinário, infecções do trato respiratório e infecções oculares e de ouvido (JOHNSON et al., 1991).

As infecções no trato urinário por *P. aeruginosa* estão geralmente relacionadas ao uso de cateteres contaminados, colonizados tanto pela microbiota do paciente como por microrganismos já aderidos à superfície do mesmo (FOXMAN, 2002). A bacteriúria pode ocasionar febre, cistites, pielonefrites e morte por septicemia (WARREN, 1997). Uma vez que coloniza facilmente o trato respiratório, está relacionada com o aumento da severidade da Fibrose Cística, sendo a causa principal da morbidade e mortalidade nesta doença (SILBERT, BARTH e SADER, 2001). Surtos provocados por *P. aeruginosa* multirresistentes têm sido detectados em várias unidades de internação. Tais surtos podem ser breves ou persistentes, sendo o patógeno detectado por mais de um ano nesses estabelecimentos (FREITAS e BARTH, 2002). É importante destacar que os portadores assintomáticos são um veículo importante destes patógenos no ambiente hospitalar (FERNANDES, 2001).

1.6 Tratamento e Resistência

Os antibióticos são, na sua essência, metabólitos secundários produzidos por microrganismos. A capacidade dos microrganismos produzirem antibióticos e desenvolverem mecanismos de resistência decorre do intenso processo evolutivo que sofreram ao longo de bilhões de anos na natureza. Tal processo se deu devido a competições de nichos no qual um dado microrganismo seria sensível a antibióticos produzidos por um outro distinto. Além disso, microrganismos têm desenvolvido seus próprios mecanismos de resistência ou adquirido-os diretamente de microrganismos produtores de antibióticos, por meio de transferência de material genético (LEVY, 1992).

O emprego dos quimioterápicos no tratamento de doenças microbianas decorre desde 1940, onde acreditaram que a partir dali essas doenças seriam facilmente controladas e não representariam mais uma ameaça ao homem do século vindouro. No entanto, o uso abusivo dos antibióticos tem gerado uma pressão seletiva, tendo como consequência natural o surgimento e disseminação de

mecanismos de resistência entre diferentes populações bacterianas (LEVY, 1992; GOLDSTEIN et al., 2001).

Com o surgimento de estirpes bacterianas resistentes a uma variedade crescente de antibióticos, tem se observado a ineficácia no tratamento atual das doenças bacterianas, o que torna a resistência aos antimicrobianos um problema ecológico global. Atualmente, a letalidade de muitas infecções causadas por bactérias multirresistentes é similar a que era observada antes da introdução dos antibióticos como agentes terapêuticos (COHEN, 1992).

Outro fator que contribui para a disseminação de genes de resistência é a facilidade que as bactérias apresentam em atravessar barreiras geográficas, seja por dispersão natural, através do vento ou de animais migratórios, ou por meio de viagens nacionais e internacionais realizadas pelo homem (SCHMIDT et al., 2001). A principal força responsável pela aquisição de resistência das bactérias a drogas é a facilidade com que as bactérias adquirem genes de resistência, que podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou, mais comumente, em plasmídeos, conhecidos como elementos genéticos móveis (SABTCHEVA et al., 2009).

Os plasmídeos são os principais responsáveis pelo espalhamento de genes de resistência dentro de uma população bacteriana. Esses genes podem ser transferidos horizontalmente entre bactérias distintamente relacionadas quanto à espécie ou ao gênero, o que acelera ainda mais a disseminação da resistência na população microbiana e, por sua vez, limita o emprego dos antibióticos no tratamento clínico de doenças bacterianas (SODA et al., 2008; SABTCHEVA et al., 2009).

Fenótipos de resistência aos antibióticos são perceptíveis nas bactérias graças à presença de um ou mais mecanismos moleculares de resistência. Dentre os mecanismos de resistência de grande relevância estão a inativação enzimática, as alterações no sítio alvo e alterações na permeabilidade (TENOVER et al., 2006). Sabe-se que a resistência aos antibacterianos pode estar associada a diversos processos, como a modificação do composto antimicrobiano, alteração de seu sítio de ação e a formação de biofilmes (NOUGAYRÈDE et al., 2003).

Nos estafilococos, a resistência aos antibióticos como a penicilina é observada desde o início do uso clínico da penicilina G, na década de 40 (MOREIRA e DAUM, 1995). Atualmente, tanto os estafilococos coagulase-positivos quanto os coagulase-negativos, mostram elevada resistência aos beta-lactâmicos penicilina G, penicilina V, amoxicilina e ampicilina (TRABULSI et al., 2008), devido à degradação dessas drogas por beta-lactamases, codificadas em genes plasmidiais (LACEY, 1973). Com objetivo de driblar tal resistência, outros antibióticos desse mesmo grupo passaram a ser empregados para combater estes estafilococos, como meticilina, oxacilina e cefalosporinas de primeira e segunda gerações. Entretanto, novas cepas resistentes a essas drogas começaram a emergir (HALEY et al., 1982; BROSETA et al., 2006; FERREIRA et al., 2011).

A resistência à meticilina é observada nos MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes), na qual é mediada pela aquisição do gene *mecA*, carregado por um elemento genético móvel chamado cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec), que passa a codificar uma proteína ligadora de penicilina (PBP2a) de baixa afinidade aos beta-lactâmicos (MULLIGAN et al., 1993; ANVISA, 2016). *S. epidermidis* e os estafilococos coagulase-negativos de importância clínica, demonstram resistência à oxacilina (CUNHA e LOPES, 2002; ROSA et al., 2009). Além da resistência aos beta-lactâmicos, a resistência dos estafilococos a macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas já é bem conhecida (KAATZ e SEO, 1997).

Para tratar as infecções por MRSA, os glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina são os mais indicados (ANVISA, 2016). No entanto, estafilococos com resistência a estes glicopeptídeos já foram encontrados em isolados clínicos (GOLDRICK, 2002; ROSSI et al., 2014). Estas estirpes são chamadas de VRSA (*Staphylococcus aureus* vancomicina resistentes). Para este tipo de resistência, a alternativa terapêutica mais atual são as estreptograminas e as oxazolidinonas, como é o caso da Linezolida (MULAZIMOGLU, DRENNING e YU, 1996; RYBAK et al., 1998).

Nas enterobactérias, grande parte da aquisição dos genes de resistência se dá pela troca de informação genética entre cepas da mesma espécie e com espécies distintas. Um estudo desenvolvido por Okamoto et al. (2011) confirma tal

fato, uma vez que relata a transferência de genes de resistência por meio de plasmídeos de *E. coli* para outras espécies, também pertencentes a família Enterobacteriaceae.

Vários mecanismos de resistência aos antibióticos já foram descritos para as enterobactérias. Dentre estes estão: a resistência a ampicilina, um beta-lactâmico, por meio das betalactamases; ao sulfametoxazol-trimetoprim através da mutação no gene da enzima envolvida na síntese do ácido fólico (dipteroato sintetase); à tetraciclina por meio de bombas de efluxo; ao cloranfenicol por inativação enzimática e proteínas exportadoras específicas; e ao ácido nalidíxico, através de proteínas exportadoras específicas e mutações pontuais no gene da enzima alvo (BRICEÑO et al., 2010; MOSQUITO et al., 2011). Além destes existem os sistemas de efluxo de múltiplas drogas (MOREIRA et al., 2009).

Para a maioria dos episódios de gastroenterites, o tratamento não é recomendado, uma vez que grande parte das diarreias são autolimitadas e o uso excessivo de antibióticos proporciona aumento da seleção de resistência (SMITH et al., 2011). Entretanto, a antibioticoterapia é recomendada em casos específicos como a diarreia do viajante, causada por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), onde se faz necessária a utilização de norfloxacina ou ciprofloxacina (KASS, 2005), e nos quadros de diarreia causados por *S. Enteritidis* e outras *Salmonellas* entericas, é recomendado o uso de cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas (TRABULSI, 2008). Entretanto, já se tem relatos de resistência a fluoroquinolonas em *Salmonella* spp. (SOUZA, MAGNANI e OLIVEIRA, 2010).

No tratamento das infecções do trato urinário (ITU) por Gram-negativos, os antibióticos mais comumente utilizados são as fluoroquinolonas (RANDRIANIRINA et al., 2006). Porém já foram identificadas estirpes de *E. coli* resistentes a essa classe de antibióticos (GOETTSCHE et al., 2000). Nesse caso, os mais indicados são a nitrofurantoína e cefalosporinas de primeira geração, para ITU não complicada; e as “novas” quinolonas (norfloxacina e ciprofloxacina), por possuírem maior espectro de ação, são mais indicadas nas ITU graves, para evitar a indução de resistência (HEILBERG et al., 2003).

Já nas meningites bacterianas, as cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima e ceftriaxona, são os antibióticos mais utilizados no tratamento, pois, além de apresentarem excelente atividade antibacteriana contra microrganismos Gram-negativos, apresentam poucos efeitos adversos e, rapidamente, tornam o líquido cefalorraquidiano estéril (FARRAR et al., 1998).

Comparando-se às Enterobactérias, a *P. aeruginosa* apresenta-se menos suscetível à maior parte dos antimicrobianos (NEVES et al., 2011). Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos, já elucidados neste patógeno, consistem principalmente em bombas de efluxo de múltiplas drogas, redução da permeabilidade ao antimicrobiano e a expressão de enzimas (NORDMANN, 2003).

Pelo mecanismo de bomba de efluxo, a *P. aeruginosa* apresenta-se resistente a penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol, excetuando-se o imipenem. Um exemplo comum de sistema de bomba de efluxo é o complexo MexAB-OprM (LIVERMORE, 2001). Acerca dos mecanismos de resistência que envolvem expressão enzimática, na *P. aeruginosa* têm sido identificadas as beta-lactamases da classe A de Ambler, como a PER (*Pseudomonas extended resistance*), que degrada aztreonam, cefalosporinas de terceira geração e as de quarta geração como o cefepime. Além destas as metalo-beta-lactamases (MBLs), da classe B de Ambler, degradam, com exceção dos monobactams, os inibidores de beta-lactamases sulbactam, tazobactam e clavulanato. As MBL mais conhecidas são VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) e IMP (Imipenemase) (CASTANHEIRA, 2004).

No tratamento das infecções por *P. aeruginosa*, os carbapenêmicos são os mais eficazes. No entanto recomenda-se que o seu uso seja restrito, empregando-os como drogas de reserva no tratamento de infecções por cepas resistentes a outros agentes betalactâmicos (SANTOS et al., 2002).

Em decorrência da ineficácia dos quimioterápicos tradicionais frente às infecções bacterianas de caráter resistente, recentemente tem ocorrido um crescente interesse no uso de outras ferramentas no combate a esses microrganismos. Os fitoterápicos têm mostrado uma crescente eficiência nessa questão. Os extratos vegetais com ação antimicrobiana se apresentam como uma

nova alternativa terapêutica no combate aos microrganismos resistentes (PALMEIRA et al., 2010). Espera-se que, a princípio, as moléculas obtidas desses compostos naturais de origem vegetal atinjam nas células dos patógenos resistentes, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos (DUARTE, 2006).

As substâncias fitoquímicas extraídas dessas plantas que apresentam ação antimicrobiana podem ser divididas em diversas categorias. Dentre estas destacam-se compostos fenólicos (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, flavonas, taninos), alcaloides, lectinas, poliacetilenos, terpenóides e óleos essenciais (VERMELHO et al., 2008). A atividade antimicrobiana desses compostos parece estar associada ao seu caráter lipofílico, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células (SIKKEMA et al., 1995). Os antibióticos de origem vegetal possuem uma estrutura química distinta daqueles derivados de microrganismos, podendo assim regular o metabolismo intermediário de patógenos, por meio de ativação ou bloqueio das reações de síntese enzimática, ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005).

Mediante a crescente resistência bacteriana frente aos antibióticos tradicionais e sintéticos, utilizados rotineiramente no tratamento das doenças microbianas, tem crescido a busca por novas fontes terapêuticas. Neste sentido, no Brasil, a investigação de materiais naturais como novos agentes antibacterianos tem aumentado de forma significativa, onde diferentes extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas têm sido testados (DUARTE, 2006).

Diante do exposto, o trabalho aqui descrito relata a atividade antibacteriana do óleo essencial (OE) e dos extratos metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila, obtidos das folhas da *Myracrodruon urundeuva*, quando testados frente a cinco cepas padrão das bactérias de importância médica: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de plantas no tratamento de infecções é conhecido e trabalhos científicos nessa área tentam comprovar a eficácia dessa aplicação milenar (MIGLIATO et al., 2006; MACIEL et al., 2008; SÁ et al., 2011). Para tanto, averiguar a eficácia e segurança do emprego de extratos e óleos em testes laboratoriais minimiza alguns problemas, como intoxicação ou dosagem inapropriada. Entre os vegetais que podem apresentar potencial ação antimicrobiana está a *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), árvore endêmica da caatinga, largamente distribuída no território brasileiro, pertencente à Família Anacardiaceae. Com o intuito de ampliar o arsenal terapêutico já existente, tendo em vista a crescente resistência bacteriana aos antibióticos sintéticos utilizados rotineiramente na clínica, o presente trabalho tem por finalidade avaliar, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella* Enteritidis (INCQS 500258), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), a atividade antibacteriana de um óleo essencial e três extratos orgânicos (metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila), extraídos das folhas de exemplares da *Myracrodruon urundeuva* cultivados no Nordeste do Brasil. Do óleo também foi avaliada a citotoxicidade frente às linhagens celulares Vero E6, HeLa e HEK-293. Os resultados destes ensaios podem abrir perspectivas no sentido de incentivar pesquisas futuras na descoberta de compostos bioativos presentes tanto no óleo quanto nos três extratos, que sejam possíveis candidatos para o desenvolvimento de novos fitoterápicos eficazes, que não ofereçam riscos de toxicidade para o homem, com possível atividade antibacteriana, visando diminuir custos e valorizar a flora brasileira.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana e citotóxica de amostras vegetais extraídas das folhas da *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão): três extratos orgânicos (metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila) e um óleo essencial.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar quimicamente o óleo essencial de *M. urundeuva*;
- ❖ Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do óleo e dos três extratos orgânicos (metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila) da *M. urundeuva* frente às cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella* Enteritidis (INCQS 500258);
- ❖ Determinar as concentrações bactericidas mínimas (CBMs) das mesmas amostras vegetais frente às espécies bacterianas citadas;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial frente às linhagens celulares: Vero-E6, HeLa e HEK-293.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As folhas foram coletadas de exemplares de *M. urundeuva* de um ano de idade, cultivadas no Núcleo de Pesquisas em Agricultura Urbana (NEPAU), Departamento de Ciência Vegetal, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Brasil. A coleta foi realizada em às 12:30 pm, na seguinte localização geográfica: latitude de -3.7387807 e longitude de -38.5694616. O local de coleta estava a 28 m acima do nível do mar. O espécime do voucher (Nº 48904) foi depositado no Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia da UFC.

4.2 Obtenção do óleo essencial e dos demais extratos

Na extração do óleo essencial, as folhas de *M. urundeuva* foram hidrodestiladas num aparelho do tipo de Clevenger, adaptado por Goltilleb (GOTTLIEB e MAGALHÃES, 1960), conforme mostrado no esquema da Figura 2.

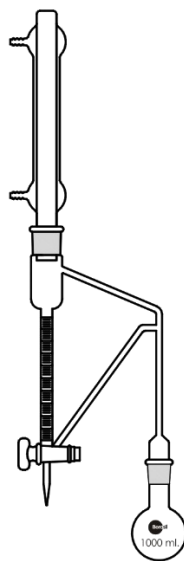


Figura 2. Esquema do hidrodestilador do tipo Clevenger. Fonte: acervo próprio.

Nesse processo, as folhas frescas foram colocadas em um balão de 5 L, onde foram adicionados 2 L de água destilada e o sistema foi mantido sob ebulição durante um período de 2h, tendo como produto um óleo de coloração amarelada. O referido óleo foi então seco sobre Na_2SO_4 , em seguida armazenado em frasco de vidro selado e preservado em refrigeração antes das análises. O rendimento dos óleos (0,02 %, m/m) foi calculado sobre o peso fresco dos materiais vegetais. Posteriormente, o extrato oleoso foi pesado em uma balança com escala de precisão, mostrando uma concentração de 900 mg/mL.

Os extratos (metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila) foram fornecidos pelo Instituto de Química da UFRN, cuja extração foi realizada sob a supervisão da Prof^a. Dra. Renata Mendonça Araújo, colaboradora do projeto. O extrato metanólico liofilizado, também conhecido como chá das folhas da aroeira, foi obtido a partir do decocto, produto resultante da extração do óleo essencial. A liofilização das amostras foi realizada em liofilizador (Freezone 4.5 Labconco), que operou em temperatura de -40°C , acoplado à bomba de vácuo com pressão de 0,024 mBar, durante 19 horas para permitir um total congelamento e secagem da amostra. Por fim, a massa do extrato obtida foi de 156 mg.

Para a obtenção dos extratos clorofórmico e acetato de etila da *M. urundeuva*, as folhas foram secas e moídas e posteriormente submetidas à extração exaustiva com clorofórmio (CHCl_3) e acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) à temperatura ambiente. Cada solução resultante foi filtrada e o solvente destilado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, para obtenção dos respectivos extratos: 30 mg do clorofórmico e 242 mg do acetato de etila.

O rendimento foi calculado por meio da razão entre a massa (g) de cada extrato obtido e a massa (g) do material vegetal seco, multiplicado por 100, ou seja, massa/massa (%) (RODRIGUES et al., 2011). Para os extratos metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila, a partir de uma massa de 1000 g (1 Kg) de material vegetal seco, tal rendimento foi de, respectivamente: 0,0156 %; 0,0030 % e 0,0242 %.

4.3 Caracterização química do óleo essencial

Logo após sua obtenção e antes de ser fornecido para o presente trabalho, o óleo essencial foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de ^1H e ^{13}C , e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS), e quantificado por cromatografia gasosa usando o detector de ionização de chamas (CG-DIC). As RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidas em espectrômetros de Bruker, Avance DRX-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C), os deslocamentos químicos de prótons foram referenciados para o CHCl_3 não deuterado residual ($\delta_{\text{H}} 7,27$), enquanto o pico central do CDCl_3 deuterado ($\delta_{\text{C}} 77.23$) como referência para os espectros de C-13.

A cromatografia GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010-Plus) foi realizada coluna capilar de sílica infundida RTX-5 (30 mx 0,25 mm i.d., 0,25 μm de espessura de película), injeções em modo *splitless* com temperatura de injeção de 220°C. A coluna foi programada de 60 a 240°C a 3°C/min e mantida isotérmica por 7 min. Utilizou-se hélio como transportador de gás para GC-MS a um caudal de 1,0 mL/min. A temperatura de interface de GC-MS foi 240°C e os espectros de massa foram registrados de 30-450 m/z , um intervalo de varredura de 0,5 s, com tensão de ionização de impacto de elétrons de 70 eV. Os componentes individuais foram identificados pela comparação do espectro de massa adquirido com dados de referência utilizando a biblioteca Wiley L-Built e comparando os seus índices de retenção com uma base de dados comercialmente disponível (NIST 2.0), bem como pelo seu índice de retenção de Kovat (RI) experimental calculado a partir de uma série de *n*-alcanos C9-C24.

A análise química dos constituintes dos extratos metanólico liofilizado, clorofórmico e acetato de etila ainda não foi realizada similarmente ao óleo.

4.4 Microrganismos

Para a avaliação antimicrobiana do material vegetal (óleo e extratos), foram utilizadas quatro cepas bacterianas padronizadas pela *American Type Culture*

Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), além de uma cepa obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz, RJ, *Salmonella Enteritidis* (INCQS 500258).

Antes da realização dos ensaios antimicrobianos, as bactérias foram repicadas em caldo BHI, a partir do estoque mantido a -20°C, e posteriormente acondicionadas em refrigerador a 8°C. A ativação das cepas foi realizada através de semeio por esgotamento em agar BHI, 24 horas antes da execução dos ensaios, visando a fase logarítmica de crescimento. As placas semeadas foram em seguida incubadas a 37°C/24h. A partir das culturas, as colônias isoladas foram transferidas para solução salina estéril a 0,9%, ajustando os inóculos para a concentração de 0,5 da escala de Mc Farland (10^8 UFC/mL).

4.5 Teste da atividade antibacteriana *in vitro*

A atividade antibacteriana foi avaliada de forma quantitativa por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2016), realizada em microplaca de 96 poços de fundo plano. Como controle positivo (CP) foi utilizado gentamicina e, como controle negativo (CN), solução aquosa de Tween 80 a 5%.

O teste foi realizado em triplicata, através de diluição seriada, partindo da metade da concentração máxima das amostras até a décima sexta diluição, para o óleo essencial de *M. urundeuva*, e até a oitava diluição, para os três extratos (metanólico, clorofórmico e acetato de etila) da referida planta.

Foram testadas as seguintes concentrações para o óleo essencial: 450; 225; 112; 56; 28; 14; 7; 3,5; 1,76; 0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05, 0,02 e 0,01 mg/mL (Figura 3); para o extrato metanólico: 78; 39; 19,5; 9,75; 4,88; 2,44; 1,22 e 0,61 mg/mL; para o extrato clorofórmico: 15; 7,5; 3,75; 1,88; 0,94; 0,47; 0,23 e 0,11 mg/mL; e para o extrato acetato de etila: 121; 60,5; 30,25; 15,12; 7,56; 3,78; 1,89 e 0,94 mg/mL (Figura 4). O CP também foi realizado em diluições seriadas com gentamicina,

partindo da concentração de 0,032 mg/mL ou 32 µg/mL, seguindo até a concentração de 0,25 µg/mL (ARAÚJO, 2013).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	450	450	450	1,76	1,76	1,76	CC	CC	CC	32	32	32
B	225	225	225	0,88	0,88	0,88	CC	CC	CC	16	16	16
C	112	112	112	0,44	0,44	0,44	CC	CC	CC	8	8	8
D	56	56	56	0,22	0,22	0,22	CC	CC	CC	4	4	4
E	28	28	28	0,11	0,11	0,11	CN	CN	CN	2	2	2
F	14	14	14	0,05	0,05	0,05	CN	CN	CN	1	1	1
G	7	7	7	0,02	0,02	0,02	CN	CN	CN	0,5	0,5	0,5
H	3,5	3,5	3,5	0,01	0,01	0,01	CN	CN	CN	0,25	0,25	0,25

|-----OE-----|
|-----CP-----|

CN: controle negativo
 CP: controle positivo
 CC: controle crescimento
 OE: óleo essencial

Figura 3. Representação da distribuição das concentrações em mg/mL na diluição seriada para o óleo essencial de *M. urundeuva*, realizadas na microdiluição em caldo em placa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	78	78	78	15	15	15	121	121	121	32	32	CN
B	39	39	39	7,5	7,5	7,5	60,5	60,5	60,5	16	16	CN
C	19,5	19,5	19,5	3,75	3,75	3,75	30,25	30,25	30,25	8	8	CN
D	9,75	9,75	9,75	1,88	1,88	1,88	15,12	15,12	15,12	4	4	CN
E	4,88	4,88	4,88	0,94	0,94	0,94	7,56	7,56	7,56	2	2	CC
F	2,44	2,44	2,44	0,47	0,47	0,47	3,78	3,78	3,78	1	1	CC
G	1,22	1,22	1,22	0,23	0,23	0,23	1,89	1,89	1,89	0,5	0,5	CC
H	0,61	0,61	0,61	0,11	0,11	0,11	0,94	0,94	0,94	0,25	0,25	CC

|-----EM-----|
|-----EC-----|
|-----EAE-----|
|-----CP-----|

CN: controle negativo
 CP: controle positivo
 CC: controle crescimento
 EM: extrato metanólico
 EC: extrato clorofórmico
 EAE: extrato acetato de etila

Figura 4. Representação da distribuição das concentrações em mg/mL na diluição seriada para os extratos de *M. urundeuva*, realizadas na microdiluição em caldo em placa de 96 poços.

Por fim, foram adicionados, em todos os poços utilizados das microplacas específicas para cada microrganismo, 20 µL do inoculo padronizado para cada

bactéria. As microplacas foram incubadas a 37°C/24h, para posteriormente ser avaliada a CIM (Concentração Inibitória Mínima).

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para realizar a leitura da CIM utilizou-se como um revelador do crescimento bacteriano a solução de CTT (cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazolium) a 0,5%, considerando que trata-se de um composto solúvel, que confere mudança de coloração no meio que é inserido quando há metabolismo bacteriano ativo, no qual o tetrazólio é convertido em cristais vermelhos insolúveis, chamados compostos de formazam (Figura 5).

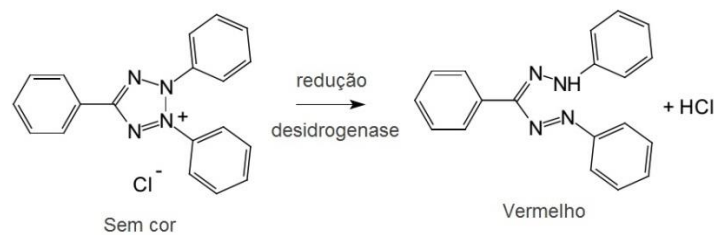


Figura 5. Reação de redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ao formazam (Adaptado de Opwis et al., 2012).

Caso não haja atividade metabólica bacteriana o meio não adquire cor vermelha e permanece com sua coloração original (GUNZ, 1949).

Após a incubação a 37°C/24h, foram aplicados 20 µL da solução de CTT em cada poço utilizado das microplacas e as mesmas foram incubadas a 37°C. Após 2h as microplacas foram analisadas a fim de determinar as CIMs, que foram definidas como as menores concentrações das amostras vegetais, que visualmente inibiram completamente o crescimento bacteriano (SMÂNIA-JR et al., 2007).

4.7 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para avaliar a ação bactericida do óleo essencial e dos extratos, especificamente para cada microrganismo teste, foram selecionados da microdiluição em caldo (microplacas) poços que abrangeram as regiões teste e controle (CN, CP e CC). Da região teste foram escolhidos os poços correspondentes às CIMs, às concentrações acima das CIMs e da concentração abaixo de cada CIM. Foram priorizados, sempre que possível, os orifícios da coluna central de cada triplicata, uma vez que sofrem menor influência dos poços vizinhos de conteúdo com concentração distinta. Do conteúdo de cada poço selecionado foram transferidos 8 μL para placas de ágar BHI (Figura 6).

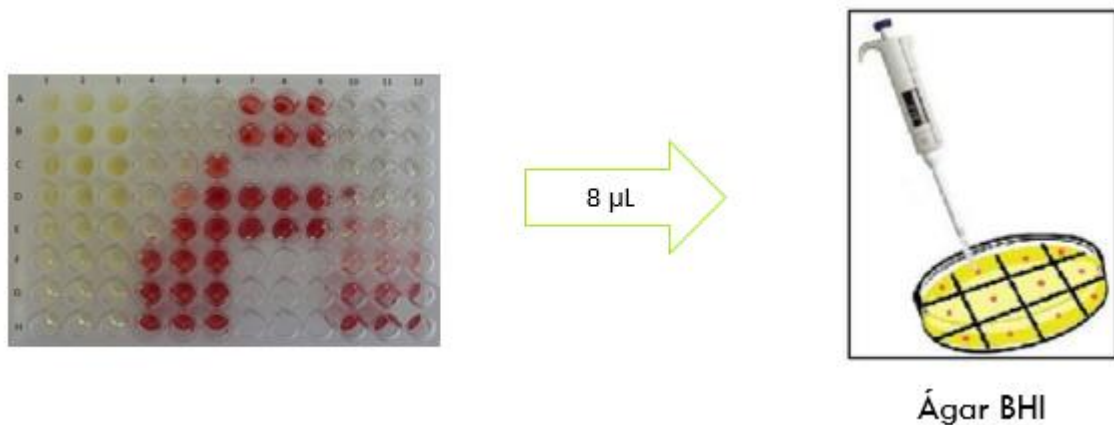


Figura 6. Esquema do sementeio do conteúdo dos poços selecionados da microplaca em ágar BHI. Fonte: acervo próprio.

Após o sementeio, as placas de BHI foram incubadas a 37°C/24h e posteriormente foi realizada a leitura das CBMs, para avaliar a possível ação bactericida dos produtos naturais testados. As CBMs foram definidas como as menores concentrações das amostras vegetais que foram capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano no meio BHI.

4.8 Ensaio de Citotoxicidade

O óleo essencial obtido das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, tendo mostrado atividade antibacteriana para todas as cepas testadas, foi avaliado quanto

à citotoxicidade frente às linhagens celulares Vero E6 (célula epitelial renal de *Cercopithecus aethiops*), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e HEK-293 (célula embrionária renal humana). Por outro lado, os três extratos ainda serão testados frente às células Vero, HeLa e HEK-293. Todas as linhagens celulares foram obtidas da Coleção de Culturas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em uma incubadora a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Através do ensaio colorimétrico baseado no sal de tretazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma - Aldrich, Alemanha), descrito por Mosmann (1983), com modificações, foi possível avaliar a viabilidade e a taxa de proliferação das linhagens celulares na presença das quatro amostras vegetais. O MTT é um sal de tetrazólio amarelado que pode ser reduzido pela succinato desidrogenase, nas mitocôndrias de células vivas, gerando cristais de formazam azulados insolúveis em água. A quantidade de cristais formados é proporcional ao número de células viáveis (CARMICHAEL et al., 1987).

Monocamadas de células foram dispostas em placas de 96 poços (5x10³ células/poço). Após 24h em condições de cultura, foi realizado o careciamento e, após mais 24h, as células foram tratadas com o óleo essencial de *M. urundeuva* nas concentrações de: 0,275; 0,55; 1,1; 2,2 e 4,4 mg/mL. Após o processo de tratamento (24h e 48h), houve a adição de 100 µL/poço do MTT (5 mg/mL) e incubação por 4h. Após isso, o meio foi removido e adicionado 100 µL de etanol/poço. As placas foram agitadas e a absorbância obtida em leitor de microplacas (Epoch - BioTek Instruments Inc, EUA) a 570 nm, com o uso do software Gen5 Data Analysis versão 2.0 (BioTek Instruments Inc, EUA). O controle de crescimento consistiu apenas no cultivo celular com meio de cultura.

Os ensaios foram avaliados em triplicata e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada como se segue:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \left(\frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs crescimento}} \right) \times 100$$

4.9 Análise estatística

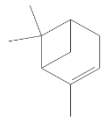
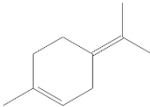
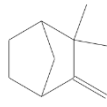
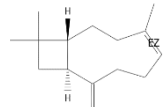
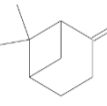
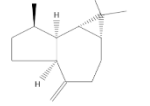
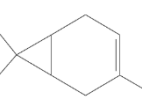
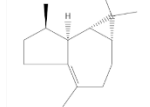
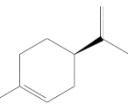
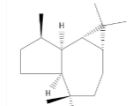
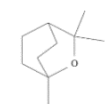
Para comparar as porcentagens de viabilidade celular, obtidas da fórmula acima, entre 24h e 48h das linhagens Vero-E6, HeLa e HEK-293, através da média e do desvio padrão, foi realizado o Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização química do óleo essencial

Os constituintes identificados por CG-MS foram mostrados na Tabela 1, e por espectro de NMR ^1H na Figura 7. Na caracterização química do óleo essencial (OE) das folhas de *M. urundeuva* foi detectada a presença de quatro principais marcadores químicos: α -pineno (87,85%), como constituinte majoritário, *trans*-cariofileno (1,57%), limoneno (1,49%) e β -pineno (1,42%). Os 95,9% de terpenos identificados contêm 0,43% de monoterpênos oxigenados, 92,09% de monoterpênos hidrocarbonados, 0,63% de sesquiterpenos oxigenados e 2,75% de sesquiterpenos hidrocarbonados.

Tabela 1. Componentes do óleo essencial identificados por CG-MS (quantificados por CG-FID).
^aValores são expressos em porcentagens; Estruturas obtidas do programa ChemSketch.

Componente	Ki	Estrutura	% ^a	Componente	Ki	Estrutura	% ^a
α -Pineno	939		87,85	Terpinoleno	1090		0,43
Canfeno	964		0,28	<i>trans</i> -Cariofileno	1421		1,57
β -Pineno	983		1,42	Aromadendreno	1437		0,57
Δ^3 -Careno	1016		0,22	Viridifloreno	1494		0,18
Limoneno	1020		1,49	Viridiflorol	1593		0,63
Eucaliptol	1022		0,43				

Ki, Índice de retenção de Kovats;

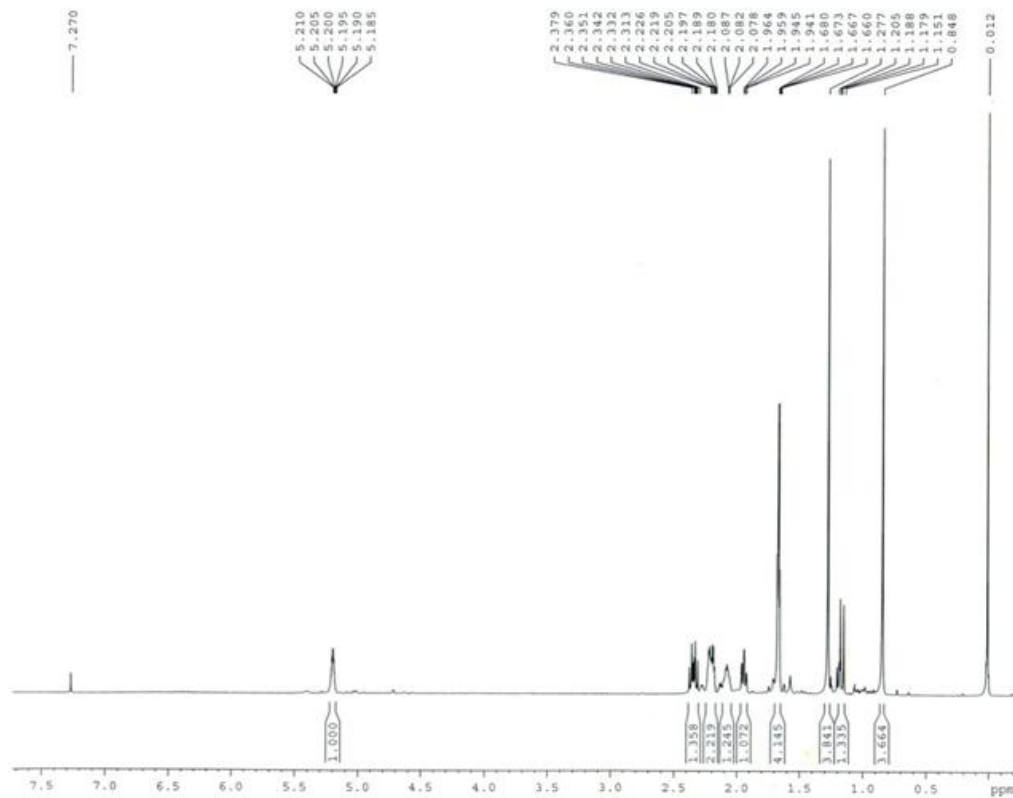


Figura 7. Espectro do óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva* obtido por NMR ^1H . ppm: partes por milhão. Fonte: acervo próprio.

5.2 Determinação das CIMs e das CBMs

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial e dos extratos obtidos das folhas da *Myracrodruon urundeuva* frente às cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis* foram definidas como as menores concentrações que apresentaram inibição bacteriana nas três colunas da triplicata em ordem decrescente, não sendo observada visualmente a atividade do CTT. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada como a menor concentração de cada amostra vegetal que promoveu inibição total do crescimento bacteriano no semeio em ágar BHI. Os resultados das CIMs e CBMs foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), do controle positivo (gentamicina) e das amostras obtidas da *Myracrodruon urundeuva*: óleo essencial (OE), extrato metanólico (EM), extrato clorofórmico (EC) e extrato acetato de etila (EAE).

Bactérias	Concentrações (mg/mL)									
	OE		EM		EC		EAE		Gentamicina	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Sa	0,22	0,22	9,75	78,0	15,0	> 15,0	7,56	>121,0	0,004	0,004
Se	0,11	0,22	9,75	9,75	15,0	> 15,0	1,89	>121,0	0,004	0,004
Ec	0,88	1,75	>78,0	-	15,0	> 15,0	30,25	>121,0	0,004	0,004
Pa	7,0	7,0	>78,0	-	15,0	> 15,0	30,25	>121,0	0,004	0,004
SEnt	0,44	0,44	>78,0	-	15,0	> 15,0	15,12	>121,0	0,004	0,004

Sa= *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); Se= *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) Ec= *Escherichia coli* (ATCC 25923); Pa= *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); SEnt= *Salmonella* Enteritidis (INCQS 500258) - = não foi realizado

Os controles validaram eficientemente os ensaios. O CP não apresentou crescimento bacteriano nas maiores concentrações, comprovando a eficácia da gentamicina como controle positivo no teste, uma vez que a ação do antibiótico sobre as bactérias ocorreu até a concentração de 0,004 mg/mL (4 µg/mL) para todas as cepas testadas, com equivalência entre os valores de CIMs e CBMs. Tanto para o CN quanto para o CC, ocorreu crescimento bacteriano em todos os ensaios, comprovando, respectivamente, a não inibição bacteriana do Tween 80, como controle negativo, e a viabilidade das cepas usadas no controle de crescimento, demonstrando que o efeito antibacteriano decorreu apenas dos constituintes do óleo essencial e dos extratos, obtidos da *M. urundeuva*.

5.3 Avaliação *in vitro* da Citotoxicidade do OE de *M. urundeuva*

No ensaio de viabilidade de celular, para a linhagem Vero E6, foi demonstrado que na primeira leitura, após 24h de exposição, observou-se atividade

tóxica nas concentrações de 4,4 mg/mL, e 2,2 mg/mL do óleo, induzindo porcentagem de morte celular de 93,91% e 2,32%, respectivamente. Contudo, nas concentrações inferiores de 1,1 mg/mL, 0,55 mg/mL e 0,275 mg/mL o óleo não afetou a viabilidade dessas células (Figura 8).

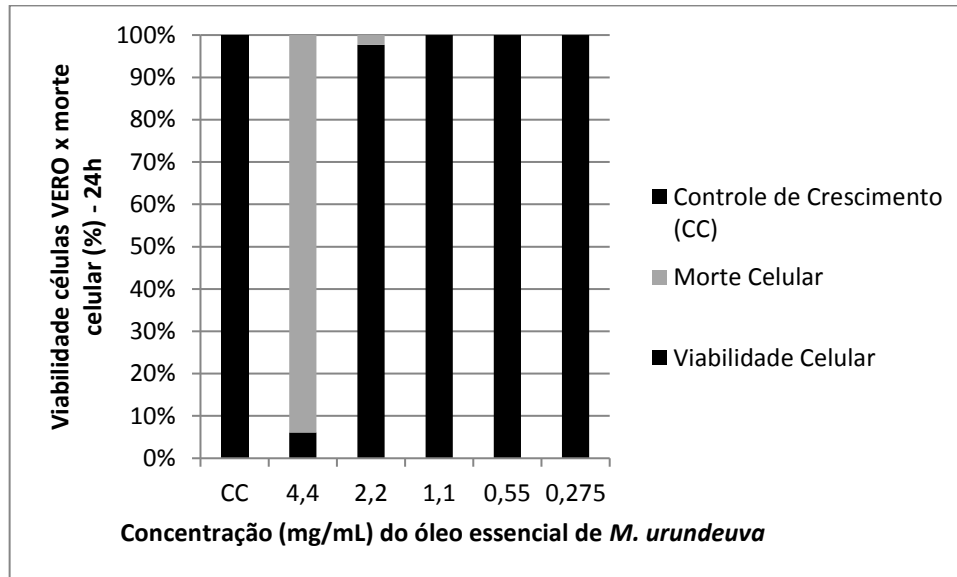


Figura 8. Percentual de viabilidade de células Vero E6 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 24h. Fonte: acervo próprio.

Na segunda leitura, após 48h de exposição, a toxicidade celular ocorreu apenas na maior concentração, 4,4 mg/mL, com morte celular de 94,26%. Para as demais concentrações 2,2 mg/mL, 1,1 mg/mL, 0,55 mg/mL e 0,275 mg/mL, a viabilidade da linhagem Vero E6 não foi afetada pelo óleo (Figura 9).

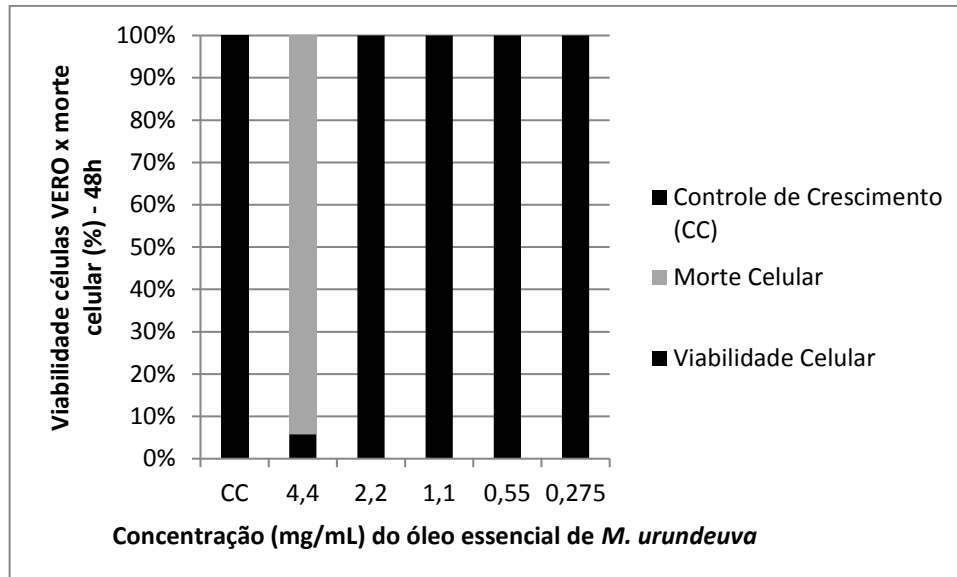


Figura 9. Percentual de viabilidade de células Vero E6 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 48h. Fonte: acervo próprio.

No entanto, estatisticamente, não houve diferença significativa entre os valores da viabilidade das células Vero E6 em 24h e 48h de exposição ao óleo essencial, uma vez que foi obtido um valor de $p=0,7972$ ($p>0,05$), indicando que o óleo inibe esta linhagem a 4,4 mg/mL. Os resultados da média e desvio padrão da análise estatística são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Viabilidade (%) das células VERO tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva*. Média e desvio padrão obtidos do Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

		Concentrações (mg/mL)- óleo essencial de <i>M. urundeuva</i>						
		4,4	2,2	1,1	0,55	0,275	Média	Desvio padrão
Viabilidade (%) das células Vero	Após 24h	6,09	97,68	100	100	100	80,75	41,75
	Após 48h	5,74	100	100	100	100	81,14	42,15

Para a linhagem HeLa, no período de 24 horas, pode-se observar que as maiores concentrações do óleo de *M. urundeuva* tiveram maior efeito inibitório na proliferação destas células tumorais. Nestas, o óleo apresentou inibições desde 11% a 21% entre as doses de 1,1 mg/mL a 4,4 mg/mL (Figura 10).

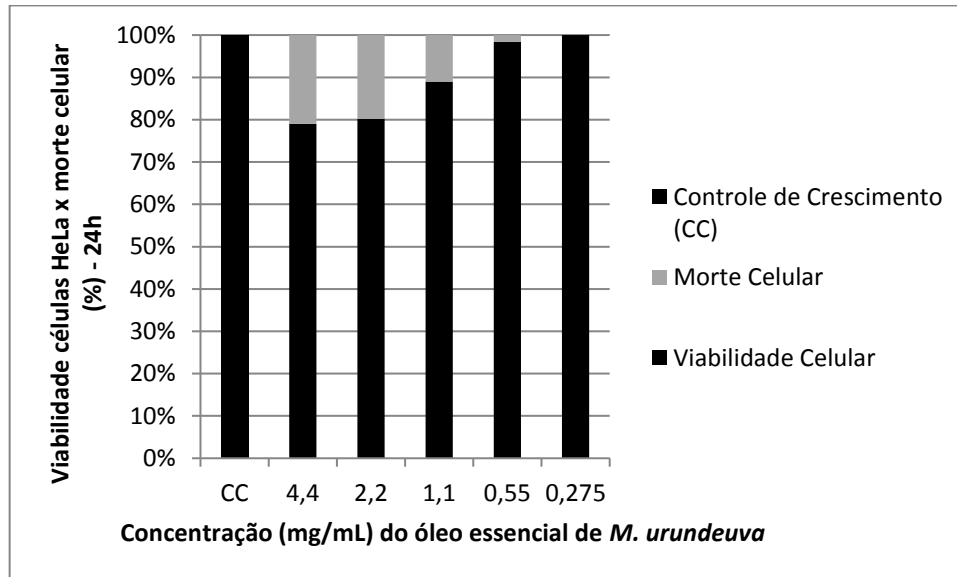


Figura 10. Percentual de viabilidade de células HeLa tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 24h. Fonte: acervo próprio.

Decorrido o tempo de 48 horas, as concentrações de 2,2 mg/mL e 4,4 mg/mL apresentaram maior inibição da proliferação, sendo de 32,4% e 44,3%, respectivamente. Isso sugere que, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de viabilidade observados nos tempos de 24h e 48h de exposição ($p=0,8085$; $p>0,05$), o óleo desempenha uma discreta ação antitumoral frente à HeLa observada em 24h, que é intensificada ao longo do tempo de exposição, conforme mostra na leitura de 48h, cuja leve diminuição da viabilidade celular para todas as concentrações (Figura 11).

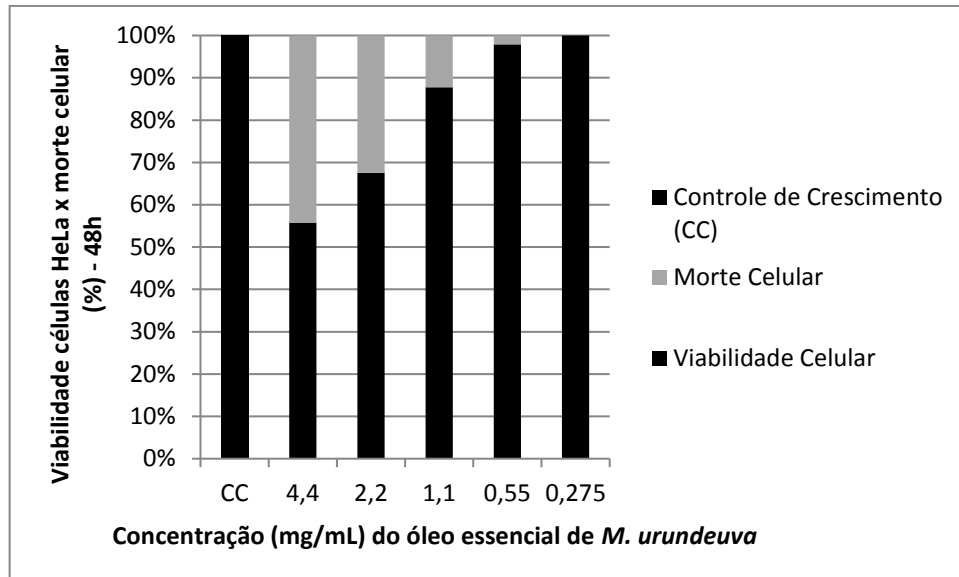


Figura 11. Percentual de viabilidade de células HeLa tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 48h. Fonte: acervo próprio.

A análise estatística, através da média e desvio padrão obtidos das porcentagens de viabilidade celular para a linhagem HeLa, em 24h e 48h, são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Viabilidade (%) das células HeLa tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva*. Média e desvio padrão obtidos do Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

		Concentrações (mg/mL)- óleo essencial de <i>M. urundeuva</i>						
		4,4	2,2	1,1	0,55	0,275	Média	Desvio padrão
Viabilidade (%) das células HeLa	Após 24h	79,0	80,2	89,0	98,4	100	89,32	9,82
	Após 48h	55,7	67,6	87,8	97,9	100	81,8	19,42

Frente à linhagem de células não-tumorais HEK-293, observou-se que o óleo não exerceu efeito tóxico sobre as mesmas. No período de 24h, ocorreu proliferação celular próximo ou igual ao controle de células não tratadas (Figura 12).

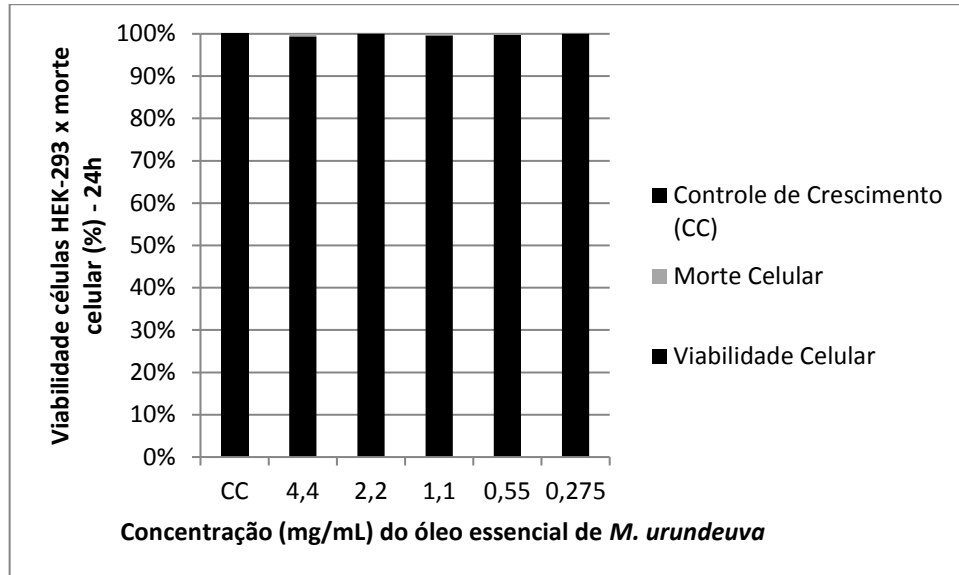


Figura 12. Percentual de viabilidade de células HEK-293 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 24h. Fonte: acervo próprio.

No tempo de 48 horas também observamos o mesmo fenômeno ocorrido com as células na primeira leitura. (Figura 13).

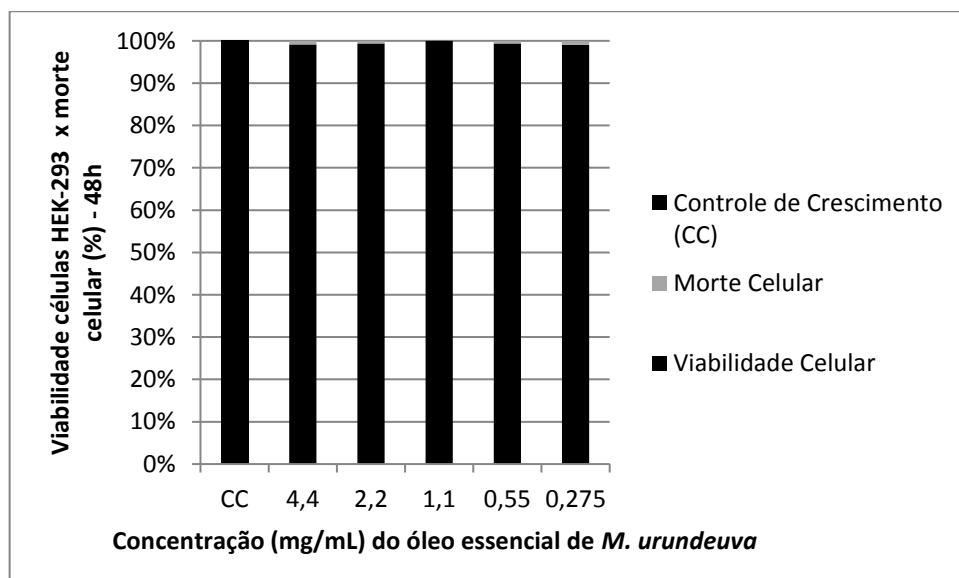


Figura 13. Percentual de viabilidade de células HEK-293 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. urundeuva* após 48h. Fonte: acervo próprio.

A análise estatística mostrou que, para a linhagem HEK-293, não ocorreu diferença entre os dados de porcentagem de viabilidade celular em 24h e 48h, sendo estes estatisticamente iguais, uma vez que o p valor obtido do teste de Wilcoxon foi de $p=1$ ($p>0,05$). Os valores de média e desvio padrão obtidos das porcentagens de viabilidade celular em 24h e 48h, são mostrados na Tabela 5.

Table 5. Viabilidade (%) das células HEK-293 tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva*. Média e desvio padrão obtidos do Teste de Wilcoxon (R-3.1.1 Software).

		Concentrações (mg/mL)- óleo essencial de <i>M. urundeuva</i>						
		4,4	2,2	1,1	0,55	0,275	Média	Desvio padrão
Viabilidade (%) das células HEK	Após 24h	99,4	100	99,6	99,8	100	99,76	0,26
	Após 48h	98,2	99,4	100	99,4	99,1	99,42	0,69

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, o óleo essencial das folhas de *M. urundeuva* apresentou atividade antibacteriana frente a todas as cepas testadas. Tal atividade provavelmente tenha sido exercida pelos terpenóides, uma vez que neste estudo notoriamente foram os componentes de maior proporção caracterizados quimicamente por GC-MS, onde o constituinte majoritário foi o α -pineno (87,85%). Tal hipótese procede porque de acordo com o estudo desenvolvido por Ipek et al (2005), análises cromatográficas mostraram que o potencial biológico dos óleos essenciais não é ocasionado pelo conjunto de moléculas presentes na sua composição, mas pelos terpenos, que geralmente estão presentes em altas concentrações. Na mesma linha de investigação, outros trabalhos realizados entre 2004 e 2013 atribuem a atividade antimicrobiana a estes metabólitos secundários, também mostrando serem os constituintes abundantes na composição dos óleos essenciais (SARTORATTO et al., 2004; SI et al., 2006; REICHLING et al., 2009; UPADHYAY, DWIVEDI e AHMAD, 2010; LANG e BUCHBAUER, 2012; SOUSA et al., 2012; XIONG et al., 2013).

No entanto, há especulações se o α -pineno, uma vez sendo o constituinte principal, é de fato o responsável pela ação bactericida do óleo aqui testado ou se dentre os demais terpenos elucidados na sua composição exista algum que promova ou potencialize tal ação, mesmo em concentrações mais reduzidas. Embora alguns trabalhos, cujos óleos essenciais apresentam o α -pineno como constituinte de maior proporção, tenham mostrado atividade antimicrobiana eficaz, inclusive contra algumas das bactérias aqui mencionadas, como *S. aureus*, *S. epidermidis* (SALEHI, SONBOLI e MOHAMMADI, 2006), *E. coli* e *P. aeruginosa* (JIANG et al., 2011), deve-se considerar a variação nas porcentagens de terpenos em relação às aqui descritas, conforme mostram outros trabalhos, na caracterização química de óleos essenciais das folhas da *M. urundeuva*, (MONTANARI et al., 2012; COSTA et al., 2014).

Além disso, é importante considerar que as diferenças na composição química dos óleos extraídos de plantas da mesma espécie decorrem de fatores

como variação geográfica, clima, solo, forma de plantio, adubos utilizados, época da coleta, bem como o processamento pós-coleta e a técnica de extração empregada (APEL, SOBRAL e HENRIQUES, 2006; POTZERNHEIM, BIZZO e VIEIRA, 2006; ASEKUN, GRIERSON e AFOLAYAN, 2007; SEFIDKON et al., 2007), visto que os metabólitos secundários resultam da interação química entre a planta e o ambiente (Figura 14). Portanto, uma vez que é difícil atribuir o efeito antimicrobiano para um princípio ativo isolado, estima-se que a atividade antibacteriana do óleo essencial de *M. urundeuva* seja conferida provavelmente pelos terpenos de um modo geral, uma vez que estes são abundantes na sua composição.

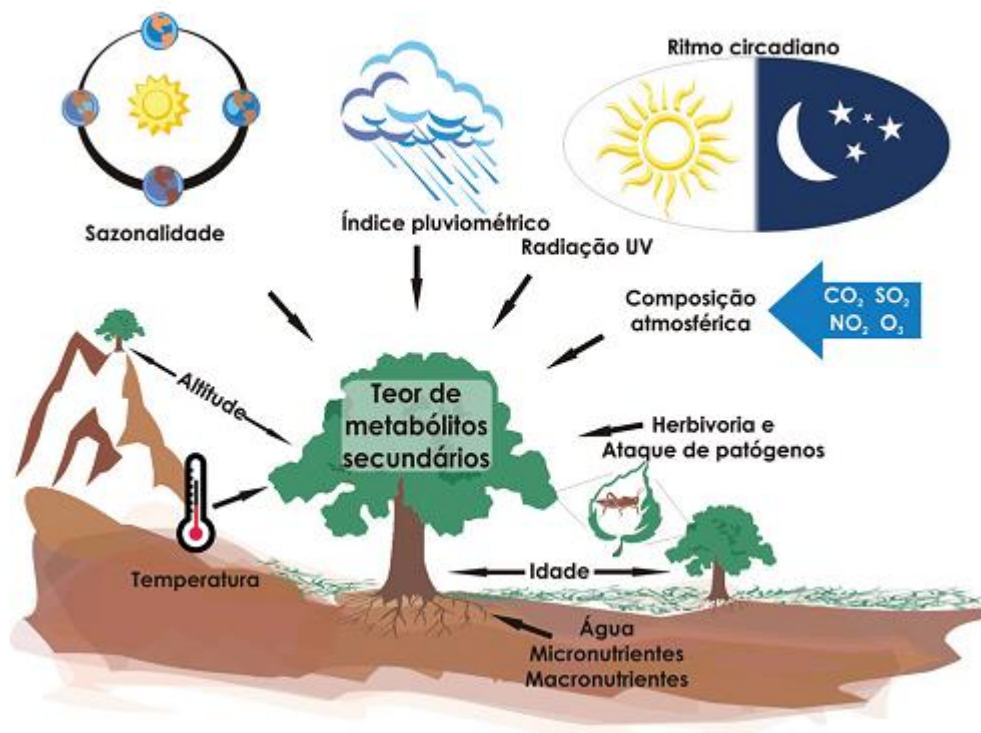


Figura 14. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (Fonte: Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Com a finalidade de comparar o óleo essencial e os extratos, quanto aos resultados encontrados no presente trabalho, o óleo de *M. urundeuva* desenvolveu uma ação antibacteriana mais acentuada, uma vez que para todas as cepas os valores de CIM do óleo foram inferiores aos apresentados pelos extratos. Além

disso, o óleo essencial demonstrou uma ação bactericida frente às cinco cepas, ao contrário dos extratos, que em sua maioria foram bacteriostáticos, sendo apenas o extrato metanólico bactericida para *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Uma possível explicação para essas diferenças observadas na sensibilidade dos patógenos entre o óleo essencial e os extratos pode ser tanto devido ao caráter hidrofóbico das moléculas presentes na estrutura da parede das bactérias, quanto pelo fato dos terpenos serem os principais responsáveis pela ação bactericida resultante do óleo. Segundo Bertini et al. (2005), os terpenoides, presentes nos óleos essenciais, possuem natureza lipídica, assim como os lipopolissacarídeos presentes na superfície desses patógenos. Estes, por sua vez repeliriam moléculas de natureza hidrofílica, como as que se encontram presentes de forma abundante nos extratos orgânicos, permitindo mais facilmente a passagem dos terpenoides, que por sua vez interfeririam mais facilmente no metabolismo desses microrganismos.

No estudo atual, os valores de CIM e CBM mostram uma atividade bactericida mais elevada contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) do que contra as Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis*). Tal fato provavelmente decorre da maior complexidade da parede celular dos Gram-negativos em relação aos Gram-positivos (VERMELHO, 2008), que interfere na ação direta dos constituintes do óleo no metabolismo dos patógenos. Entre as duas espécies Gram-positivas, o *S. epidermidis* (CIM = 0,11 mg/mL), apresentou-se mais sensível ao óleo do que o *S. aureus* (CIM = 0,22 mg/mL). Tal sensibilidade provavelmente está atribuída ao fato do *S. epidermidis* apresentar menor quantidade de fatores de virulência que o *S. aureus*, o que pode ter influenciado na resposta da bactéria às amostras testadas (EIFF, PETERS e HEILMANN, 2002). Além disso, o *S. epidermidis* mostrou-se, dentre as cinco cepas aqui testadas, como a mais sensível ao óleo de *M. urundeuva*.

Para as espécies bacterianas Gram-negativas, o óleo exerceu inibição mais acentuada para *S. Enteritidis* (CIM = 0,44 mg/mL) e *E. coli* (CIM = 0,88 mg/mL) do que para *P. aeruginosa* (CIM = 7,0 mg/mL). Esta última por sua vez, dentre as cinco cepas citadas, foi a menos sensível ao OE aqui testado. Acredita-se que tal resultado seja devido à presença do envoltório extracelular composto por alginato

que dificulta a ação direta dos componentes aromáticos óleo sobre a célula bacteriana (CHIANG e BURROWS, 2003; AZIMI et al., 2016).

A literatura relata trabalhos que comprovam a eficácia de óleos essenciais obtidos de outros vegetais que similarmente ou de forma superior à *M. urundeuva* apresentam atividade antibacteriana frente às cepas aqui testadas, cujos valores de CIMs foram: *Cymbopogon citratus*, com CIMs de 0,08 mg/mL para *S. aureus*, 0,63 mg/mL para *E. coli* e 1,25 mg/mL para *P. aeruginosa* (SANTOS et al., 2009); *Cinnamomum zeylanicum*, que mostrou 0,28 mg/mL para *P. aeruginosa* e 0,14 mg/mL para *Salmonella* spp. (UNLU et al., 2010); *Ceratonia siliqua* (HSOUNA et al., 2011) e *Acanthopanax leucorrhizus* (HU, ZHENG e HU, 2012) que frente à *P. aeruginosa* apresentaram respectivamente 2,5 mg/mL e 6,25 mg/mL; *Rosmarinus officinalis*, que mostrou CIMs 0,03 mg/ml para *S. aureus* e *S. epidermidis* e 0,06 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa* (WANG et al., 2012); *Allium cepa*, com 0,18 mg/mL para *S. aureus* e 0,27 mg/mL para *E.coli* (YE, DAI e HU, 2013); *Pimpinella anisum*, 0,003 mg/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e 0,002 mg/mL para *E. coli* e *Salmonella* spp. (ABDEL-REHEEM e ORABY, 2015); *Origanum majorana*, que para *S. aureus* a CIM foi de 0,19 mg/mL, para a *E. coli* 0,78 mg/mL e para a *P. aeruginosa* 3,12 mg/mL (HAJLAOUI et al., 2016).

Por outro lado, dentre as plantas distintas da *M. urundeuva*, apresentadas na literatura, os óleos essenciais extraídos de algumas destas não foram capazes de inibir as bactérias aqui descritas, enquanto outras promoveram inibições bacterianas mais fracas, com valores de CIMs maiores em relação às aqui apresentadas para a *M. urundeuva*. Nestes trabalhos os vegetais e seus valores de CIMs foram: *Dictamnus dasycarpus*, 3,13 mg/mL para *S. aureus*, 6,25 mg/mL para *E. coli* e 25 mg/mL para *P. aeruginosa* (LEI et al., 2008); *Ocimum basilicum*, 40 mg/mL para *S. Enteritidis* (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2010); *Lycopus lucidus*, 6,25 mg/mL para *S. aureus* e 25 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa* (YU et al., 2011); *Thymus broussonetii*, 0,9 mg/mL para *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp., e *Thymus satureioides*, 1,78 mg/mL para as mesmas 3 cepas (BOUZIDI et al., 2013); *Artemisia indica*, 15 mg/mL para *S. aureus*, 64 mg/mL para *S. epidermidis* e 32 mg/mL para *P. aeruginosa* (RASHID et al., 2013); *Cajanus cajan*, 34 mg/mL para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (QI et al., 2014); *Nepeta ucrainica*,

14 mg/mL para *S. aureus* e 150 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa* (SHAKERI et al., 2014); *Anethum graveolens*, 20 mg/mL para *S. aureus*, 5 mg/mL para *E. coli* e 40 mg/mL para *P. aeruginosa* (KAZEMI, 2015); *Satureja intermedia*, que mostrou CIM de 7,7 mg/mL frente *S. aureus* (SHARIFI-RAD et al., 2015); *Erigeron floribundus*, 0,5 mg/mL para *S. aureus* e ausência de inibição para *E. coli* e *P. aeruginosa* (PETRELLI et al., 2016). Tais resultados, quando comparados com o obtido no presente trabalho, evidenciam o poder antibacteriano mais promissor do óleo essencial da *M. urundeuva*.

Quanto a compostos de natureza química distinta dos óleos essenciais, extraídos da *M. urundeuva*, estudos mostram que extratos orgânicos já foram testados contra algumas das bactérias aqui descritas, confirmando os resultados aqui encontrados na atividade antibacteriana da *M. urundeuva*. Dentre estas, *S. aureus*, cujas CIMs foram de 0,58mg/mL para um extrato de lectina (SÁ et al., 2009); 200 mg/mL para um extrato hidroalcoólico (PINHO et al., 2012); 120 mg/mL para um extrato butanólico (SILVA et al., 2013) e 3,12 mg/mL para um extrato cicloexano (JANDÚ et al., 2015).

Outra bactéria frente à qual extratos da *M. urundeuva* relatados na literatura apresentaram atividade, foi a *E. coli*, na qual o extrato de lectina mostrou CIM de 1,17 mg/mL (SÁ et al., 2009); enquanto que para um extrato hidroalcoólico esta se mostrou resistente (PINHO et al., 2012). Já frente à *P. aeruginosa* o trabalho de Sá et al. (2009) mostra que o extrato de lectina inibiu esta bactéria com CIM de 4,68 mg/mL.

Na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *M. urundeuva* testados no presente estudo, o extrato metanólico liofilizado, embora não tenha inibido as bactérias Gram-negativas, *E. coli*, *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa*, os quais mostraram-se resistentes, exerceu inibição nos Gram-positivos, *S. aureus* e *S. epidermidis*, ambos inibidos na mesma CIM (9,75 mg/mL). Este mesmo extrato também desenvolveu ação bactericida para ambos os cocos Gram-positivos, sendo que tal ação foi mais eficaz contra *S. epidermidis* (CBM=9,75 mg/mL) do que *S. aureus* (CBM=78,0 mg/mL), provavelmente porque, de acordo com a literatura, o *S. epidermidis* é mais sensível quando comparado ao *S. aureus*, uma vez que este

possui uma gama mais ampla de fatores de virulência (EIFF, PETERS e HEILMANN, 2002).

Da mesma forma, o extrato acetato de etila, mesmo sendo bacteriostático frente às cinco cepas, mostrou-se mais eficaz na inibição bacteriana dos dois Gram-positivos, na qual os valores de CIM apresentaram-se inferiores, comparados aos dos três Gram-negativos. Dentre estes, a inibição foi maior frente a *S. Enteritidis* (CIM=15,12 mg/mL), do que para *E. coli* e *P. aeruginosa*, ambas com CIM = 30,25 mg/mL, possivelmente pelos mesmo fatores implicados nos Gram-positivos, ou seja, *E. coli* e *P. aeruginosa* são mais resistentes comparadas a *S. Enteritidis*. Além disso, a camada de alginato contida no biofilme formado por *P. aeruginosa* provavelmente é o que dificulta a ação direta dos componentes antibacterianos do referido extrato na bactéria.

Comparando a resposta dos dois Gram-positivos frente ao extrato acetato de etila, o *S. epidermidis*, mostrou-se ser mais sensível a tal extrato (CIM=1,89 mg/mL) do que o *S. aureus* (CIM=7,56 mg/mL), possivelmente pelos mesmos motivos discutidos anteriormente na atividade bactericida do extrato metanólico. Assim como já foi discutido para o óleo, a atividade antibacteriana dos extratos metanólico e acetato de etila é mais forte contra os Gram-positivos, provavelmente devido à menor complexidade da morfologia destes microrganismos comparados aos Gram-negativos. O extrato clorofórmico por sua vez, também bacteriostático, apresentou atividade antibacteriana com valores de CIM equivalentes, para todas as bactérias aqui testadas (CIM=15 mg/mL).

Comparando os extratos entre si a partir dos valores de CIM, o extrato clorofórmico foi o que desempenhou uma melhor inibição contra os Gram-negativos. Já para os Gram-positivos o EAE desenvolveu inibição do crescimento mais acentuada. Entretanto, apenas EM teve ação bactericida contra estes. É importante considerar que os três extratos, embora bacteriostáticos na maioria dos ensaios, apresentam atividade, demonstrando o efeito antibacteriano da *M. urundeuva*.

A atividade antibacteriana exercida por extratos orgânicos, obtidos de outros vegetais distintos da *M. urundeuva* frente às espécies bacterianas aqui usadas, é relatada na literatura. Carvalho et al. (2002) testou os extratos hidroalcoólicos de

Psidium guajava, cujos extratos das folhas e do caule mostraram CIMs de, respectivamente, 15 mg/mL e 16 mg/mL para *E. coli*, 17,3 mg/mL e 14,6 mg/mL para *Salmonella* spp., e 12,6 mg/mL e 14 mg/mL para *P. aeruginosa*. No estudo de Davet et al. (2009) o extrato etanólico de *Cereus jamacaru* inibiu *S. aureus* e *S. epidermidis* com CIM de 88,95 mg/mL, enquanto na inibição de *E. coli* e *P. aeruginosa* a CIM foi de 44,47 mg/mL. Manetti et al. (2010), testou um extrato metanólico das folhas de *Bromelia antiacantha*, cuja inibição bacteriana mostrou CIM de 2,5 mg/mL frente *S. aureus* e de 10 mg/mL frente *E. coli* e *P. aeruginosa*. Silva (2010) mostrou que o extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *Bixa orellana* apresentou CIM de 18,8 mg/mL frente a *S. aureus* e inibiu *P. aeruginosa* com CIM de 75,54 mg/mL. No estudo de Santana et al. (2013) foi verificado que a CIM do extrato etanólico de *Mikania glomerata* contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* correspondeu a 10 mg/mL. Nestes trabalhos a atividade antibacteriana frente a estas cepas é mais eficaz do que a desempenhada pelos extratos da *M. urundeuva* aqui descritos, por apresentarem valores de CIM menores, mostrando uma maior sensibilidade destes patógenos.

Outros estudos ressaltam o efeito antibacteriano promissor da *M. urundeuva*, uma vez que seus extratos apresentam, frente às mesmas bactérias que foram aqui testadas, atividades inferiores comparadas aos extratos obtidos do vegetal aqui descrito, seja por não terem exercido nenhuma atividade, seja por terem exibido valores de CIM maiores. Ayres et al. (2008) demonstram que *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* são resistentes ao extrato etanólicos das raízes de *Copernicia prunifera*. No trabalho de Santos et al. (2011), o extrato etanólicos do caule de *Maytenus rígida* apresentou CIM de 400 mg/mL frente a *S. aureus*, enquanto *E. coli*, *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* foram resistentes a tal extrato. Ramos et al. (2012), mostraram que *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram resistentes aos extratos hexânico e etanólico de *Zeyheria tuberculosa*. A resistência de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* é observada no trabalho de Costa et al (2013), que testou frente a estes extratos hidroalcoólicos de *Pseudobombax marginatum* e *Cnidocolus urens*.

Ainda no presente estudo é possível observar que os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos vegetais da *M. urundeuva* mostraram-se maiores, quando comparados com o controle positivo, a gentamicina. Entretanto, é

importante destacar que tais valores se apresentaram bastante inferiores em relação às concentrações iniciais testadas, evidenciando um eficaz efeito antibacteriano desse vegetal. Também deve-se considerar o fato das amostras testadas não se tratarem de compostos purificados como a gentamicina, o que, caso contrário, o efeito inibidor frente às referidas cepas poderia ser mais acentuado.

De acordo com um levantamento minucioso feito por Nascimento et al. (2007), às vezes torna-se difícil discutir acerca da ação antimicrobiana de produtos naturais devido a alguns fatores variáveis que podem influenciar na elucidação da ação antimicrobiana. A exemplo disso o meio de cultura, densidade do inóculo, e o solvente utilizado na preparação do material vegetal. Somado a isso, ressalta-se a sensibilidade diferenciada entre as linhagens microbianas frente a um mesmo produto vegetal, mesmo mantendo a mesma metodologia para a determinação da CIM (SILVA, 2009). Outro fator, considerado apenas em relação aos óleos essenciais, se refere à variação das suas características próprias, como a volatilidade, insolubilidade em água, complexidade química e a interação dos seus componentes com moléculas orgânicas presentes no meio de cultura (NASCIMENTO et al., 2007).

Em relação à citotoxicidade do óleo essencial de *M. urundeuva* em cultura de células, os resultados demonstram que, para a linhagem Vero E6 a citotoxicidade do óleo diminuiu com o aumento do tempo de exposição, ou seja, quanto maior o tempo de exposição dessas células frente ao óleo, menor a atividade citotóxica deste e maior a viabilidade celular. Para a linhagem HEK-293, a viabilidade celular se apresentou ainda superior em relação à linhagem Vero em ambas as leituras.

Tais resultados corroboram o óleo essencial não ser potencialmente citotóxico para células normais de humanos e mamíferos de um modo geral. Além disso, tais achados sugerem que os componentes do óleo podem ser uma alternativa segura para a cura das infecções por *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *S. Enteritidis*, uma vez que as concentrações que não apresentaram toxicidade celular para as duas linhagens citadas, 0,275 mg/mL, 0,55 mg/mL e 1,1 mg/mL, são próximas às CBMs observadas na ação bactericida frente a tais patógenos, que foram respectivamente 0,22 mg/mL, 0,22 mg/mL, 1,75 mg/mL e 0,44 mg/mL.

Entretanto, no tratamento de infecções cujo agente etiológico é a *P. aeruginosa*, existe a possibilidade do óleo essencial não ser uma boa alternativa terapêutica, uma vez que sua ação bactericida frente a este patógeno ocorre na concentração de 7,0 mg/mL, que é superior às concentrações que foram tóxicas para as células Vero (4,4 mg/mL e 2,2 mg/mL). Porém, nestas mesmas concentrações, as células HEK-293 apresentaram viabilidade máxima, semelhante ao controle, o que abre perspectivas do óleo de *M. urundeuva* não ser tóxico para o homem a 7,0 mg/mL. Neste caso se faz necessária a realização de ensaios posteriores com concentrações superiores à máxima testada (4,4 mg/mL) frente à linhagem HEK-293.

Para as células HeLa, o óleo de *M. urundeuva* apresentou citotoxicidade crescente ao longo do tempo de exposição (24h – 48h), nas concentrações 4,4 mg/mL e 2,2 mg/mL, que não foram tóxicas para a linhagem HEK-293, nem apresentaram toxicidade significativa para as células Vero. Esse fenômeno indica uma possível atividade antineoplásica do óleo, o que seria desejável, pois aplicando-se as concentrações citadas, este inibiria seletivamente a proliferação apenas de células neoplásicas.

Considerando esses achados, novos estudos são necessários, como a citotoxicidade de todas as amostras vegetais aqui descritas frente a células humanas normais originadas de outros tecidos, como os fibroblastos, e em outras células neoplásicas, além das que foram testadas neste trabalho, com a finalidade de melhor investigar a atividade antitumoral. Além disso, se faz necessário o isolamento de moléculas ativas, que possam ser empregadas em estudos moleculares visando determinar o provável mecanismo de ação, além de ensaios *in vivo* em modelos animais, visando comprovar a eficácia do óleo essencial e dos extratos da *M. urundeuva*, para que possam ser considerados farmacologicamente viáveis.

Dados acerca da toxicidade celular da *M. urundeuva* ainda estão escassos na literatura, principalmente no que diz respeito a óleos essenciais extraídos desta planta. Todavia, pesquisadores avaliaram a toxicidade de extratos obtidos da aroeira-do-sertão, nos quais apresentaram resultados animadores, conforme observado em dois estudos importantes. Carvalho et al. (2012) mostraram que o

extrato metanólico bruto obtido das folhas da *M. urundeuva* não possui atividade hemolítica. O trabalho de Ferreira et al. (2011), por sua vez, destaca o poder antiproliferativo do extrato metanólico obtido dessa mesma espécie vegetal, contra células cancerígenas das linhagens HL-60 (leucemia), SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (côlon) e MDA/MB-435 (melanoma), indicando o possível poder antitumoral da *M. urundeuva*, fortalecendo a hipótese aqui construída a partir dos resultados obtidos do comportamento da linhagem HeLa frente ao óleo dessa planta.

Finalmente, além do óleo essencial de *M. urundeuva* mostrar atividade antibacteriana mais significativa que os extratos, no ensaio de citotoxicidade o mesmo apresentou discreto poder antitumoral e toxicidade celular bastante reduzida frente a células normais. Um possível isolamento de compostos ativos do óleo e uma adequação na formulação de um produto farmacêutico podem reduzir ainda mais os níveis de toxicidade.

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho, o óleo essencial (OE), o extrato metanólico (EM), o extrato clorofórmico (EC) e o extrato acetato de etila (EAE), obtidos das folhas da *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), e aos Gram-negativos *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Enteritidis (INCQS 500258) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Embora os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos vegetais da *M. urundeuva* tenham se mostrado maiores, quando comparados com o controle positivo, apresentam-se baixas em relação às concentrações iniciais testadas, evidenciando um eficaz efeito antibacteriano desse vegetal. Também deve-se considerar o fato das amostras testadas não se tratarem de compostos purificados como a gentamicina, controle positivo, o que, caso contrário, o efeito inibidor frente às referidas cepas poderia ser mais acentuado. Quanto às amostras vegetais que apresentaram ação bactericida, a maioria das CBMs exibiram valores próximos às suas respectivas CIMs, ocorrendo equivalência entre estas em alguns casos, confirmando a eficaz atividade bactericida da *M. urundeuva*. Além disso, os resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* são satisfatórios, uma vez que o óleo não se mostrou tóxico para células humanas e desempenha um discreto efeito antitumoral, demonstrando o ser uma possível fonte na obtenção de futuros fitofármacos. Embora sejam necessários novos estudos *in vitro* de toxicidade em outras células humanas normais e ensaios *in vivo*, visando a comprovação da eficácia e segurança do seu uso pré-clínico, os resultados aqui obtidos para os produtos de *M. urundeuva* já são bastante promissores, não descartando a possibilidade destes serem viáveis no ponto de vista farmacológico. Nesse contexto, os produtos naturais surgem como caminho extremamente viável na descoberta de moléculas protótipos candidatas a novos fármacos, visando ampliar o arsenal terapêutico antimicrobiano já existente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-REHEEM, M.A.T.; ORABY, M.M. Anti-microbial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of *Pimpinella anisum* essential oil. **Annals of Agricultural Science**, 60: 335–340. 2015

ALBUQUERQUE, R.J.M.; RODRIGUES, L.V.; VIANA, G.S.B. Análise clínica e morfológica da conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 19(1): 43-68. 2004.

ALMEIDA, P.R.L. et al. Peritonite bacteriana espontânea: impacto das mudanças da microbiologia. **Arquivos de Gastroenterologia**, 44(1): 68-72. 2007.

ANDRADE, G.P.; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Revista de Saúde Pública**, 23(4): 277-284. 1989.

ANTONIO, G.D.; TESSER, C.D.; MORETTI-PIRES, R.O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, 48(3): 541-553. 2014.

ALVES, P.M. et al. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(2): 222-224. 2009.

ALVES, T.M.A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95(3): 367-373. 2000.

ANDRADE, M.A. **Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas**. Dissertação de Mestrado. Fiocruz. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, Brasil. 2008. 126p.

ANDREATTI FILHO, R.L. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, 116 (1): 190-194. 2009.

ANVISA. Resistência microbiana – Mecanismos e impacto clínico. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasil, 2016. <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo3.htm>acesso em 18 de novembro de 2016.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 402-407. 2006.

ARAÚJO, I.D.R. **Atividade antibacteriana de óleo essencial das folhas da *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) frente à *Escherichia coli* (ATCC 25922)**. Monografia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN: Natal. 2013. 58p.

ARCHER, G.L. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. **Principles and practice of infectious diseases**, 5: 2092-2100. 2000.

ASEKUN, O.T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis. **Food Chemistry**, 101: 995-998. 2007.

AYRES, M.C.C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(1): 90-97. 2008.

AZIMI, S. et al. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. **GMS Hygiene and Infection Control**, 11: 2196-5226. 2016.

BACK, A.; ISHIZUKA, M.M. Micoplasmose aviária. Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde animal. **Fundação Cargill**. p. 190-238. 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—A review. **Food Chemistry Toxicology**, 46: 446–475. 2008.

BERNARDI, A.C.A; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28(1): 57-66. 2007.

BERSOT, L.S. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, Santa Maria, **Anais...**Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 2006

BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**,17(314): 80-83. 2005.

BORGES, A.M. et al. La inserción de las plantas medicinales em la práctica de enfermería: um creciente desafio. **Revista eletrônica cuatrimestral de enfermería global**, 18. 2010.

BORSOI, A. et al. Behavior of Salmonella Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 266-273. 2011.

BOUZIDI, L.E. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. **Industrial Crops and Products**, 43: 450–456. 2013.

BRICEÑO, D.F. et al. Actualización de la resistencia a antimicrobianos de bacilos Gram negativos aislados en hospitales de nivel III de Colombia: años 2006, 2007 y 2008. Cali, Colombia. **Biomédica**, 30: 371-81. 2010.

BROSETA, A. et al. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, 24(1):31-35. 2006.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**, Geneva, 1998.

CARLINI, E.A. et al. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20(2): 140-146. 2010.

CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. **Cancer research**, 47: 936-942. 1987.

CARVALHO, A.A.T. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farm. Bonaerense**, 21(4): 255-258. 2002.

CARVALHO, J.S.; CARRANZA-TAMAYO, C.O.; ROMERO, G.A.S. Febre crônica associada a abscesso esplênico causado por *Staphylococcus epidermidis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(5): 588-590. 2007.

CARVALHO, M.S.; OLIVEIRA, D.A.; VALÉRIO, H.M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. **Revista de Biologia e Farmácia**, 8: 97-103. 2012.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 29: 23-32. 2007.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclasse of metalo-beta-lactamase, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 48(12): 4654-4661. 2004.

CASTILLA, K.S. **Detecção dos genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)**. Dissertação. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. Brasil. 2003. 78 p.

CAVALCANTI, S.M.M. et al. Estudo comparativo de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 9: 436-446. 2006.

CHIANG, P.; BURROWS L.L. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, 185: 2374-2378. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (M100-S26). 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement.

COELHO, W.S.; DINIZ, L.M.; FILHO, J.B.S. Botriomicose cutânea – Relato de caso. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 84(4): 396-399. 2009.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, 257: 1050-1055. 1992.

CORREIA, C. et al. Etiologia das infecções do trato urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. **Acta Médica Portuguesa**, 20: 543-549. 2007.

COSTA, E.M.M.B. et al. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Journal of Dental Science**, 28(4): 101-104. 2013.

COSTA, O.B. et al. Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. **International Journal of Forestry Research**, p 6. 2014.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33: 1-5. 2002.

CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, 52: 461-466. 1946.

CUNHA, M.L.R.S.; LOPES, C.A.M. Estudo da produção de β -lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 38(4): 281-290. 2002.

DAVET, A. et al. Atividade antibacteriana de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(2B): 561-564. 2009.

DUARTE, A.R.; CARELI, R.T.; SILVA, K.L. Microbiologia Básica para Ciências Agrárias/Eduardo Robson Duarte, Montes Claros: **Instituto de Ciências Agrárias da UFMG**, p31. 2011.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Universidade Estadual de Campinas- SP. **Multi Ciência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7. 2006.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, 21: 308–323. 2007.

EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infection Diseases**, 2: 677-685. 2002.

FARIA, S.M.; FARHAT, C.K. Meningites bacterianas - diagnóstico e conduta. **Jornal de Pediatria**, 75: 46-56. 1999.

FARRAR, H.C.; JAMES, L.P.; SCHULTZ, G.E. Antimicrobial therapy for infections of the central nervous system. **Seminars in Pediatrics Infectious Disease**, 4: 314-321. 1998.

FERNANDES, A.T. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. Rio de Janeiro: **Atheneu**, p. 355-378. 2001.

FERREIRA, A.M. et al. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em superfícies de uma Unidade de Terapia Intensiva. **Acta Paulista de Enfermagem** 24(4):453-458. 2011.

FERREIRA, I.B.P. **Estudo dos fatores de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolados de aspirado traqueal de pacientes em ventilação mecânica internados em UTI**. Monografia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil, Botucatu, São Paulo. 2013. 24 p.

FERREIRA, P.M. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 83: 1045-1058. 2011.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21: 99-105. 1998

FISCHER, A. et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Molecular Medicine**, 85: 461-469. 2007.

FOSTER, T.J.; HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiology**, (6): 484-488. 1998.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **American Journal of Medicine**, 113(Suppl 1A): 5S-13S. 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo, **Atheneu**, 4: 33-82. 1996.

FREITAS, A.L.P.; BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **Brasilian Journal Infection Disease**, 6(1): 1-7. 2002.

FURLAN, M.R. Cultivo de plantas medicinais. Cuiabá: **SEBRAE**. Coleção Agroindústria, 13. 1998. 137 p.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Edition. May, 2004.

GATTI, M.S.V. et al. Incidência de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), rotavírus e *Clostridium perfringens* de casos de diarreia em crianças, na região de Campinas, SP, Brasil. **Revista Institucional de Medicina Tropical**, 31(6): 392-398. 1989.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; OLIVEIRA, F.A. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* spp. Isolates from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brazil. **Journal of Food Protection**, 67: 1229-1233. 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30(2): 374-381. 2007.

GOETTSCHE, W. et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 46(2): 223-228. 2000.

GOLDRICK, B. First Reported Case of VRSA in the United States: An alarming development in microbial resistance. **American Journal of Nursing**, 102(11): 17. 2002.

GOLDSTEIN, J. et al. Effect of different media on determination of novobiocin resistance for differentiation of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, 18: 592-595. 1983.

GOLDSTEIN, C. et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 45: 723-726. 2001.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemist Analyst**, 49: 114. 1960.

GRANDE, N.S. et al. Avaliação do risco de contaminação por bactérias, no paciente submetido à broncoscopia, após o reprocessamento do broncoscópio. **Jornal de Pneumologia**, 28(5): 250-260. 2002.

GUNZ, F. W. Reduction of tetrazolium salts by some biological agents. **Nature**, 163, 98. 1949.

HAJLAOUI, H. et al. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. **Microbial Pathogenesis**, 95: 86-94. 2016.

HALEY, R.W. et al. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in United States hospitals. **Annals of Internal Medicine**, 97: 297-308. 1982.

HEILBERG, I.P, SCHOR, N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 49(1): 109-116. 2003.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, 20: 1083–1091. 1996.

HENDERSON, S.C.; BOUBOUS, D.I.; LEE, M.D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infection and Immunity**, 67(7): 3580-3586. 1999.

HICKMAN-BRENNER, F.W.; STUBBS, A.D.; FARMER, J.J. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, 29:2817-2823. 1991.

HÖRNER, R. et al. Perfil microbiológico das meningites em um hospital público universitário. **Revista Saúde (Santa Maria)**, 34(1-2): 22-26. 2008.

HSOUNA, A.B. et al. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, 148: 66–72. 2011.

HU, H.; ZHENG, X.; HU, H. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of the essential oil from the leaves of *Acanthopanax leucorrhizus* (Oliv.) Harms. **Environmental toxicology and pharmacology**, 34: 618–623. 2012.

HUGH, R.; LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, 66: 24-26. 1953.

IKEAGWU, I.J.; AMADI, E.S.; IROHA, I.R. Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* in abakaliki, Nigeria. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, 24(2): 231-235. 2008.

IPEK, E. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chemistry**, 93: 551-556. 2005.

IRINO, K. et al. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in S. Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, 38:193-196. 1996.

JACOBOWSKI, J.A.D.; BORELLA, R.; LAUTERT, L. Pacientes com insuficiência renal crônica: causas de saída do programa de diálise peritoneal. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, 26(3):381-91. 2005.

JANDÚ, J.J.B. et al. Antimicrobial activity and synergistic effects of an ethyl acetate fraction from methanol extract of *Myracrodruon urundeuva* bark. **Journal of Medicinal Plants Research**, 9: 641-646. 2015.

JANSEN, B. et al. Late onset endophthalmitis associated with intraocular lens: a case of molecularly proved *S. epidermidis* as etiology. **Brasilian Journal of Ophthalmology**, 75: 440-441. 1991.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, 32: 63-68. 2011.

JOHNSON, D.E. et al. Mouse models of short and long term foreign body in the urinary bladder: analogies to the bladder segment of urinary catheters. **Laboratory Animal Science**, 41(5): 451-455. 1991.

JÚNIOR, E.G.J. et al. Atividade Inibitória de Extratos do Cerrado Brasileiro sobre Microrganismos Anaeróbios e Associados a Infecções Nosocomiais. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 13: 43-52. 2009.

KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41: 2733-2737. 1997.

KARCHMER, A.W.; ARCHER, G.L.; DISMUKES, W.E. *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. **Annals of Internal Medicine**, 98: 447-455. 1988.

KASS, B. Traveller's diarrhoea. **Australian family physician**, 34: 243-247. 2005.

KAZEMI, M. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and

Carum copticum L. essential oils. **Journal of Herbal Medicine**, 5: 217–222. 2015.

KEMPFER, C.B. et al. Culturas de secreções da pele: estudo de prevalência e sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital universitário. **Revista Saúde (Santa Maria)**, 36 (1): 57-66. 2010.

KING, S.; METZGER, W.I. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: I. Hektoen enteric agar. **Applied Microbiology**, 16: 577-578. 1968.

KLEIN, G.; GOULART, L.S. Prevalência de *Staphylococcus aureus* multirresistentes em amostras biológicas do Laboratório Osvaldo Cruz, Uruguaiana-RS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 89(2): 121-124. 2008.

KONEMAN, Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido / Washington C. Winn Jr., et al. Revisão técnica Eiler Fritsch Toros; tradução Eiler Fritsch Toros [et al.]. – Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2008.

LACEY, R.W. Genetic basis, epidemiology and future significance of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. A review. **Journal of Clinical Pathology**, 26: 899-913. 1973.

LADHANI, S. et al. Development and evaluation of detection system for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, 39: 2050-2054. 2001.

LANDAU, W.; KAPLAN, R.L. Room temperature coagulase production by *Staphylococcus aureus* strains. **Clinical Microbiology Newsletter**, 2:10. 1980.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, 27:13–39. 2012.

LEAL, F.S.C.B. et al. Espondilodiscites sépticas: Diagnóstico e tratamento. **Arquivos em Neuropsiquiatria**, 61(3-B):829-835. 2003.

LEI, J. et al. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. **Food Chemistry**, 107: 1205–1209. 2008.

LEVY, S.B. The antibiotic paradox: how the miracle drugs are destroying the miracle. **Plenum Press**, 90. 1992.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2): 197-201. 2006.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 47: 247-250. 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: **Instituto Plantarum**. 2002.

LOUREIRO, M.M.; QUADRA, M.M.R.; ASENSI, M.D. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(3): 387-394. 2002.

LOWY, F.D. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, 339: 520-532. 1998.

MACFADDIN, J.F. Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins. **Baltimore**, USA, p 527. 1980.

MACIEL, M. C. G. et al. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 8: 57. 2008.

MACK, D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, 43: 113-125. 1999.

MANETTI, L.M. et al. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12(4): 406-413. 2010.

MEDEIROS, A.A. et al. Avaliação da proteção conferida por estirpes de *Lactobacillus* sp. a frangos de corte infectados por *Salmonella*. In: **Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas** –trabalhos concorrentes ao prêmio de pesquisa avícola José Maria Lamas da Silva, 1998, Campinas. Anais...Campinas: p.57. 1998.

MENEZES T. E. C. et al. Protective efficacy of *Psidiumcattleianum* and *Myracrodruonurundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, 48(3): 300-305. 2010.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, F.P.; Ito, K.. Compendium of the Microbiological Examinations of Foods. 4 ed., Washington, **Apha**, 35: 331-341. 2001.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(4): 316-320. 2005.

MIGLIATO, K. F. et al. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense**, 25(2): 310-314. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 14, de 31 de Março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Diário Oficial de Imprensa Nacional. Nº 63 – Dou de 05/04/10 – seção 1 - p. 85. Brasília – DF.

MONTANARI, R.M. et al. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induced Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, 17: 9728-9740. 2012.

MORAES, A.A.P.; SANTOS, R.L.D. Infecções em UTI geral de um hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 15(4): 135-141. 2003.

MOREIRA, B.M.; DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in staphylococci. **Pediatric Clinics of North America**, 42: 619-648. 1995.

MOREIRA, M.A.S. et al. Multidrug efflux system in *Escherichia coli* and Enterobacter cloacae obtained from wholesome broiler carcasses. **Brasilian Journal of Microbiology**, 40: 241-247. 2009.

MORETTI, E. et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 26:47–56. 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63. 1983.

MOSQUITO, et al. Mecanismos Moleculares de Resistência Antibiótica em *Escherichia coli* Associadas a Diarreia. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, 28(4): 648-56. 2011.

MOURA, M.R.S.A.L. et.al. Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 12(2): 173-182. 2012.

MULAZIMOGLU, L.; DRENNING, S.D.; YU, V. *In vitro* activities of two novel oxazolidinones (U100592 and U100766), a new fluoroquinolone (trovafloxacin), and dalfopristinquinupristin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 40: 2428-2430. 1996.

MULLIGAN, M.E. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. **American Journal of Medicine**, 94: 313-328. 1993.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(1):108-113. 2007.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, 11: 142-201. 1998.

NETTO, S.M. et al. Infecção de cateter vascular central em pacientes adultos de um centro de terapia intensiva. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, 30(3): 429-436. 2009.

NEVES, P.R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 47(4): 409-420. 2011.

NOGUEIRA, P.S.F. et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista Enfermagem UERJ**, 17(1): 96-101. 2009.

- NORDMANN, P. Mechanism of resistance to beta-lactam in *Pseudomonas aeruginosa*. **Ann França Anes Reanimat**, 22: 527-530. 2003.
- NOUGAYRÈDE, J.P.; FERNANDES, P.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell Microbiology**, 5: 359-372. 2003.
- NUNES, Y.R.F. et al. Aspectos ecológicos da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão - Anacardiaceae): Fenologia e germinação das sementes. **R. Árvore**, 32(2): 233-43. 2008.
- OKAMOTO, A.S. Transference *in vitro* of the resistance to the antimicrobials between *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella enteritidis* isolated from chickens. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária Zootecnia**, 63(5):1149-1153. 2011.
- OLIVEIRA, C.A.; ALBUQUERQUE, P.C.; ROCHA, M.L.C. Infecções hospitalares. Rio de Janeiro: **Atheneu**, p. 72-81. 1998.
- OLIVEIRA, L.C.B.S. et al. A Presença de Patógenos Respiratórios no Biofilme Bucal de Pacientes com Pneumonia Nosocomial. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 19(4): 428-433. 2007.
- OPLUSTIL, C.P. et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica, ed. **Sarvier**, São Paulo. 2000.
- OPWIS, K. et al. Semi-industrial production of methane from textile wastewaters. **Energy, Sustainability and Society**, 2: 1-6. 2012.
- ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, 38: 699–704. 1992.
- OSIRO, D. et al. Uso do *siarcs* na quantificação das dimensões de bactérias em imagens de microscopia de força atômica. **Embrapa**, 6: 12. 1998.
- PACKER, J.F.; LUZ, M.M.F. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(1): 102-107.2007.

PALMEIRA, J.D. et al. 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 42(1): 33-37.

PEDROLO, E. et al. Ensaio clínico controlado sobre o curativo de cateter venoso central. **Acta Paulista de Enfermagem**, 24(2): 278-83. 2011.

PEREIRA, R.S. et al. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**, 38(2): 1-3. 2004.

PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, 32(5): 477-483. 1998.

PETRELLI, R. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. **Molecules**, 18: 963–973. 2016.

PIER, G.B. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. **ASM News**, 64: 339-347. 1998.

PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, 42: 326-331. 2012.

PITT, T.L.; BARTH, A.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically importante Pseudomonads. **Principles and Parctice of Clinical Microbiology**, 1: 493-517. 1997.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L.L. Antigenic formulas off *Salmonella* servars. In: **National *Salmonella* Center by the who collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***. Institute Pasteur, Paris. 1997.

POTZERNHEIM, M.C.L.; BIZZO, H.L.; VIEIRA, R.F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de Piper coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 246-251. 2006.

QI, X.L. et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pea leaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and evaluation of its antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, 58: 322–328. 2014.

RABSCHA, W.; TSCHÄPEA, H.; BÄUMLERB, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, 3: 237-247. 2001.

RAMOS, R.S. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa*. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, 13(5): 1015-1024. 2012.

RANDRIANIRINA, F. et al. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59: 309–312. 2006.

RASHID, S. et al. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. **Food Chemistry**, 138: 693–700. 2013.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum*) Oil against *Salmonella* Enteritidis *in Vitro* and in Food. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 74: 1200–1204. 2010.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—An overview. **Forsch. Komplementmed**, 16: 79–90. 2009.

RODRIGUES, F.J.; BARROSO, A.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. **Revista portuguesa de saúde pública**, 29(2): 123-131. 2011.

RODRIGUES, L.V. 1999. **Análise morfológica e morfométrica da colite induzida por ácido acético, em ratos, e tratada com extratos vegetais (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.)**. Tese (Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 1999. 50 p.

RODRIGUES, T.S. et al. Métodos de secagem e rendimento de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13: 587-590. 2011.

ROSA, J.O. et al. Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(4): 398-403. 2009.

ROSSI, F. et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **New England Journal of Medicine**, 370(16):1524-1531. 2014.

RYBAK, M.J. et al. Comparative *in vitro* activities and post antibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperezolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 42: 721-724. 1998.

SÁ, M. C. A. et al. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against Gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 18(2/3): 62-66. 2011.

SÁ, R.A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science Technology**, 43: 85–95. 2009.

SABTCHEVA, S.; et al. High prevalence of the *aac(6)-Ib-cr* gene and dissemination among Enterobacteriaceae isolates by CTX-M-15 Plasmids in Bulgaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53(1): 335-336. 2009.

SALEHI, P; SONBOLI, A; MOHAMMADI, F. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Dicyclophora persica* Boiss. **Journal of Bioscience**, 61: 315-318. 2006.

SALVADORI, M.R, et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34: 230-235. 2003.

SANOCKA-MACIEJEWSKA, D.; CIUPINSKA, M.; KURPISZ, M. Bacterial infection and semen quality. **Journal of Reproductive Immunology**, 67: 51–56. 2005.

SANTANA, L.C.L.R. et al. Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmácia**, 94 (2): 120-129. 2013.

SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a University Hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 48(4): 185-188. 2006.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19: 436-441. 2009.

SANTOS, F.L.; SANTOS, B.I.A.M.L.; XAVIER, D.E. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 38(4): 291-296. 2002.

SANTOS, L.C. Antônio Moniz de Souza, o 'Homem da Natureza Brasileira': ciência e plantas medicinais no início do século XIX. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro**, 15(4): 1025-1038. 2008.

SANTOS, V.L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13(1): 68-72. 2011.

SARTORATTO, A. et al. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils From Aromatic Plants Used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35: 275-280. 2004.

SATO, A.F. et al. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 41 (6): 397-404. 2005.

SCALETSKY, I.C.A. et al. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of isolated from stools of children in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32: 313-319. 2001.

SCHAECHTER, M. et al. *Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas*, 3 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2002.

SCHMIDT, A.S. et al. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47: 735-743. 2001.

SEFIDKON, F. et al. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food Chemistry**, 100: 1054-1058. 2007.

SHAKERI, A. et al. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *Kopetdaghensis*. **Industrial Crops and Products**, 58: 315–321. 2014.

SHARIFI-RAD, J. et al. Composition, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Satureja intermedia* C.A. Mey Essential Oil. **International Journal of Molecular Science**, 16: 17812-17825. 2015.

SI, W. et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 100: 296–305. 2006.

SIERADZKI, K. et al. Heterogenously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, 37: 39-44. 1999.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, 59: 201-222. 1995.

SILBERT, S.; BARTH, A.L.; SADER, H. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian Cystic Fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(11): 3976-3981. 2001.

SILVA, C.M. et al. Crude extracts and semi-fractions from *Myracrodruon urundeuva* with antibacterial activity against American type culture collection (ATCC) strains of clinical relevance. **Journal of Medicinal Plants Research**, 7: 2407-2413. 2013.

SILVA, M.T.N. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 11(3): 257-262. 2009.

SILVA, A.C.R. et al. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, 17: 6305–6316. 2012.

SILVA, R.B. et al. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(2): 171-174. 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: **Ed. UFRGS/Ed. UFSC**, p.468-495. 2003.

SMÂNIA JR., A. et al. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38: 369-380. 2007.

SMITH, K.E. Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. **Pediatrics Infectious Disease Journal**. 2011.

SOARES, L.A.; NISHI, C.Y.M.; WAGNER, H.L. Isolamento das bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, 2(6): 84-92. 2006.

SOUSA, O.V. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. barks. **Molecules**, 17: 11056–11066. 2012.

SOUZA, R.B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, 31(2): 413-428. 2010.

SOUZA, V. et al. Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. **INCI**, 26(10): 513-517. 2001.

STEVENS, A. et al. A large outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 associated with eggs from overseas. **Epidemiology Infection**, 103: 425-33. 1989.

SU, Y.C. et al. Emergence of *Salmonella enteric* Serovar Potsdam as a Major Serovar in Waterfowl Hatcheries and chicken eggs. **Avian diseases**, 55(2): 217 - 222. 2011.

SYLVESTRE, M. et al. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. **Phytomedicine**, 12: 299–304. 2005.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, 103: 99–102. 2006.

TANNOCK, G.W. Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. London, **Chapman and Hall**. 1995.

TAVECHIO, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovares: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, 38(5): 315-322. 1996.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, 119: 3-10; 62-70. 2006.

THOMPSON, K.L.; APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broiler. **Poultry Science**, 85: 535-1540. 2006.

TIBA, M.R., YANO, T., LEITE, D.S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 50(5): 255-260. 2008.

TIZOTTI, M.K. et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Brasil. **Revista Saúde (Santa Maria)**, 36(1): 47-56. 2010.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLI, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto – Enfermagem**, 15(1): 115-121. 2006.

TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia, 5 ed. **Atheneu**, São Paulo. 2008

TU, K.K.; PALUTKE, W.A. Isolation and characterization of a catalase-negative strain of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 3: 77-78. 1976

UNLU, M. et al. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, 48: 3274–3280. 2010.

UPADHYAY, R.K.; DWIVEDI, P.; AHMAD, S. Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. **Asian Journal of Medicine Science**, 2: 152–158. 2010.

VEIGA JR., A.F.; PINTO, A.C. Plantas Mediciniais: cura segura? **Quimica Nova**, 28(3): 519-528. 2005.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; DE SÁ, M.H.B. **Bacteriologia Geral**. 1st ed. Rio de Janeiro, Brasil; p 38-55. 2008.

VIANA, G.S.B; BANDEIRA, M.A.M.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, 10: 189-195. 2003.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, 4: 481-489. 2002.

WANG, W. et al. Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. **Molecules**, 17: 2704-2713. 2012.

WARREN, J.W. Catheter-associated urinary tract infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, 11: 609-622. 1997.

WOODS, D.E. et al. Correlation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors from clinical and environmental isolates with pathogenicity in the neutropenic mouse. **Canadian Journal of Microbiology**, 43(6): 541-51. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Containing antimicrobial resistance: review of the literature and report of a WHO workshop on the development of a global strategy for the containment of antimicrobial resistance. 1999.

XIONG, L. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. **Molecules**, 18: 963–973. 2013.

YE, C.L.; DAI, D.H.; HU, W.L. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.) **Food Control**, 30: 48-53. 2013.

YU, J.Q. et al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. **Food Chemistry**, 126: 1593–1598. 2011.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO

Submissão: 21/10/2016

Primeira ressubmissão após correções: 02/11/2016

Segunda ressubmissão após novas correções: 19/01/2017

Status: Submetido

Chemical Composition and Evaluation of the Antibacterial and Cytotoxic Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Myracrodruon urundeuva*.

Ítalo Diego Rebouças de Araújo ^{1,*}, Nayara Coriolano de Aquino ², Andreza Conceição Vêras de Aguiar Guerra ³, Renato Ferreira de Almeida Júnior ⁴, Renata Mendonça Araújo ⁵, Raimundo Fernandes de Araújo Júnior ⁶, Kléber Juvenal Silva Farias ⁷, José Veríssimo Fernandes ⁸ and Vânia Sousa Andrade ⁹

¹ Centro de Biociências (CB), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil;

² Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 60021-940, CE, Brazil ; nayaracoriolano@hotmail.com;

³ Centro de Biociências (CB), Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; dezahbiomed@gmail.com;

⁴ Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; renatojrj@hotmail.com;

⁵ Centro de Ciências Exatas e da Terra (CCET), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; renat.onca@gmail.com;

⁶ Centro de Biociências (CB), Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; arauojr@cb.ufrn.br;

⁷ Instituto de Medicina Tropical (IMT), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; kfarias3@hotmail.com;

⁸ Centro de Biociências (CB), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; veris@cb.ufrn.br;

⁹ Centro de Biociências (CB), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 59072-970, RN, Brazil; vsandrade@cb.ufrn.br.

* Correspondence: italo_diego1989@hotmail.com; Tel.: +55-084-98781-3127

Abstract:

Background: This study evaluated the *in vitro* activity of essential oil extracted from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*.

Methods: The oil was obtained by hydro-distillation, and characterized by NMR and GC-MS. The antibacterial activity was evaluated by broth microdilution technique with MIF determined using CTT (2,3,5-triphenyl-tetrazolium) as a growth indicator, and CBM in BHI agar. The oil's cytotoxicity was evaluated in HeLa, HEK-293, and Vero E6 cells using MTT, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium.

Results: The oil showed chemical markers: α -pinene (87.85 %), trans-caryophyllene (1.57 %), limonene (1.49 %) and β -pinene (1.42 %), and activity against all strains: *Staphylococcus aureus* (MIC = MBC = 0.22 mg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 0.11 mg/mL and MBC = 0.22 mg/mL), *Escherichia coli* (MIC = 0.88 mg/mL and MBC = 1.75 mg/mL) *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = MBC = 7 mg/mL) and *Salmonella* Enteritidis (MIC = MBC = 0.44 mg/mL). *In vitro* cytotoxicity tests showed that the oil is not toxic, with slight antitumor activity.

Conclusions: We conclude that the *M. urundeuva* oil results are promising, with prospects of being pharmacologically viable.

Keywords: *Myracrodruon urundeuva*, bactericidal activity, minimum inhibitory concentration, chemical characterization, essential oil, cytotoxicity.

Background

From the earliest times, medicinal plants have been widely used as natural drugs in the treatment, cure and prevention of disease [1]. Among these are bacterial diseases [2-4]. While facing increasing bacterial resistance against routinely used traditional and synthetic antibiotics for the treatment of microbial diseases [5-7], we find that research in natural products of plant origin to elucidate new therapies from novel antibacterial agents has grown significantly [8,9]. Studies report that certain natural antibacterials when given with standard antibiotics are even more effective in synergism than the standard drug alone [10-12]. In cells of resistant pathogens, it is

expected that the molecules obtained from these natural compounds reach different targets than those of known antibiotics.

Among various natural substances with antimicrobial potential, essential oils have been highlighted. These generally consist of a mixture of natural volatile chemical compounds, such as monoterpenes and sesquiterpenes, and their oxygenated derivatives as well [13]. Such compounds comprise the secondary metabolites of aromatic plants, which are considered to be natural remedies [14,15] with antimicrobial activity [16-20]. They may therefore be an alternative to overcome the increasing resistance of pathogens. Essential oils are also being investigated by some researchers for their anti-cancer potential [21,22].

Among the aromatic plants whose essences oils are extracted, an endemic savanna tree, widely distributed in Brazil, and belonging to the family Anacardiaceae we find *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira - of the - backwoods) [23]. This plant has been noted for its antimicrobial potential, which was evidenced when molecules obtained from crude extracts of *M. urundeuva* subjected to antimicrobial activity tests were found to have antibacterial and antifungal properties [24-26], encouraging research on possible uses for the substance in herbal medicine.

The essential oil extracted from the leaves of *M. urundeuva* comprises a blend of terpenes which have not yet been fully elucidated. Based on these premises, the main objective of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil extracted from the leaves of *M. urundeuva*, typically grown in northeastern Brazil.

Methods

Plant material and essential oil extraction

Leaves of *M. urundeuva* were collected from ten (10) specimens grown in the Núcleo de Pesquisa em Agricultura Urbana (NEPAU), Department of Plant Science, Ceará Federal University (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. The leaves were collected with the aid of a pruning shears, at four different points in the tree canopy, and then were mixed in paper bags forming composite samples. After being cut and mixed, they were packed in a drying oven at 75 °C for later weighing. The dry weight of the collected plant material was 1 kg. The voucher specimen (No. 48904) was deposited

at the Prisco Bezerra Herbarium of the Department of Biology, Ceará Federal University.

In the extraction of essential oil, *M. urundeuva* leaves were hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus, adapted by Gottlieb [27]. In this process, fresh *M. urundeuva* leaves were placed in a 5 L flask, where 2 L of distilled water were added and the system was kept under boiling for a period of 2 h, until reaching 80 °C, to afford yellowish oils by steam stripping. These were dried over Na₂SO₄, stored in sealed glass vials, and preserved under refrigeration before analysis. The yield of the oils (0,02 % m/m) was calculated from the fresh weight of the plant materials. The oily extract, weighed on a precision scale, revealed a concentration of 900 mg for each 1 mL of extracted oil.

Identification of Essential Oil Constituents

Essential oils were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). GC-MS chromatographic (Shimadzu GCMS-QP2010-Plus) was realized infused-silica capillary column RTX-5 (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness); injections in *splitless* mode with injection temperature of 220 °C; the column was programmed from 60 to 240 °C at 3 °C/min and held isothermal for 7 min. Helium was used as gas carrier to GC-MS at flow rate 1.0 mL min⁻¹. The interface temperature of GC-MS was 240 °C and Mass spectra was recorded from 30-450 *m/z*, a scan interval of 0.5 s, with electron impact ionization voltage of 70 eV. Individual components were identified by comparison of the acquired mass spectrum with reference data using the Wiley L-Built library and by comparing their retention indices with a commercially available database (NIST 2.0), as well as by its experimental Kovat's retention index (RI) calculated from a C₉-C₂₄ *n*-alkanes series.

Microbial Isolates

The microorganisms tested were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Salmonella* Enteritidis (INCQS 500258), maintained at 8 °C. Inoculates were prepared from growth on BHI (Brain Heart Infusion) agar at 37 °C/24h, with addition of colonies in sterile 0.9 % saline and

adjusted to the range of 0.5 Mc Farland, which is equivalent to 10^8 colony-forming units per mL (10^8 CFU/mL).

Antibacterial Activity

The antibacterial activity of the oil was assessed quantitatively by broth microdilution technique in 96 well microplates [28]. The test sample (T) was diluted serially at the following concentrations: 450; 225; 112.5; 56; 28; 14; 7; 3.52; 1.76; 0.88; 0.44; 0.22; 0.11; 0.055; 0.028 and 0.014 mg/mL. For the positive control (PC) were used serial dilutions with gentamicin (Gentamisan - SANTISA®) at a concentration of 0.016 mg/mL or 16 µg/mL. As a negative control (NC) an aqueous solution of 5 % Tween 80 was used. We then added 20 µL of the inoculum solution to each of the wells. In the growth control (GC) was placed inoculum alone. The microplate was incubated at 37 °C/24h for subsequent reading of the minimum inhibitory concentration (MIC). All tests were performed in triplicate.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

To determine the MIC, 20 µL of CTT (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) 0.5% solution was applied to each well, to reveal bacterial growth. The MIC readings were performed after incubation at 37 °C for a further 2 h and were defined as the lowest concentrations of essential oil visually inhibiting microbial growth [29].

Determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The bactericidal activity of the test oil was measured after reading the MIC, by seeding the micro-titer wells content into BHI agar. The most representative wells T, PC, NC and GC were chosen. From each selected well, 8 µL was seeded in specific regions numbered on the back of the Petri dishes, which were then incubated at 37 °C. After 24 hours of incubation, readings were carried out to determine the bactericidal action of the oil. The MBC was considered the lowest concentration that totally prevented microbial growth in BHI agar.

Citotoxicity Assay

Myracrodruon urundeuva essential oil, having shown antibacterial activity was evaluated for its cytotoxicity to Vero E6 (renal epithelial *Cercopithecus aethiops*),

HeLa (human cervical adenocarcinoma) and HEK-293 (human kidney embryonic) cell lines obtained from the Culture Collection of the Federal University of Rio de Janeiro, and cultured in Dulbecco's modified medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and 1 % antibiotic (penicillin/streptomycin). The cells were maintained in an incubator at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. To assess the viability and proliferation rate of the cell lines in the presence of the oil, the colorimetric assay based on tetrazolium salt MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Germany) was performed as described by Mosmann (1983) [30], which evaluates the metabolic activity of the cells through the quantification of MTT reduction by NADPH and NADH-associated dehydrogenases, results in the production of formazan crystals within the cells, giving the characteristic coloration to the medium. For this, cells were placed in 96 well plates with a 5x10³ cells/well density. After 24 hours in culture conditions, serum deprivation was performed, and the same time having passed, we applied *M. urundeuva* essential oil at concentrations of 0.275 mg/mL, 0.55 mg/mL, 1.1 mg/mL, 2.2 mg/mL and 4.4 mg/mL in the cells strains. After the treatment process (24 h and 48 h), there was added 100 µL/well of MTT (5 mg/mL), with incubation for 4h. After this, the medium was removed and 100 µL of ethanol/well was added. The plates were shaken and the absorbance obtained in the microplate reader (Epoch - BioTek Instruments Inc., USA) at 570 nm, using Gen5 Data Analysis version 2.0 software (BioTek Instruments Inc., USA). The growth control consisted only of cell culture in culture medium. The assays were assessed in triplicate and the cell viability percentage was calculated as follows:

$$CV \% = (Abs\ sample / Abs\ growth\ control) \times 100 \quad (1)$$

Statistical Analysis

To compare the cell viability, between 24 h and 48 h of Vero E6, HeLa and HEK-293 cells lines, obtained from the above formula, was performed Wilcoxon test (R-3.1.1 Software).

Results

Chemical Characterization of Essential Oil of *M. urundeuva*

During chemical characterization of *M. urundeuva* leaf essential oil the presence of four major chemical markers was detected: α -pinene (87.85 %) as major constituent, *trans*-caryophyllene (1.57 %), limonene (1.49 %) and β -pinene (1.42 %) with intraspecific variability. The constituents were identified by mass spectrometry (GC-MS) expressed in Table 1.

Table 1 Essential oil components identified by GC-MS.

#	Compound	*RI	Essential Oil (%)
1	α -Pinene	939	87.85
2	Canfene	964	0.28
3	β -Pinene	983	1.42
4	Δ^3 -Carene	1016	0.22
5	Limonene	1020	1.49
6	Eucalyptol	1022	0.43
7	Terpinolene	1090	0.43
8	<i>trans</i> -Cariofilene	1421	1.57
9	Aromadendrene	1437	0.57
10	Viridiflorene	1494	0.18
11	Viridiflorol	1593	0.63
	hydrocarbons monoterpenes		92.09
	oxygenated monoterpenes		0.43
	hydrocarbons sesquiterpenes		2.75
	oxygenated sesquiterpenes		0.63
	Total identified		95.9

*RI: Kovat's retention index.

MIC and MBC Determination

The MIC and MBC results are shown in Table 2. The controls efficiently validated the tests. The positive control (PC) showed no bacterial growth at higher concentrations, demonstrating the effectiveness of gentamicin as a positive control in the test, since the antibiotic's inhibitory effect on the bacteria occurred up to a concentration of 0.004 mg/mL (4 µg/mL), with equivalence between MIC and MBC. Bacterial growth occurred in all assays for both the negative control (NC) and for the growth control (GC), confirming the non-bacterial inhibition of Tween 80, and the viability of the strains used, and demonstrating the antibacterial effect of *M. urundeuva* oil.

Table 2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) results of *Myracrodruon urundeuva* essential oil.

Bacteria	Concentrations (mg/mL)			
	<i>M. urundeuva</i> essential oil		Gentamicin	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0.22	0.22	0.004	0.004
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	0.11	0.22	0.004	0.004
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0.88	1.75	0.004	0.004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	7.00	7.00	0.004	0.004
<i>Salmonella</i> Enteritidis (INCQS 500258)	0.44	0.44	0.004	0.004

ATCC: American Type Culture Collection; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fiocruz - Brazil).

Cell-Based Toxicity Results

In the cell viability assay for the line Vero E6 treated with decreasing concentrations of the test sample, it was shown in the first reading after 24 hours exposure that there was toxic activity at concentrations of 4.4 mg/mL and 2.2 mg/mL oil; inducing cell death in percentages of 93.91 % and 2.32 %, respectively. However, the lower oil concentrations of 1.1 mg/ml, 0.55 mg/ml, and 0.275 mg/ml did not affect the viability of the cells. In the second reading after 48 hours of exposure, cell toxicity occurred only at the highest concentration, 4.4 mg/mL; with cell death at 94.26 %. For the other concentrations of 2.2 mg/mL, 1.1 mg/mL, 0.55 mg/mL and 0.275 mg/mL, cell viability was not affected by the oil. However, statistically, there was not significant difference between cellular viability values of 24 h and 48 h, once a value of $p = 0.7972$ ($p > 0.05$) was obtained, indicating that the oil inhibits Vero E6 cells at 4.4 mg/mL. The results were are shown in Figure 1.

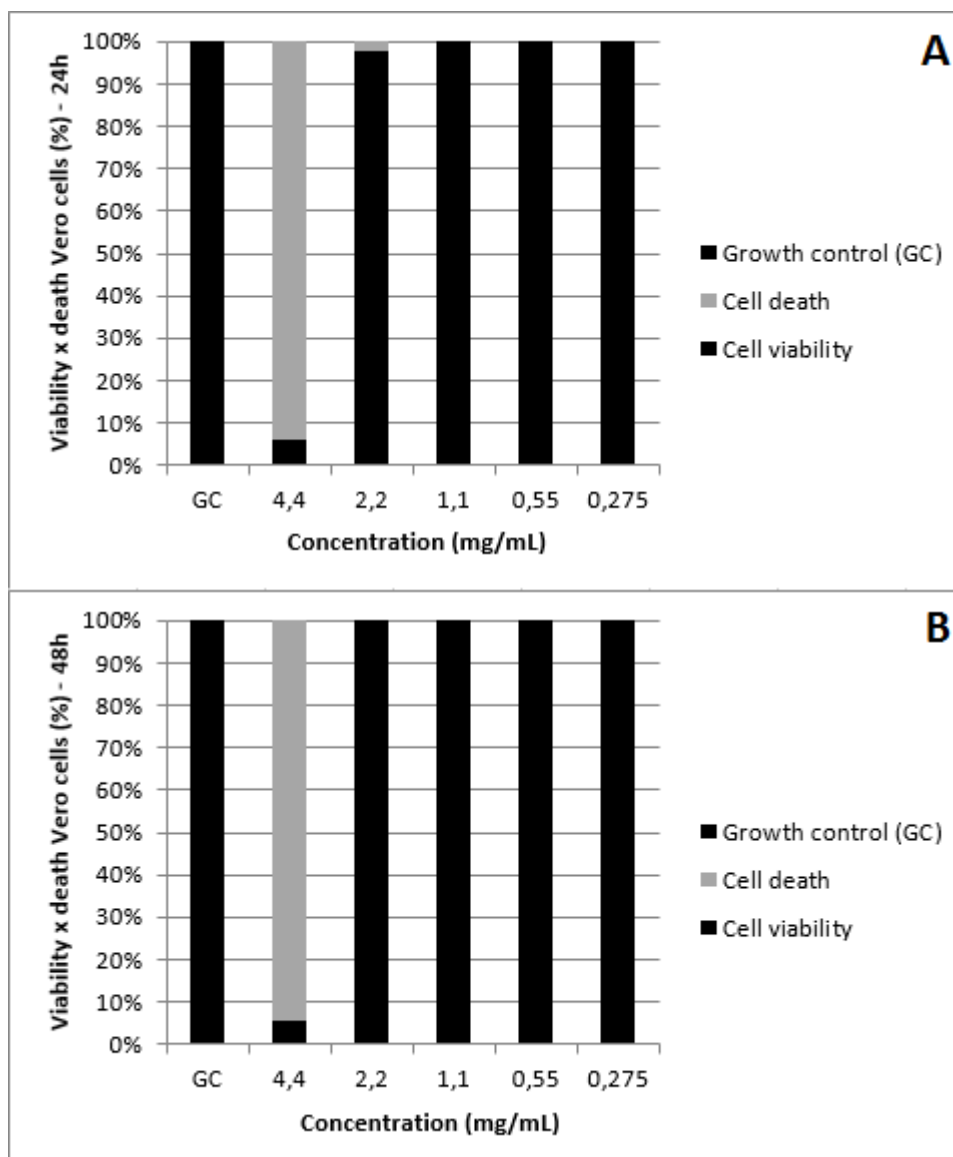


Figure 1. Percentages Vero cell viability. Treated with differing concentrations of *M. urundeuva* essential oil after 24 h (A) and after 48 h (B). GC: growth control.

For HeLa strain in the 24 hour period, we observed that the largest *M. urundeuva* oil concentrations had the greater inhibitory effect on tumor cell proliferation. Accordingly, the oil showed inhibitions from 11 % to 21 % between the doses of 1.1 mg/mL and 4.4 mg/mL. At an elapsed time of 48 hours, concentrations of 2.2 mg/mL and 4.4 mg/mL showed greater inhibition of proliferation, being 32.4 % and 44.3 %, respectively. This suggests that, although there was no statistically significant difference between the viability percentages observed at 24 h and 48 h exposure times ($p = 0.8085$; $p > 0.05$), the oil performed a discrete antitumor action observed in 24 h, which is intensified over the exposure time, as shown in the 48 h reading, whose slight decrease in cell viability at all concentrations (Figure 2).

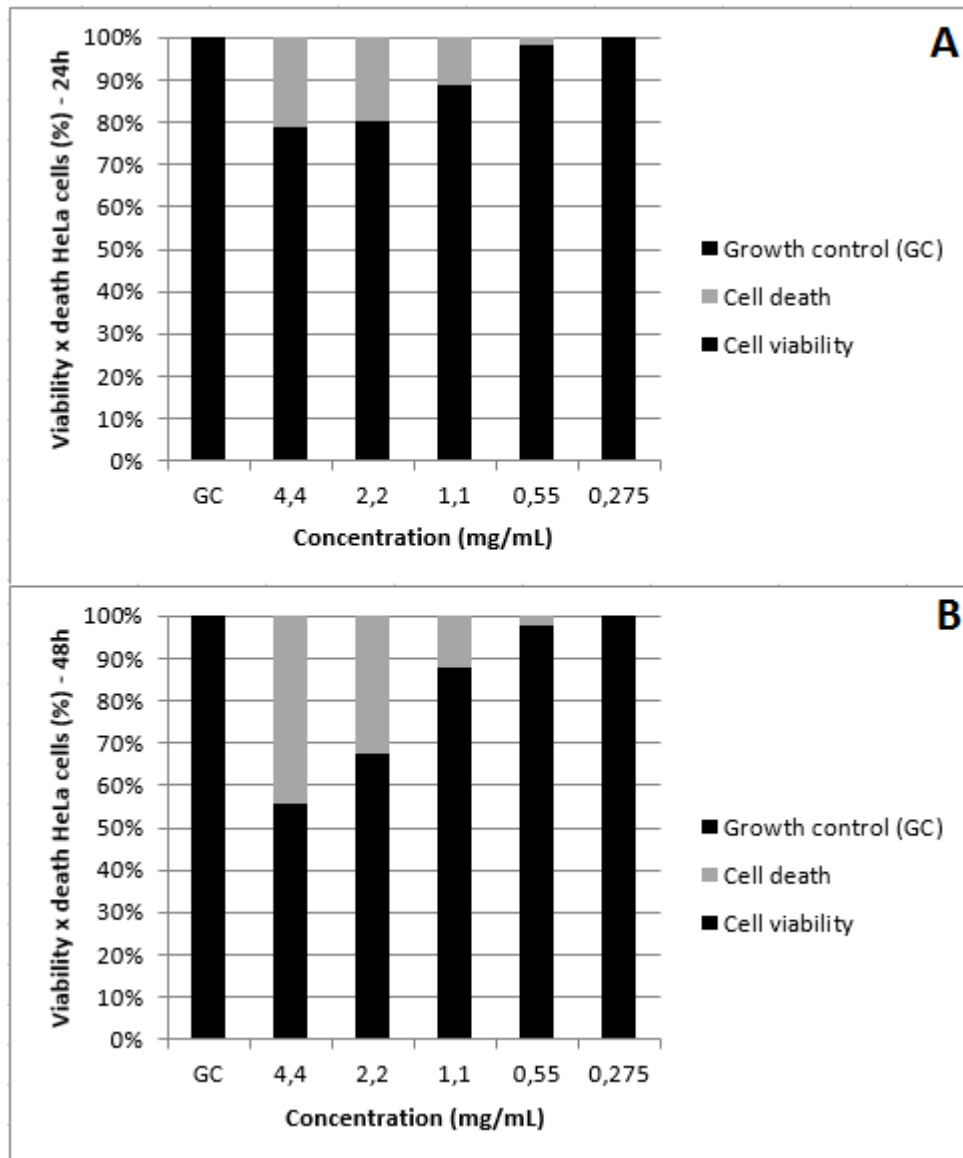


Figure 2. Percentages HeLa cell viability. Treated with differing concentrations of *M. urundeuva* essential oil after 24 h (A) and after 48 h (B). GC: growth control.

For the non-tumor cell strain HEK-293, we observed that the oil exerted no toxic effects. At 24 hours, cell proliferation occurred at levels near or above those of the untreated control cells. At 48 hours we observed the same occurring as for the cells in the first reading. The statistical analysis showed that there was no difference between cell viability percentage in 24 h and 48 h, and these were statistically the same, since the p value obtained from the Wilcoxon test was $p = 1$ ($p > 0.05$). (Figure 3).

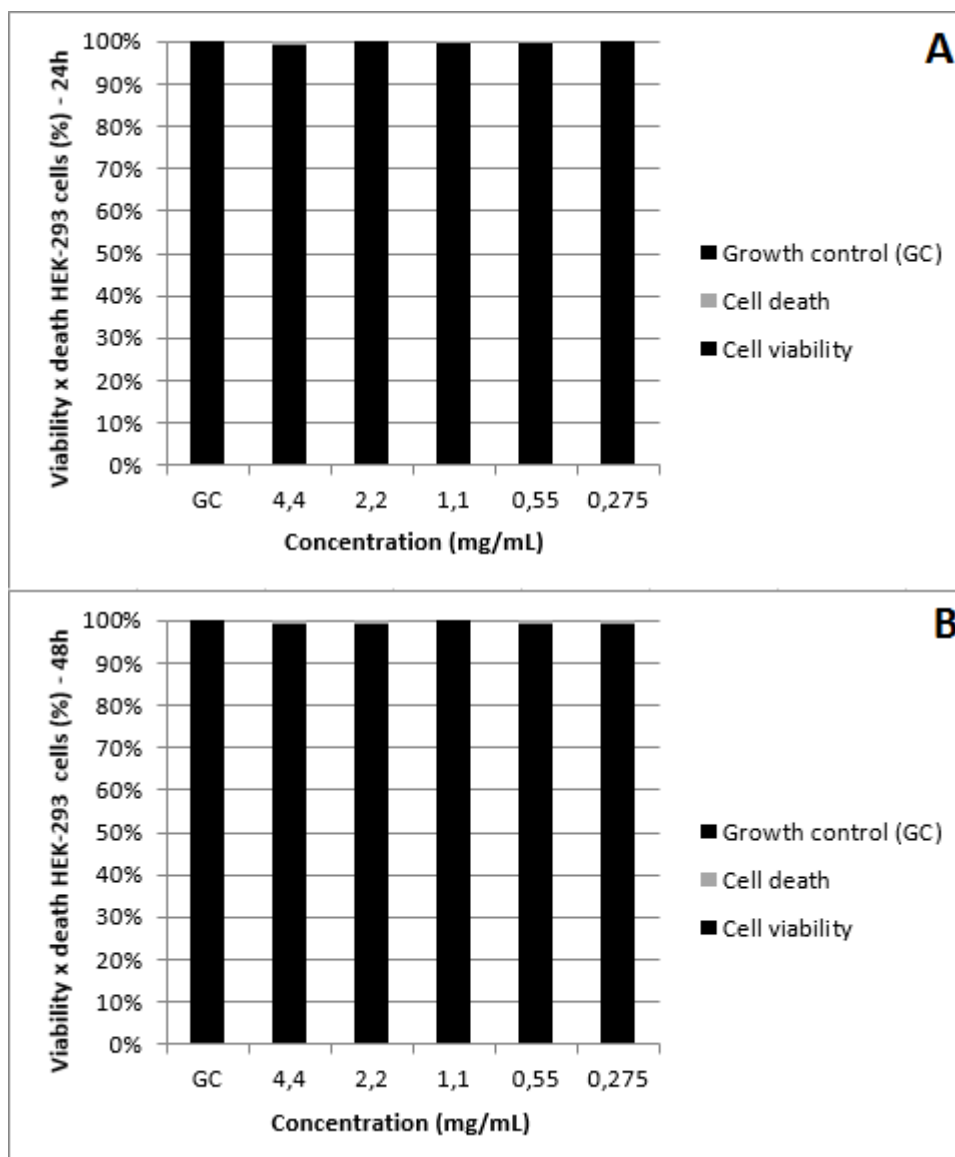


Figure 3. Percentages HEK-293 cell viability. Treated with differing concentrations of *M. urundeuva* essential oil after 24 h (A) and after 48 h (B). GC: growth control.

Discussion

The antibacterial activity of *Myracrodruon urundeuva* essential oils has not been reported. However, studies show that essential oil extracts from the same plant, with distinct chemical natures, have been tested against some of the bacteria herein tested. Among these, *S. aureus* [26, 31-33], *E. coli* [26,32,33], and *P. aeruginosa* [33], were inhibited by such extracts, showing the antimicrobial activity of *M. urundeuva*.

However, in this study, the *M. urundeuva* leaf essential oil showed antibacterial activity against all tested strains. Such activity is probably attributable to

the terpenoids, since they presented a higher proportion of these constituents in the GC-MS chemical characterization. Similarly, other studies attribute antimicrobial activity to these secondary metabolites; being abundant constituents of these essential oils [16-20,34].

This study presents α -pinene (87.85 %) as the major constituent in *M. urundeuva* essential oil's chemical composition. However, it is not known whether α -pinene is chiefly responsible for the bactericidal action of the oil, or if one among any other terpenes promotes such action, since in other studies, chemical characterization of essential oils from *M. urundeuva* leaves has shown variable terpene percentages in relation to our results [35,36]. It is important to consider differences in the chemical composition of essential oils extracted from plants of the same species, these arise from factors such as geographic variation, climate, soil, planting modes, fertilizers used, time of collection, and the post collection processing and extraction techniques employed [37-40]. It is believed that the *M. urundeuva* essential oil's antibacterial activity is likely conferred by terpenes, since they are abundant in the composition.

In the current study, we observed *M. urundeuva* essential oil's bactericidal action for all of the bacteria tested: Gram-positive (*S. aureus* and *S. epidermidis*) and Gram-negative (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. enteritidis*). The MIC and MBC data show a more effective antibacterial activity against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. This is probably due to the greater complexity of the Gram-negative cell wall (with respect to Gram-positive) [41], that interferes with direct action on the pathogen metabolism. Between the two Gram-positive bacteria, *S. epidermidis* (MIC = 0.11 mg/mL), was found among the five strains tested as being the most sensitive to *M. urundeuva* essential oil, showing higher sensitivity than *S. aureus* (MIC = 0.22 mg/mL). For the three Gram-negative bacteria, *M. urundeuva* essential oil exerted stronger inhibition against *S. enteritidis* (MIC = 0.44 mg/mL) as compared to *E. coli* (MIC = 0.88 mg/mL) and *P. aeruginosa* (MIC = 7.0 mg/mL). *P. aeruginosa* among the five strains mentioned, was less sensitive to the essential oil. It is believed that the result is due to the large capacity of *P. aeruginosa* to produce biofilm [42], which further complicates direct action of the aromatic oil component against the bacterial cell.

In addition to *M. urundeuva* against the bacteria of this study, the literature reports studies that prove the effectiveness of essential oils obtained from other plants [43-50]. Although the plants cited show similar or higher antibacterial activity when compared to *M. urundeuva*, one should not underestimate its antibacterial effect, which is very promising.

However, also important to note, is that according to certain studies, not all the essential oils extracted from other plants exert antimicrobial activity against the bacteria herein described, either for promoting weaker bacterial inhibition, giving higher MIC values in relation to those presented here, or because of demonstrated bacterial resistance [51-59]. The results, when compared with those obtained in the present study reveal the more promising antibacterial power of *M. urundeuva* essential oil, likely for containing specific active components.

Regarding cell culture cytotoxicity, the results demonstrate that for HeLa cells, *M. urundeuva* oil shows increasing cytotoxicity over exposure time, indicating possible anticancer activity. For the Vero E6 strain *M. urundeuva* oil cytotoxicity decreased with increasing exposure time, i.e., the greater the exposure time the lower the cytotoxic activity, and the higher the cell viability. This effect was also observed for the HEK-293 line, where cell viability presented as superior to both Vero strain readings. For the strains Vero E6 and HEK-293, these results confirm that the essential oil is potentially non-cytotoxic to normal human and mammals cells in general.

Data on *M. urundeuva* cellular toxicity are still scarce in the literature, especially as regards essential oils. However, certain researchers have evaluated the toxicity of *M. urundeuva* plant extracts, stimulating further research on their use as a source of medicinal products. Work by Ferreira et al. [60], highlights the antiproliferative power of methanolic extract obtained from the *M. urundeuva* against HL-60 lines (leukemia) cancer, SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (colon), and MDA/MB-435 (melanoma) cells indicating possible *M. urundeuva* antitumor effect.

Despite the data obtained in the present cell toxicity tests, additional *in vitro* assays are needed, and will be conducted in the future, such as cytotoxicity against normal human cells originating from other tissues, and further investigation of antitumor activity; for example, fibroblasts, and other neoplastic cells. Further testing is needed to prove the effectiveness of the oil *in vivo* so it can be considered

pharmacologically viable. Finally, *M. urundeuva* oil showed significant antibacterial activity, discrete antitumor effectiveness, and very low cell toxicity.

Conclusion

Essential oil extract from the leaves of *Myracrodruon urundeuva* showed promising Gram-positive and Gram-negative antibacterial activity. Further, the *in vitro* cytotoxicity test results were satisfactory, since the oil was not toxic to human cells and displayed a discrete antitumor effect, showing potential as a reliable source for phyto-pharmaceuticals of the future. Although further *in vitro* toxicity studies are necessary in other normal human cells, and also *in vivo* assays, aimed at proving its efficacy and safety in pre-clinical use, the results obtained here for *M. urundeuva* essential oil are already quite promising, and from a pharmacological point of view, include the possibility of future usefulness.

List of abbreviations

GC/MS: Gas chromatography-mass spectrometry; RI: Kovat's retention index; ATCC: American Type Culture Collection; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; CFU: Colony-forming unity; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MBC: Minimum Bactericidal Concentration; PC: Positive control; NC: Negative control; GC: Growth control; BHI: Brain heart infusion; CTT: 2.3.5-triphenyl-tetrazolium chloride; MTT: [3-(4.5-dimethylthiazolyl)-2.5-diphenyl-tetrazolium bromide]; DMEM: Dulbecco's modified medium; FBS: Fetal bovine serum.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have competing interests.

Funding

FAPERN (Fundação de Apoio à Pesquisa do RN), the funding for the study design and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), funded the work during its development.

Authors' contributions

IDRA, JVF and VSA conceived the experimental design; NCA and RMA performed extraction and phytochemical characterization of the essential oil; IDRA and VSA designed and performed the microbial assays; RFAJ, KJSF, ACVAG and RFAJ designed and performed cytotoxicity assays; IDRA, NCA and ACVAG wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERN (Fundação de Apoio à Pesquisa do RN), CNPQ (Conselho Nacional de Pesquisa), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), UFRN (Federal University of Rio Grande do Norte) and Paulo Roberto Medeiros de Azevedo for the statistical analysis of the study.

References

1. Veiga JAF, Pinto AC. Plantas Mediciniais: cura segura? *Quimica Nova* 2005, 28: 519-528.
2. Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, 95: 367-373.
3. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol* 2012, 23: 174–181.
4. Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100: 153–157.
5. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 2011, 477: 457–461.

6. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, Stadlbauer V, Gustot T, Bernardi M, Canton R. Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J. Hepatol.* 2014, 60: 1310–1324.
7. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, Angelis G, Falcone M, Frank U, Kahlmeter G, Pan A, Petrosillo N, Rodríguez-Baño J. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20: 1–55.
8. Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi SM, Sharifi-Rad M, da Silva JAT. Antibacterial, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory activities of crude extract from *Nitraria schoberi* fruits. *3 Biotech* 2015, 5: 677-684.
9. Veras HNH, Rodrigues FFG, Colares AV, Menezes IRA, Coutinho HDM, Botelho MA, Costa JGM. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia* 2012, 83: 508–512.
10. Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, di Stasi LC, Fernandes A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006, 101: 387–390.
11. Kumar AS, Venkateshwaran K, Vanitha J, Saravanan VS, Ganesh M, Vasudevan M, Sivakumar T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. *Bangladesh J. Pharmacol.* 2008, 4: 13–16.
12. Duarte AE, Menezes IRA, Braga MFBM, Leite NF, Barros LM, Waczuk EP, Silva MAP, Boligon A, Rocha JBT, Souza DO, Kamdem JP, Coutinho HDM, Burger ME. Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs. *Molecules* 2016, 21: 743.
13. Da Silva ACR, Lopes PM, de Azevedo MMB, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules* 2012, 17: 6305–6316.
14. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46: 446–475.
15. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 2007, 21: 308–323.
16. Xiong L, Peng C, Zhou QM, Wan F, Xie XF, Guo L, Li XH, He CJ, Dai O. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. *Molecules* 2013, 18: 963–973.
17. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flav. Frag. J.* 2012, 27: 13–39.
18. Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J. Appl. Microb.* 2006, 100: 296–305.
19. Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—An overview. *Forsch. Komplementmed.* 2009, 16: 79–90.

20. Sousa OV, Del-Vechio-Vieira G, Alves MS, Araújo AAL, Pinto MAO, Amaral MPH, Rodarte MP, Kaplan MAC. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. barks. *Molecules* 2012, 17: 11056–11066.
21. Sylvestre M, Legault J, Dufour D, Pichette A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine* 2005, 12: 299–304.
22. Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Legault J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharm.* 2006, 103: 99–102.
23. Nunes YRF, Fagundes M, Almeida HS, Veloso MDM. Aspectos ecológicos da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão - Anacardiaceae): Fenologia e germinação das sementes. *R. Árvore* 2008, 32: 233-243.
24. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009, 42: 222-224.
25. Menezes TEC, Delbem ACB, Brighenti FL, Okamoto AC, Júnior EGJ. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. *Pharm. Bio.* 2010, 48: 300-305.
26. Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural* 2012, 42: 326-331.
27. Gottlieb OR, Magalhães MT. Modified distillation trap. *Chemist Analyst*, 1960, 49: 114.
28. M100-S26: *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute: USA, 2016.
29. Smânia JA, Valgas C, Souza SM, Smânia EFA. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Braz. J. of Microbiology* 2007, 38: 369-380.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immunological Methods* 1983, 65: 55-63.
31. Silva CM, Mota FBC, Rodrigues MD, Alves OD, Maia VH. Crude extracts and semi-fractions from *Myracrodruon urundeuva* with antibacterial activity against American type culture collection (ATCC) strains of clinical relevance. *J. of Medicinal Plants Research* 2013, 7: 2407-2413.
32. Jandú JJB, Silva LCN, Silva MV, Correia MTS. Antimicrobial activity and synergistic effects of an ethyl acetate fraction from methanol extract of *Myracrodruon urundeuva* bark. *J. of Medicinal Plants Research* 2015, 9: 641-646.
33. Sá RA, Gomes FS, Napoleão TH, Santos NDL, Melo CML, Gusmão NB, Coelho LCBB, Paiva PMG, Bieber LW. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Sci Technol.* 2009, 43: 85–95.
34. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils From Aromatic Plants Used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004, 35: 275-280.

35. Montanari RM, Barbosa LCA, Demuner AJ, Silva CJ, Andrade NJ, Ismail FMZ, Barbosa MCA. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induced Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. *Molecules* 2012, 17: 9728-9740.
36. Costa OB, Menezzi CHSD, Benedito LEC, Resck IS, Vieira RF, Bizzo HR. Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. *Int. J. of Forestry Research* 2014.
37. Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry* 2007, 100: 1054-1058.
38. Asekun OT, Grierson DS, Afolayan AJ. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chemistry* 2007, 101: 995-998.
39. Apel MA, Sobral M, Henriques AT. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006, 16: 402-407.
40. Potzernheim MCL, Bizzo HL, Vieira RF. Análise dos óleos essenciais de três espécies de Piper coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006, 16: 246-251.
41. Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ. Structure and Function of the Cell Envelope of Gram-Negative Bacteria. *Bacteriological Reviews* 1974, 38: 87-110.
42. Chiang P, Burrows LL. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2003, 185: 2374-2378.
43. Santos A, Paduan RH, Gazin ZC, Jacomassi E, D' Oliveira OS, Cortez DAG, Cortez LER. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009, 19: 436-441.
44. Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural, N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48: 3274-3280.
45. Hsouna AB, Trigui M, Mansour RB, Jarraya RM, Damak M, Jaoua S. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 2011, 148: 66-72.
46. Hu H, Zheng X, Hu H. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of the essential oil from the leaves of *Acanthopanax leucorrhizus* (Oliv.) Harms. *Environmental toxicology and pharmacology* 2012, 34: 618-623.
47. Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. *Molecules* 2012, 17: 2704-2713.
48. Ye CL, Dai DH, Hu WL. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.) *Food Control* 2013, 30: 48-53.

49. Abdel-Reheem MAT, Oraby MM. Anti-microbial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of *Pimpinella anisum* essential oil. *Annals of Agricultural Science* 2015, 60: 335–340.
50. Hajlaoui H, Mighri H, Aouni M, Gharsallah N, Kadri A. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis* 2016, 95: 86-94.
51. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum*) Oil against *Salmonella* Enteritidis *in Vitro* and in Food. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2010, 74: 1200–1204.
52. Yu JQ, Lei JC, Zhang XQ, Yu HD, Tian DZ, Liao ZX, Zou G. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. *Food Chemistry* 2011, 126: 1593–1598.
53. Bouzidi LE, Jamali CA, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmuthc H, Leach D, Abbad A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products* 2013, 43: 450–456.
54. Rashid S, Rather AM, Shah WA, Bhat BA. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food Chemistry* 2013, 138: 693–700.
55. Qi XL, Li TT, Wei ZF, Guo N, Luo M, Wang W, Zu YG, Fu YJ, Peng X. Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pea leaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and evaluation of its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products* 2014, 58: 322–328.
56. Shakeri A, Khakdan F, Soheili V, Sahebkar A, Rassam G, Asili J. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *Kopetdagensis*. *Industrial Crops and Products* 2014, 58: 315–321.
57. Kazemi M. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and *Carum copticum* L. essential oils. *J. of Herbal Medicine* 2015, 5: 217–222.
58. Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias M, Bardouki H, Panayiotidis MI, Galanis A, Kourkoutas Y, Chlichlia K, Pappa A. Phytochemical Profile and Evaluation of the Biological Activities of Essential Oils Derived from the Greek Aromatic Plant Species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. *Molecules* 2016, 21: 1069.
59. Petrelli R, Orsomando G, Sorci L, Maggi F, Ranjbarian F, Nya PCB, Petrelli D, Vitali LA, Lupidi G, Quassinti L, Bramucci M, Hofer A, Cappellacci L. Biological Activities of the Essential Oil from *Erigeron floribundus*. *Molecules* 2016, 21: 1065.
60. Ferreira PM, Farias DF, Viana MP, Souza TM, Vasconcelos IM, Soares BM, Pessoa C, Costa-Lotufo L, Moraes MO, Carvalho AFU. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 2011, 83: 1045-105.

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA

BMC – Complementary and Alternative Medicine

Impact factor: 2.020

Qualis Capes: B2, na área de Ciências Biológicas III

Research article

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [editorial policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the [CONSORT](#) extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be in stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under

license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].

- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. Blood 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007.

doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998.

<http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>.
Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999).
Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999).
Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006).
Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011.
<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Conditions of publication

Agree to conditions of submission, BioMed Central's copyright and license agreement and article-processing charge (APC)

Copyright and license agreement

During submission, you will need to accept and confirm the following conditions:

- All authors of the manuscript have read and agreed to its content and are accountable for all aspects of the accuracy and integrity of the manuscript in accordance with ICMJE criteria
- That the article is original, has not already been published in a journal, and is not currently under consideration by another journal
- That you agree to the terms of the BioMed Central Copyright and License Agreement, which we strongly recommend you read and, where applicable, Open Data policy. For authors who are prevented from being the copyright holder (for instance where Crown Copyright applies or researchers are US government employees), BioMed Central can accommodate non-standard copyright lines. If this applies to you, please contact us and provide details of your situation.