

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA VIRGÍNIA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA**

RECIFE

2017

AMANDA VIRGÍNIA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador(a):

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Co-Orientador (a):

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa dos Santos Correia

RECIFE

2017

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Barbosa, Amanda Virgínia

Caracterização química e atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais de plantas da Mata Atlântica/ Amanda Virgínia Barbosa- 2017.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Maria Teresa dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências e apêndice

1. Fitoquímicos 2. Essências e óleos essenciais- uso terapêutico 3. Mata Atlântica I. Silva, Márcia Vanusa da (orient.) II. Correia, Maria Teresa dos Santos (coorient.) III. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-086

AMANDA VIRGÍNIA BARBOSA

**Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana e Antioxidante de Óleos Essenciais
de Plantas da Mata Atlântica**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Marcia Vanusa da Silva
(Presidente)

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva – (UniCEUMA- MA)
(Examinador externo)

Profa. Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho – (UFPE)
(Examinadora interna)

Dedico

A Deus, por me conceder o dom da vida e por colocar no meu caminho as pessoas certas nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Com carinho, meus sinceros agradecimentos a todos que comigo estiveram e apoiaram-me no decorrer desse trabalho.

À Deus, por permitir ser quem hoje sou, por não me abandonar nas horas mais difíceis e por conceder-me a força necessária para, todos os dias, conseguir vencer os obstáculos que me pareciam insuperáveis!

À minha mãe, Josefa, por ter me dado liberdade nas minhas decisões e nunca me impedir de correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Renata e Leandro, os quais eu tenho muito amor. A minha sobrinha, Ana Beatriz, luz da minha vida! Sou muito grata por sua existência.

Aos meus avós maternos, Severina e José, os quais partiram e me deixaram de presente seus ensinamentos.

À toda minha família, tios, primos que de perto ou de longe torcem por mim e também são parte dessa conquista.

Aos meus sogros, em especial a minha sogra Valdeci, a qual nunca conseguirei demonstrar o tamanho da minha gratidão. Muito obrigada por todo seu apoio, carinho, compreensão, ajuda, paciência e preocupação. Deus me agraciou com sua presença num momento de muita dificuldade. Muito obrigada, D.Val.

Agradeço a minha cunhada, Maria Alice, que juntas nos divertimos bastante jogando conversa fora falando dos nossos artistas favoritos, das certezas e incertezas da vida, dos nossos sonhos e das coisas que nos fazem felizes.

Ao meu namorado, José Neto, a quem agradeço imensamente pela paciência, por me apoiar em todas as minhas decisões, por vibrar com as minhas conquistas e por todo o incentivo. Sei que estamos caminhando de mãos dadas nesse sonho.

À minha prima, Cristiane, que sem dúvida alguma contribuiu com esse momento. Sua coragem me fez sair da inércia e me inspirou a correr atrás do meu sonho.

À minha orientadora, Prof^a. Márcia Vanusa da Silva, pela oportunidade de ser sua aluna, pelos conselhos, e mesmo com todas as suas ocupações, preocupou-se. Obrigada!!!

À minha co-orientadora, Prof^a. Maria Tereza dos Santos Correia por ter me acolhido durante esse período de crescimento profissional.

Ao laboratório de Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em nome de Milena Silva e em especial ao professor Cláudio Camara pela contribuição ao nosso trabalho através da análise cromatográfica.

Agradeço aos meus parceiros de laboratório Priscilla, Bruno, Lívia, Júnior, Hortência, Tamires, Natalia, os IC's e todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular, pela colaboração, conselhos, incentivos e força.

Agradeço ao melhor grupo de trabalho do mundo, Camila, Cecília, Vitória, Sivoneide e em especial Bárbara Ramos, a melhor parceira que eu poderia ter, a qual me estendeu a mão e mostrou as minhas possibilidades. Levo todas pra sempre no meu coração.

Aos meus amigos da graduação, Tayane, Jackeline, Hugo, Moana, Karla, Rosinha, Rayra e Luana que torceram e torcem por mim.

A minha amiga-irmã Sivoneide (Sivo) que por um equívoco, quis o destino que nos encontrássemos e nos tornássemos grandes companheiras. Muito obrigada pela paciência, pelos conselhos e pela amizade sincera.

A todos que fazem o Departamento de Bioquímica, aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais. E um agradecimento especial ao Seu João, por ser sempre tão solícito e nos ajudar com tanta boa vontade.

Aos meus colegas da turma PGCB 2015.1, obrigada por dividirem comigo muitos momentos bons e tensos dessa jornada.

Aos meus amigos de longa data, pelos bons momentos vividos e por sempre me agradecer com palavras de incentivo.

A todos os Mestres os quais tive a honra de ouvir seus ensinamentos. Do seu modo, todos serviram de inspiração para mim.

A Universidade Federal de Pernambuco e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta etapa fosse concluída!

MUITO OBRIGADA !!!

“Nobody said it was easy.

No one ever said it would be so hard.”

- Coldplay

RESUMO

As famílias Annonaceae e Myrtaceae são abundantes na Mata Atlântica, no entanto, alguns dos seus representantes nunca foram estudados quanto a sua constituição química e atividades biológicas. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as composições químicas dos óleos essenciais de plantas presentes na Mata Atlântica, bem como avaliar suas atividades antioxidante e antimicrobiana. Os óleos essenciais (OE's) foram extraídos das folhas de *Xylopia frutescens*, *Campomanesia dichotoma* e *Eugenia umbrosa*, coletadas na Usina São José - PE, Usina Coruripe - AL e Chapada do Araripe - CE, respectivamente. Para avaliação do potencial antioxidante, OE's foram submetidos aos seguintes ensaios *in vitro*: sequestro dos radicais DPPH e ABTS+, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica, além da atividade hemolítica. Para avaliar a ação antimicrobiana, foram realizados os ensaios da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), ensaios de Curvas de crescimento e perfil de resistência frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Além disso, os OE's foram caracterizados por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) e Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chama (GC-FID). Nos ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS+, as melhores porcentagens de inibição foram observadas para o óleo de *X. frutescens* com $94,34 \pm 2,60$ % e $93,60 \pm 2,46$ %, respectivamente. O OE de *X. frutescens* e *E. umbrosa* foi capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênio tão bem quanto o padrão ácido ascórbico. A atividade inibitória da peroxidação para OE's apresenta-se melhor do que os padrões Trolox e BHT, além de revelarem baixas taxas hemolíticas. A CIM dos óleos para *S. aureus* ocorreu numa concentração relativamente alta e sua CBM foi em 4mg/mL. O ensaio da curva de crescimento demonstrou que a morte bacteriana acontece nas primeiras horas de contato dos óleos com a bactéria. O perfil de resistência indicou que as cepas de *S. aureus* eram resistentes a maioria dos antibióticos testados. As análises cromatográficas revelaram que os óleos essenciais de *X. frutescens* e *E. umbrosa* são misturas complexas formados basicamente por sesquiterpenos. Os resultados demonstram que OE de *X. frutescens* apresentou maior atividade antioxidante que os demais óleos. Todos os óleos foram bactericidas matando nas primeiras horas de contato com as cepas. A caracterização química do OE de *E. umbrosa* assim como as atividades biológicas de todos os óleos representam o primeiro estudo com óleos essenciais para estas espécies.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Antioxidantes. Mata Atlântica. Óleos essenciais.

ABSTRACT

The Annonaceae and Myrtaceae families are abundant in the Atlantic Forest, however, some of their representatives have never been studied for their chemical constitution and biological activities. Thus, the objective of this work was to characterize the chemical compositions of the essential oils of plants present in the Atlantic Forest, as well as to evaluate their antioxidant and antimicrobial activities. The essential oils (OE's) were extracted from the leaves of *Xylopia frutescens*, *Campomanesia dichotoma* and *Eugenia umbrosa*, collected at the Usina São José - PE, Usina Coruripe – AL and at the Chapada do Araripe - CE, respectively. In order to evaluate the antioxidant potential, OE's were submitted to the following in vitro assays: DPPH and ABTS + radical sequestration, total antioxidant capacity and lipid peroxidation, in addition to hemolytic activity. In order to evaluate the antimicrobial action, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assays were performed, growth curves and resistance profile assays against multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*. In addition, OE's were characterized by Mass Spectrometry Coupled Gas Chromatography (GC-MS) and Gas Chromatography Coupled to Flame Ionization Detector (GC-FID). In the DPPH and ABTS + radical capture assays, the best inhibition percentages were observed for *X. frutescens* oil with $94.34 \pm 2.60\%$ and $93.60 \pm 2.46\%$, respectively. The OE of *X. frutescens* and *E. umbrosa* was able to reduce the phosphomolybdenum complex as well as the standard ascorbic acid. The inhibitory activity of peroxidation to OE's is better than the Trolox and BHT standards, in addition to showing low hemolytic rates. The MIC of the *S. aureus* oils occurred at a relatively high concentration and their CBM was at 4mg / mL. The growth curve assay demonstrated that bacterial death occurs within the first few hours of contact of the oils with the bacteria. The resistance profile indicated that strains of *S. aureus* were resistant to most of the antibiotics tested. Chromatographic analyzes revealed that the essential oils of *X. frutescens* and *E. umbrosa* are complex mixtures formed primarily of sesquiterpenes. The results demonstrate that essential oil of *X. frutescens* presented greater antioxidant activity than the other oils. All the oils were bactericidal killing in the first hours of contact with the strains. The chemical characterization of *E. umbrosa* OE as well as the biological activities of all oils represent the first study with essential oils for these species.

Keywords: Antimicrobials. Antioxidants. Atlantic Forest. Essential Oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Brasil com a localização do Domínio Atlântico.....	20
Figura 2. Remanescentes florestais e Matas Naturais da Mata Atlântica.....	21
Figura 3: Espécie <i>Eugênia umbrosa</i>	25
Figura 4: Espécie <i>Campomanesia dichotoma</i>	26
Figura 5: Folhas de <i>Xylopia frutescens</i>	27
Figura 6: As principais vias do metabolismo secundário.....	28
Figura 7: Exemplos de terpenóides, alcalóide e compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário de plantas.....	30
Figura 8: Colônia de <i>S. aureus</i> em biofilme.....	41
Figura 9: A resistência à metilina em <i>Staphylococcus aureus</i> é conseguida por uma modificação estrutural do local alvo de ligação da metilina	43
Figura 10: <i>S. aureus</i> resistente a metilina.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os principais óleos no mercado mundial.....	32
--	----

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figura 1:** Porcentagem de sequestro de radicais livres nas diferentes concentrações dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*; BHT: butilhidroxitolueno.....75
- Figura 2:** Atividade antioxidante total dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. Amostras comparadas com o controle da atividade (ácido ascórbico). Os resultados são expressos em média e desvio padrão. *** amostra significativamente diferente; ns – amostra não significativamente diferente; Significância $P < 0,05$. XSF: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa* Ac Asc: Ácido Ascórbico.....76
- Figura 3:** Peroxidação lipídica dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*; BHT: butilhidroxitolueno; Quer: Quercentina.....77
- Figura 4:** Atividade hemolítica dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. Atividade hemolítica em porcentagem de óleo essencial nas concentrações: 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 microgramas / mL. XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*.....78
- Figura 5:** *S. aureus*. A,D e G = curva de crescimento do óleo essencial de *X. frutescens* (XFS) frente as cepas 02, 733 e 700, respectivamente; B, F e H = curva de crescimento do óleo essencial de *C. dichotoma* (GUA) para as cepas 02, 699 e 700, respectivamente; C,E = curva de crescimento do óleo essencial de *E. umbrosa* (ABA) com as cepas 02, 709 e 733, respectivamente. CC – controle de crescimento83

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Xylopi</i> <i>frutescens</i>	71
Tabela 2: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>E.</i> <i>umbrosa</i>	72
Tabela 3: Perfil de resistência dos isolados clínicos de <i>S. aureus</i> frente aos antimicrobianos penicilinas, Quinolonas, aminoglicosídeos, Lincosaminas, Cloranfenicol e Tetraciclina.....	79
Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cepas de <i>S. aureus</i>	80

LISTA DE ABREVIACÕES

AA Ácido Ascórbico

ABS Absorbância

ABTS•+ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

AMI Amicacina

AMP Ampicilina

ATT Atividade antioxidante total

BHA butilhidroxianisol

BHT butilhidroxitolueno

CAT catalase

CBM Concentração Bactericida Mínima

CIM Concentração Inibitória Mínima

CG/FID cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama

CG/MS cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CM centímetro

CIP Ciprofloxacina

CLI Clidamicina

CLO Clorafenicol

DMSO dimetilsufóxido

DNA ácido desoxirribonucléico

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EROs espécies reativas de oxigênio

GEN Gentamicina

GPx/GR glutationa peroxidase/ redutase

Ha hectare

HO• radical hidroxila

H₂O₂ peróxido de hidrogênio

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICIF índice da concentração inibitória fracionária

INPE Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

IPA Instituto Agronômico de Pernambuco

MMA Ministério do Meio Ambiente

MN nanômetro

O₂• radical superóxido

OD Densidade Ótica

OE óleo essencial

OMS Organização Mundial de Saúde

PG propilgalato

RMN Ressonância Magnética Nuclear

ROO• peroxila

SOD superóxido dismutase

SRL Sequestro de Radicais Livres

TET Tetraciclina

TBHQ terciobutilhidroxinona

USJ Usina São José

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 MATA ATLÂNTICA.....	20
3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE.....	23
3.2.1 <i>Eugenia umbrosa</i>.....	25
3.2.2 <i>Campomanesia dichotoma</i>	25
3.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANNONACEAE	26
3.3.1 <i>Xylopia frutescens</i>	27
3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	28
3.4.1 Óleos essenciais	30
3.5. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO	33
3.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES	35
3.6.1 Métodos de avaliação antioxidante	36
3.7 BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES	38
3.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	41
3.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i> e óleos essenciais	44
4 CONDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A - Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Plantas da Mata Atlântica	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas pelo homem para o tratamento de enfermidades é tão antiga quanto a própria história da humanidade. As práticas populares sobre o uso e eficácia das plantas com propriedades medicinais contribuem significativamente para a divulgação de suas propriedades terapêuticas, de modo que esses conhecimentos empíricos vão sendo passados para as próximas gerações mesmo sem o conhecimento de seus constituintes químicos. Na maioria dos países, principalmente nos países da América do Sul, as plantas são utilizadas como apoio a saúde primária e muitas vezes como único recurso (SILVA E FERNANDES JÚNIOR, 2010).

A utilização de plantas como alternativa medicinal no combate a diversas doenças é uma prática rotineira e a ciência vem estudando esses constituintes vegetais com o intuito de corroborar os conhecimentos populares com os científicos. Baseando-se nessa premissa, é possível estudar os componentes ativos dos vegetais e dessa maneira contribuir para o desenvolvimento de novas drogas (TRIBESS et al., 2014). Produtos de origem natural representam uma oportunidade de expansão ímpar para o mercado farmacêutico. A descoberta de novas moléculas com ações terapêuticas assegura a competitividade dessas indústrias principalmente pela possibilidade de novas patentes (VILLAS BÔAS E GADELHA, 2007).

Pesquisas relacionadas a produtos naturais ou terapias a base de vegetais tem ganhado destaque no cenário mundial, principalmente no Brasil, onde possui uma flora bastante diversificada, ou seja, rica em compostos bioativos (VIEIRA et al., 2010). Entretanto, apesar de toda a disponibilidade de recursos naturais, das 300 mil espécies de plantas existentes no mundo, calcula-se que apenas 15% tenham sido estudadas quanto ao seu potencial farmacológico e possível formulação medicamentosa (BRANDÃO et al., 2010). O desenvolvimento de fármacos oriundos de vegetais é um grande obstáculo enfrentado pelas indústrias farmacêuticas. Apesar dos grandes avanços conquistados pela química sintética, muitos dos compostos vegetais são formados por misturas complexas, o que torna sua obtenção laboratorial extremamente complicada (WALSH E FISCHBACH, 2010).

As plantas produzem inúmeros compostos orgânicos, dentre eles, destacam-se os óleos essenciais (OE's). Trata-se de uma combinação complexa de substâncias orgânicas, as quais são responsáveis pelas suas diferentes ações farmacológicas (REIS E JONES, 2017). Os OE's são amplamente utilizados por suas propriedades biológicas já conhecidas como, por

exemplo, antibacteriana (HALCÓN E MILKUS, 2004), antioxidante (TEIXEIRA et al., 2012) fungicida e inseticida (BAKKALI et al., 2008).

Muitas das espécies aromáticas como *Xylopia frutescens* (Annonaceae), *Campomanesia dichotoma* e *Eugenia umbrosa* (Myrtaceae) são produtoras de OE's, estes, são constituídos principalmente por nomo- e sesquiterpenos (FOURNIER, LEBOEUF E CAVÉ, 1999). Várias espécies da família Annonaceae são utilizadas por suas propriedades farmacológicas como antileishmania (LORENZO et al., 2016), anti-inflamatória e antimicrobiana (WOGUEM et al., 2014), antioxidante e antidiabética (FLORENCE et al., 2014), entre outras. O mesmo pode ser dito para a família Myrtaceae com destaque para potencial antimicrobiano (ALEKSIC E KNEZEVIC, 2014), antioxidante (CARVALHO JUNIOR et al., 2014) além da ação diurética e reguladora do sistema digestivo (SERAFIN et al., 2007). Ambas as famílias são abundantes na Mata Atlântica e devido às suas propriedades terapêuticas, são fontes de inúmeras biomoléculas.

Portanto, tendo em mãos todo o recurso biotecnológico que a Mata Atlântica oferece é imprescindível que estudos sejam realizados a fim de levantar dados acerca das atividades biológicas apresentada pelos metabólitos secundários dos vegetais presentes nesse domínio. Apesar de alguns estudos envolvendo as famílias supracitadas, pouco se conhece sobre o potencial antimicrobiano e antioxidante dos OE's de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. A investigação dessas atividades representa um passo substancial para transformar essas moléculas em produtos que despertem o interesse das indústrias farmacêuticas, o que causaria um impacto positivo do ponto de vista científico, social e econômico. O Brasil é privilegiado nesse sentido por dispor de matéria-prima diversificada, entretanto, a maior parte dessa riqueza biotecnológica permanece subutilizada e seu potencial desconhecido. Ademais, a própria Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia na promoção da saúde e publicou diretrizes, normas e estratégias para manipulação e elaboração de medicamentos de origem vegetal (AHMED E RAHMAN, 2016).

Estudos como estes demonstram a importância que as plantas possuem para os seres humanos. Esta dependência está pautada na saúde e bem estar que elas podem oferecer através de seus constituintes químicos. O conhecimento sobre os seus metabólitos e principalmente os seus efeitos farmacológicos, justificam a necessidade de investimentos que visem o desenvolvimento de produtos naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo investigar composição química e as atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de *Xylopiya frutescens* Aubl, *Campomanesia dichotoma* (O.Berg) Mattos e *Eugenia umbrosa* O.Berg crescidas no Domínio Atlântico em Pernambuco, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os OE's de folhas de *Xylopiya frutescens*, *Campomanesia dichotoma* e *Eugenia umbrosa*;
- Quantificar e identificar os compostos químicos dos OE's usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) e cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC/FID);
- Avaliar a atividade hemolítica dos OE's *in vitro*;
- Investigar a atividade antioxidante dos OE's por diferentes métodos *in vitro*;
- Determinar o perfil de resistência das cepas de *Staphylococcus aureus* para as diversas classes de antibióticos;
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* por ensaios de microdiluição em caldo;
- Verificar a cinética de morte inicial das cepas de *S. aureus* por ensaios de curva de crescimento.

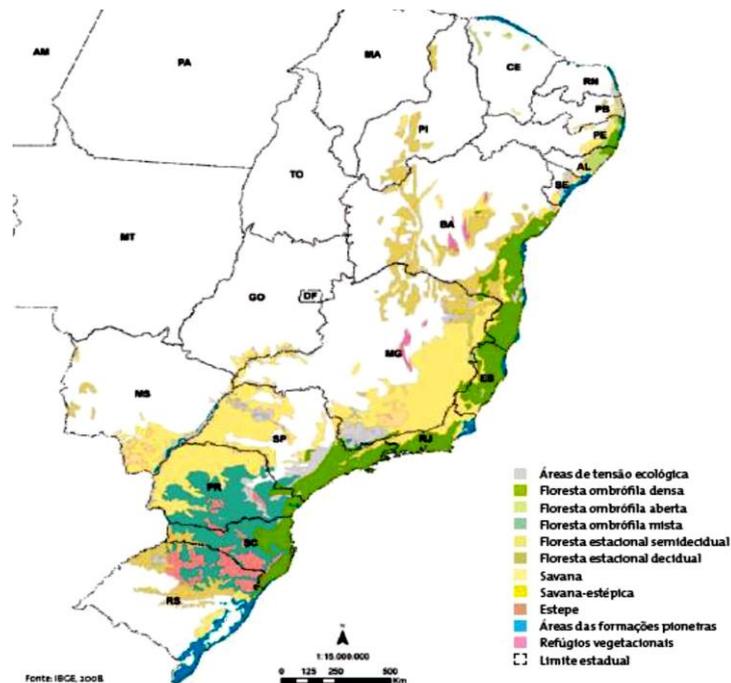
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MATA ATLÂNTICA

As florestas tropicais representam os maiores “hotspot” em biodiversidade do planeta. Sua vegetação está entre as mais diversas dentre os ecossistemas florestais da Terra (MURPHY; ANDERSEN; PARR, 2016). A Mata Atlântica é uma formação vegetal que está presente em grande parte da região litorânea brasileira. É uma das mais importantes florestas tropicais do mundo, apresentando uma rica biodiversidade (PEREIRA, 2009).

No início da colonização portuguesa no Brasil, a Mata Atlântica cobria uma área de 1.296.446 Km² correspondendo a aproximadamente 15% do território nacional e abrangendo total ou parcialmente 17 estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe (Figura 1). E desde então vem sofrendo com os sucessivos ciclos de exploração econômica, expansão urbana e a agroindústria que causa impacto à vegetação natural e reduz o território da Floresta Atlântica (STEHMANN et al., 2009).

Figura 1. Mapa do Brasil com a localização do Domínio Atlântico



Fonte: IBGE (2008).

Apesar das grandes mudanças ambientais, muitos são os esforços para manter os processos naturais e assegurar a biodiversidade nessas áreas. Aproximadamente 7% de todas as florestas tropicais e subtropicais são áreas estritamente protegidas (União Mundial para a Natureza - IUCN categorias I-IV) podendo chegar a aproximadamente 19% se contarmos com as reservas de uso múltiplo (IUCN categorias V-VI) (LAURANCE; SAYER; CASSMAN, 2013). Em 2016 foi realizado um levantamento pela Fundação SOS Mata Atlântica e o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), para verificar os Remanescentes Florestais e Áreas Naturais da Mata Atlântica e foi observado que apenas 12,4% da mata original encontra-se preservada (figura 2), o levantamento considerou áreas acima de 3 hectares (SOS MATA ATLANTICA – INPE, 2017). A taxa de desflorestamento identificada para os 17 estados de abrangência desse tipo de vegetação para os anos de 2015 a 2016 foi de 29,075 ha e comparando esses dados em relação a taxa de supressão da floresta nativa para os mesmos 17 estados no período de 2014-2015 foi observado um aumento de 57,7% na taxa de desmatamento (SOS MATA ATLANTICA – INPE, 2017).

Figura 2. Remanescentes florestais e Matas Naturais da Mata Atlântica



Legenda: verde claro = Domínio de Mata Atlântica; verde escuro = remanescente de Mata Atlântica.
 Fonte: SOS Mata Atlântica - INPE (2017).

Os maiores índices de desmatamento são observados nos estados do nordeste do Brasil, onde restam apenas de 1 a 2% da cobertura original, estando a maioria no sul do estado da Bahia (BRASIL, 2001). O maior percentual de Mata Atlântica ainda preservada do país (aproximadamente 60%) estar localizado no Estado de São Paulo (PEREIRA, 2009).

Um dos fatores que contribui para a fragmentação das florestas é o rápido crescimento populacional o que exige uma demanda por alimentos e, conseqüentemente, a mata vai perdendo espaço para a agricultura (SFAIR et al., 2016). Outros fatores também contribuem para essa redução florestal como a mineração, extração seletiva, incêndios, degradação da floresta remanescente através da caça, etc. Boa parte desses elementos é impulsionada por fatores socioeconômicos, seja ele local ou gerido por multinacionais de forma legal ou ilegalmente (LEWIS; EDWARDS; GALBRAITH, 2015). Nos últimos anos, as ecozonas (regiões biogeográficas com fronteiras naturais) da floresta tropical perderam 32% da cobertura natural, boa parte dessa perda ocorreu nas florestas tropicais da América do Sul em decorrência do desmatamento (HANSEN et al., 2013).

Ainda de acordo com o MMA (2010), apesar da sua redução e fragmentação, a Mata Atlântica possui uma rica biodiversidade com cerca de 20.000 espécies de plantas, que equivale a 36% das espécies vegetais existentes no Brasil. A riqueza vegetal da Mata Atlântica conta com cerca de 840 espécies de briófitas, distribuídas em 116 gêneros e 33 famílias, o que representa 6,4% da diversidade mundial, estimada em 13.000 espécies. Desse total, a região Nordeste possui em torno de 400 espécies. Quanto às gimnospermas, são encontradas apenas quatro espécies e três gêneros: *Araucaria*, *Podocarpus* e *Ephedra*. O gênero *Araucaria* aparece unicamente representado por *Araucaria angustifolia*, o pinheiro-do-paraná, espécie endêmica da Floresta Atlântica e certamente uma das mais importantes, tanto como elemento na paisagem, quanto pela sua relevância econômica (STEHMANN et al., 2009). Estudos realizados por Myers et al. (2000), estimou que o Domínio Atlântico possui em torno de 20 mil espécies de plantas vasculares, sendo 40% deste total, endêmicas. O alto grau de endemismo no Domínio Atlântico deve-se a sua extensão latitudinal e topografia que resultam em grandes variações climáticas, principalmente em relação aos índices pluviais (AMORIM; ALVES, 2012).

Apesar de novas espécies serem descobertas a cada ano, ainda assim, o conhecimento a cerca da flora atlântica é insuficiente. Nos últimos 20 anos, mais de 1.000 novas espécies só de angiospermas foram descobertas na Mata Atlântica, o que representa 42% do total de espécies descritas para o Brasil no mesmo período (STEHMANN et al., 2009). Entretanto,

várias dessas espécies vegetais encontram-se em risco de extinção, e a começar pelo pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), já existem 276 espécies vegetais da Mata Atlântica na lista oficial de espécies ameaçadas, entre elas o palmito juçara (*Euterpe edulis*), a araucária (*A. angustifolia*) e várias orquídeas e bromélias. Isso é alarmante, visto que, esse ecossistema apresenta uma alta taxa de endemismo e sua perda põe em risco um imenso patrimônio genético e farmacológico.

A conservação da Mata Atlântica se fundamenta tanto pela razão social quanto econômica. A sobrevivência de muitas famílias que habitam essas florestas tropicais depende da exploração e manejo dos recursos naturais oferecidos por esse ecossistema. Recursos esses, que são utilizados tanto para alimentação quanto para o uso medicinal (PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006; WINGFIELD et al., 2015). Além do mais, esse patrimônio biológico é fonte de inúmeras biomoléculas que podem ser usadas como matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos ou ainda em estudos ecológicos, de conservação, entre outros.

No Brasil, é cada vez mais comum o cultivo doméstico de plantas medicinais e pelo menos 80% da população utiliza algum tipo de planta com essa finalidade. Contudo, as florestas tropicais encontram-se cada vez mais reduzidas a fragmentos. Fatores como a expansão agrícola e o intenso uso da terra contribuem com as mudanças drásticas que este ambiente vem sofrendo ao longo dos anos (MORANTE-FILHO et al., 2016). Esses elementos alteram a dinâmica e favorecem a perda da biodiversidade. Esta última, ainda consegue manter-se graças ao poder de regeneração desses fragmentos (GROENEVELD et al., 2009).

3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae está presente em diversos biomas brasileiros e se destaca pela riqueza e diversidade florística no Domínio Atlântico. Esta família corresponde à nona posição no ranking das maiores famílias de plantas com flores que incluem árvores e arbustos (AMORIM; ALVES, 2011). O centro de diversidade da família se encontra nos trópicos, particularmente na América do Sul, Austrália e Ásia tropical, distribuídas em 133 gêneros e 5.671 espécies. No Brasil, estão entre as maiores famílias botânicas representadas por 23 gêneros e 1.034 espécies distribuídos em todas as regiões e formações vegetais do país (CASCAES et al., 2015). A família é excepcionalmente abundante na Mata Atlântica correspondendo a aproximadamente 15% do total de espécies de árvores presentes nas florestas úmidas e cerrados do leste brasileiro (LUCAS et al., 2007; PROENÇA et al., 2014).

A família pode ser reconhecida pela presença de glândulas de óleo nas folhas, ovários semi-inferior, flores polistêmones geralmente com numerosos estames e floema interno. Na nova classificação, a família foi dividida em duas subfamílias, o Psiloxylloidea (com duas tribos) e Myrtoideae (com 15 tribos). São plantas aromáticas e frutíferas, muito importante para preservação da fauna, pois é fonte de alimento para inúmeros animais (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Várias espécies vegetais dessa família têm sido amplamente utilizadas em diversas patologias. Dentre as propriedades farmacológicas apresentadas por esse grupo destacam-se as propriedades antimicrobianas (HALCÓN; MILKUS, 2004), citotóxica (YOO et al., 2005), analgésicas (PAULA et al., 2010), inseticidas (BAKAR et al., 2012) e antioxidantes (CARVALHO JUNIOR et al., 2014).

Myrtaceae se destaca dentre as famílias botânicas por apresentar um grande número de espécies que são utilizadas como alimento de importância econômica merecendo destaque a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) e a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) que representam uma pequena fração do potencial econômico da família (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006). Os frutos produzidos pelas inúmeras espécies da família podem ser comercializados in natura ou recebem processo industrial antes de ser consumido. Além da importância alimentícia alguns representantes apresentam também propriedades medicinais como é o caso de *Psidium guajava* (goiaba), onde diferentes partes da planta são utilizadas como antidiarreicos, anti-inflamatório e antidiabéticos (FLORES et al., 2014). Outras espécies como *Eugenia brasiliensis* têm suas folhas usadas como antirreumáticas (DONATO; MORRETES, 2007), as sementes e folhas de *Eugenia jambolana* são usadas como agente antidiabético (RAMOS et al., 2006). *Psidium cattleianum* (goiaba amarela) e *Eugenia pyriformis* (uvaia) também são usadas comumente na medicina popular e podem ser cultivadas em horta. Essa prática viabiliza a exploração econômica, uma vez que o rendimento é alto e os custos com implantação e manutenção são baixos (PEREIRA et al., 2012). Algumas espécies são importantes pelo seu valor econômico como é o caso de *Eucalyptus spp.* (TRUGILHO et al., 2003).

Atualmente, os estudos realizados com Myrtaceae tem foco nos seus constituintes voláteis (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011), ou seja, nos óleos essenciais.

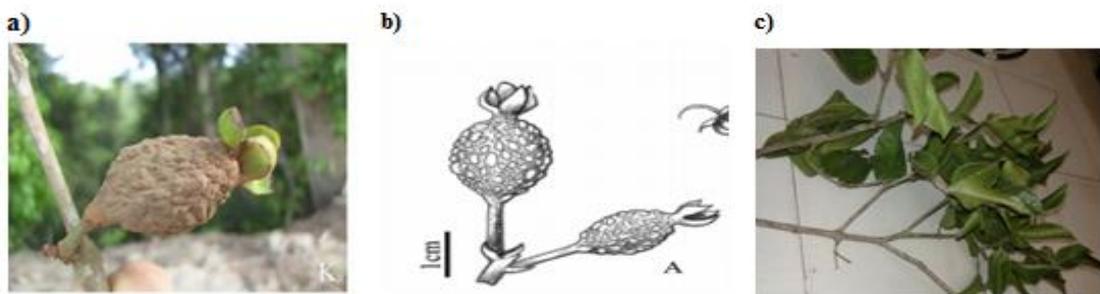
3.2.1 *Eugenia umbrosa*

Conhecida popularmente como Araçá-branco, *Eugenia umbrosa* (figura 3) é um espécime (3-7 m de altura) encontrada na Mata Atlântica pertencente à família Myrtaceae.

O gênero *Eugenia* está distribuído através de porções tropicais e subtropicais nas Américas, na África Subsaariana, Madagascar e ilhas Mascarenhas, no sul da Ásia, Malásia, Austrália e Ilhas do Pacífico e inclui cerca de 1.070 espécies já descritas (AMORIM; ALVES, 2012b). *Eugenia* é o gênero mais expressivo da família na América do Sul, representado por 822 espécies distribuídas principalmente no Brasil. Das 378 espécies conhecidas para o país, 313 são endêmicas sendo que desse total, 200 são endêmicas da Mata Atlântica brasileira, particularmente para o Estado da Bahia onde se concentra cerca de 90% da diversidade do gênero (AMORIM; ALVES, 2015). *E.umbrosa* é uma planta endêmica da Mata Atlântica (SOBRAL et al. 2009) e são encontradas desde o Nordeste até a região Sudeste do Brasil.

Em Pernambuco, *E.umbrosa* pode ser encontrada na Usina São José (USJ) no município de Igarassu. Esse complexo formado por fragmentos de Mata Atlântica funciona desde 2001 com a finalidade de proporcionar estudos sobre a diversidade, biologia e possíveis aplicações biotecnológicas dos recursos vegetais (MELO et al., 2011).

Figura 3: Espécie *Eugenia umbrosa*.



Legenda: (a -b) fruto de *E. umbrosa*; c) folhas e galhos de *E. umbrosa*. Fonte: (a-b) Amorim e Alves (2012); (c) Barbosa (2017).

3.2.2 *Campomanesia dichotoma*

Campomanesia dichotoma pertence à família Myrtaceae é uma espécie endêmica da Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2009), distribuída nas regiões Nordeste e Sudeste. Apresenta-se sob a forma de arbusto ou árvore que pode medir até 20 metros de altura, com

folhas elípticas, estames numerosos e fruto com cerca de 1cm (Figura 4). Floresce de novembro a fevereiro, e frutifica de dezembro a maio. Popularmente conhecida como guabiroba, guabiraba-branca e mangabinha-de-veado (LANDIM; LANDRUM, 2002).

Campomanesia é considerado um dos gêneros mais bem definidos da família Myrtaceae e pertence à subtribo Myrtinae. Seus representantes constituem cerca de 40 espécies distribuídas na América do Sul. No Brasil, a maior diversidade genérica encontra-se na Bahia com 16 táxons ocorrendo principalmente em áreas de floresta, cerrado, caatinga e restinga (OLIVEIRA; FUNCH; LANDRUM, 2012).

Figura 4: Espécie *Campomanesia dichotoma*



Legenda: (A) folha seca de *C. dichotoma*; (B) detalhes (nervuras) das folhas de *C. dichotoma*; Fonte: (A) Barbosa (2017); (B) Amorim e Alves (2012).

3.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae foi descrita pela primeira vez em 1789 e constitui uma família primitiva pertencente à ordem Magnoliales (HUTCHINSON, 1973; CRONQUIST, 1981). Já são descritas para essa família cerca de 2.400 espécies distribuídas em 108 gêneros. Estão entre as famílias mais diversas presentes nas florestas tropicais em termos de riqueza de espécies e abundância de indivíduos (CHATROU et al., 2012).

Dados filogenéticos mostra que Annonaceae corresponde às primeiras angiospermas divergentes e por isso são tão estudadas tanto do ponto de vista taxonômico quanto evolutivo (LARRANAGA; HORMAZA, 2015). A família se caracteriza pela presença de alcaloides, flavonoides e terpenóides (SILVA et al., 2009). Dentre as propriedades farmacológicas podemos destacar a ação antimicrobiana (TAKAHASHI et al., 2006), citotóxica (THUY et al., 2012), antioxidante e antidiabética (FLORENCE et al., 2014), antitumoral (GAVAMUKULYA et al., 2014) e anti-leishmania (LORENZO et al., 2016).

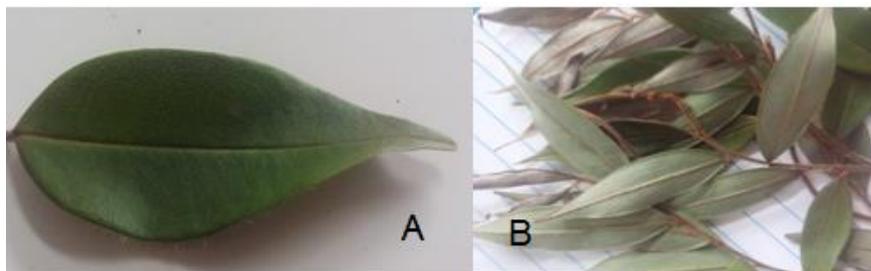
Algumas espécies bem conhecidas pelo homem como o mamão e a graviola, são usadas como alimento e também como remédio popular e na medicina tradicional. Nos Estados Unidos, cápsulas contendo extrato de graviola e mamão encontra-se disponíveis como suplementos alimentares, além de fornecer efeito anticancerígeno (HÖLLERHAGE et al., 2015).

3.3.1 *Xylopi frutescens*

Xylopi frutescens Aubl. (Figura 5) é uma árvore conhecida popularmente como “embira”, "ou “embira-vermelha” e pertence à família Annonaceae, subfamília Annonoideae e a tribo Xylopieae (KHAIRUNISSA et al., 2012). É usada na medicina popular no tratamento de reumatismo, inflamação e no combate a diarreia (SOUZA et al., 2015). Análises fitoquímicas identificou a presença de ácido caurenóico, um diterpeno presente nas sementes desta espécie, que apresenta ação anti-inflamatória, analgésica e diurética (SOMOVA et al., 2001). Além do mais, estudos farmacológicos atribuem outras atividades relacionadas a *X. frutescens* como anti-tripanosossoma (SILVA et al., 2013) e antitumoral (FERRAZ et al., 2013). Outra espécie do mesmo gênero, *X. parviflora* já é bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de infertilidade e sua casca como analgésico e antiespasmódico (NISHIYAMA et al., 2006).

Alguns compostos bioativos podem ser encontrados nas espécies de *Xylopi* tais como alcalóides, acetogeninas e terpenos, além da produção óleos essenciais (FOURNIER; LEBOEUF; CAVÉ, 1999; WOGUEM et al., 2014).

Figura 5: Folhas de *Xylopi frutescens*



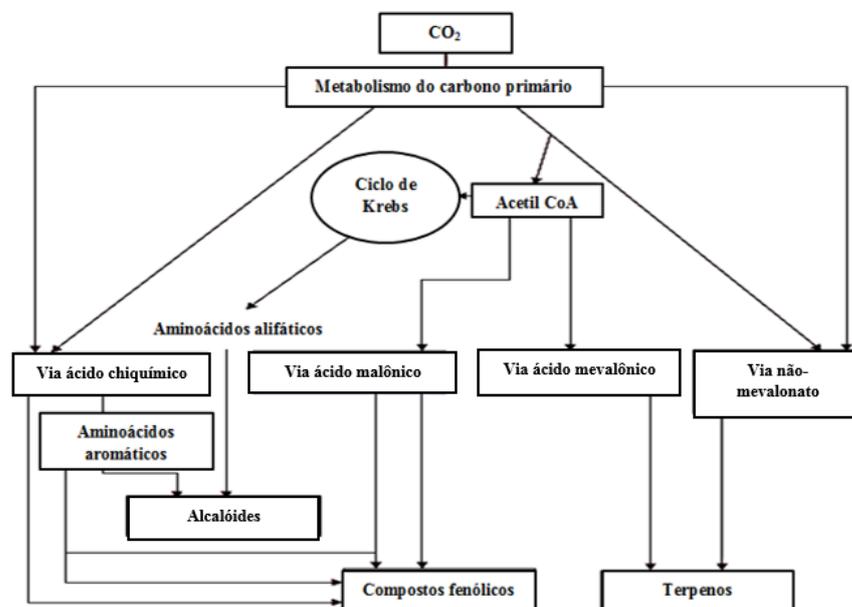
Legenda: (A) folha fresca de *X. frutescens* (B) folhas e galhos de *X. frutescens*. Fonte: Barbosa (2017).

3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem diversos compostos químicos importantes para sua manutenção e sobrevivência. De fato, os compostos bioativos de plantas são oriundos do seu metabolismo secundário. Os compostos biológicos conhecidos podem ser classificados em duas áreas: primários e secundários. Os metabólitos primários que são compostos importantes para o crescimento e desenvolvimento tais como os aminoácidos, proteínas e carboidratos. Já os metabólitos secundários são aqueles cuja função pode está relacionada à reprodução e defesa contra herbivoria, ataque de patógenos ou em resposta ao estresse (AZMIR et al., 2013). No entanto, a sua produção está relacionada às necessidades específicas de cada espécie. Os compostos oriundos do metabolismo secundário não são distribuídos universalmente entre as plantas, por não serem necessários a todas elas (PERES, 2004). Todavia, podem ser utilizados em estudos de diferenciação, diversidade, taxonomia e bioquímica (GURIB-FAKIM, 2006).

Os principais metabólitos secundários, de acordo com a sua natureza química, podem ser agrupados em alcalóides, fenóis e terpenos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000) e são sintetizados por quatro vias diferentes (Figura 6): a via do ácido chiquímico sintetiza os alcalóides e os compostos fenólicos; a via do ácido malônico promove a síntese dos compostos fenólicos; a via do ácido mevalônico e a via do não-mevalonato são responsáveis pela produção dos terpenos (AZMIR et al., 2013).

Figura 6: As principais vias do metabolismo secundário



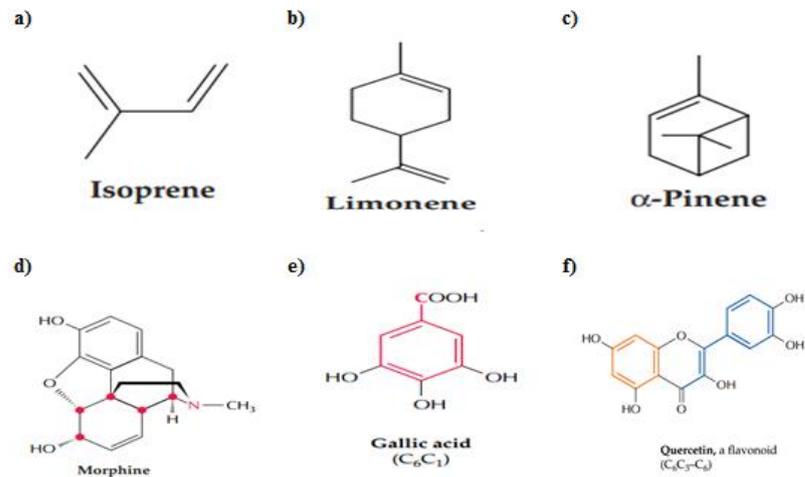
Fonte: Barbosa (2017), adaptado de Azmir et al., (2013).

Já foram isolados cerca de cinquenta e cinco mil terpenóides, aproximadamente doze mil tipos de alcalóides e cerca de oito mil compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os terpenóides (ou isoprenóides) são os mais variados tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional (figura 7 a - c). São polímeros formados por unidades de isopreno ou isopentenilpirofosfato (IPP) e sua classificação baseia-se na sua estrutura: isoprenos ou hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos ou carotenos (C40) e os politerpenos (mais de 40C) (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014).

Os alcalóides são substâncias de baixo peso molecular que apresenta um átomo de nitrogênio na sua estrutura básica sendo originados a partir de aminoácidos (ornitina, lisina, tirosina e triptofano). Nas plantas, são importantes por desempenhar um papel fundamental na proteção, germinação e promoção do crescimento (GURIB-FAKIM, 2006). Um dos primeiros alcalóides isolado de planta com ação farmacológica foi a morfina (Figura 7- d), obtida da semente de papoula (*Papaver somniferum*). Esse feito deu início às inúmeras pesquisas com plantas que a partir de então passaram a ser vistas pelas indústrias farmacêuticas motivadas pela possibilidade de isolar, purificar ou até mesmo sintetizar moléculas naturais (LI; VEDERAS, 2009).

Já os compostos fenólicos podem ser encontrados em todas as partes da planta, podendo ser moléculas estruturalmente simples, como os ácidos fenólicos, ou altamente ramificados, como os taninos (Figura 7 e - f) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). São os responsáveis pela cor, aroma e sabor, proteção contra patógenos e atuam como compostos de defesa aos estresses ambientais (PERES, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

Figura 7: Exemplos de terpenóides, alcalóide e compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário de plantas.



Fonte: Croteau,; Kutchan; Lewis (2000).

Diversos metabólitos secundários são estudados com o intuito de confirmar se a sua presença tem relação com as atividades biológicas apresentadas pelas plantas. Um estudo realizado por Fabani e colaboradores (2013), relacionou a alta atividade antioxidante de *Pistacia vera* L., (pistache), ao seu teor de compostos fenólicos como: ácido gálico, miricetina, isoquercitrina e um dímero de protocianidina. Outro estudo realizado por Silva et al., (2013), relacionou a ação antimicrobiana de diversos frutos à presença de compostos fenólicos.

3.4.1 Óleos essenciais

De acordo com Bakkali et al., (2008), os óleos essenciais (OE's) são compostos complexos, naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor e podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas. São armazenados em células secretoras, cavidades, canais ou tricomas glandulares. Trata-se de uma mistura de vários compostos químicos e possui natureza lipofílica (PRAKASH et al., 2015). Sua composição, quantidade e localização variam de espécie para espécie. A composição química e a atividade biológica dos óleos essenciais dependem, sobretudo, de fatores genéticos e ambientais (SHIWAKOTI et al., 2016).

Os OE's são muito estáveis, principalmente ao ar, calor, luz, umidade e metais. Seus constituintes variam de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, cumarinas, entre outros. Esses óleos podem ser formados por cem ou mais compostos orgânicos, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos (terpenóides) os compostos mais frequentes (CASTRO et al., 2010). Esses últimos são os responsáveis pela utilização das plantas para uso medicinal, culinários e na perfumaria (DORMAN; DEANS, 2000).

Os OE's podem ser encontrados em diversas famílias botânicas tipicamente aromáticas tais como: Myrtaceae, Annonaceae, Lamiaceae, Anacardiaceae, Verbenaceae e Euphorbiaceae. Eles são responsáveis pelo odor e sabor característicos das plantas, além de estarem relacionados com a atração de polinizadores e a proteção contra patógenos (LIMA et al., 2003). Seus constituintes majoritários estão relacionados, em sua maioria, com as atividades biológicas, entretanto, alguns estudos sugerem que estes trabalhem em sinergia com os compostos minoritários (PEREIRA et al., 2014). A quantidade dos componentes presentes nos óleos varia substancialmente, tendo os compostos majoritários constituindo até 85% dos óleos enquanto os demais se encontram em pequenas proporções ou vestigiais (MIGUEL, 2010).

O Brasil junto com a Índia, China e Indonésia são os maiores produtores de OE's do mundo. Esse status deve-se aos OE's dos cítricos obtidos como um subproduto da produção de sucos. Os OE's são produtos de grande importância para as indústrias cosmética, farmacêutica, perfumaria e alimentícia sendo empregados como aromas, fragrâncias (ou fixadores), composições medicamentosas (na forma bruta ou melhorada) ou substâncias purificadas como limoneno, citral, eugenol, mentol, entre outros (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009) (tabela 1).

Tabela 1: Os principais óleos no mercado mundial.

Óleo essencial	Espécie	Família	Principais constituintes	Principais aplicações
Árvore do chá (Australia)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtaceae	Terpinen-4-ol	Antifúngico, antimicrobiano, cicatrizante e anti-inflamatória.
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	Limoneno	Cicatrizante e inseticida.
Menta japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i>	Lamiaceae	Mentol	Anestésico e analgésico
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	Cineol	Produtos de higiene bucal e antimicrobiano.
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowit	Poaceae	Citronelal e Geraniol	Calmante, relaxante e rejuvenescedor.
Hortelã pimenta	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	Mentol	Perfumaria
Limão	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	Limoneno	Broncolítico e antimicrobiano
Eucalipto (tipo citronela)	<i>E. citriodora</i>	Myrtaceae	Citronelal	Perfumaria.
Cravo-da índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	Eugenol e Cariofileno	Antimicrobiano e aromatizante na Indústria alimentícia
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i>	Pinaceae	Cedrol	Adstringente e repelente.
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Rutaceae	Limoneno	Adstringente e antisséptico
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i>	Lamiaceae	Carvona e Mentona	Antisséptico, antioxidante e antimicrobiano.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i>	Pinaceae	Cedrol	Bactericida e cicatrizante.
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i>	Lamiaceae	Linalol e Cânfora	Perfumaria, antisséptico, repelente e produtos de limpeza, antiviral, antiespasmódicos, etc.
Sassafrás (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i>	Lauraceae	Safrol	Antifúngico.
Cânfora	<i>Cinnamomum canphora</i>	Lauraceae	Linalol	Perfumaria e relaxante muscular.
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	Linalol, Citronelol e Geraniol	Culinária, analgésico e Antirreumático.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	Rutaceae	limoneno	Culinária, Cosmética e descongestionante.
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	Lamiaceae	Patchoulol e Pogostol	
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Lauraceae	Eugenol	Antifúngico, antimicrobiano e antiespasmódica.
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Ácido rosmarínico	Afecções hepática, intestinal, renal e respiratória. Antifúngico.

Pau rosa (Brasil)	<i>Aniba roseaodora var amazonica</i> Ducke	Lauraceae	Linalol	Perfumaria.
Capim limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Citral	Antimicrobiano e indústria alimentícia.
Rosa	<i>Rosa spp.</i>	Rosaceae	Citronelol, Geraniol e Linalol	Perfumaria e cosmética.
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i> Miller	Lamiaceae	Linalol	Perfumaria e Aromaterapia.

Fonte: Barbosa (2017). Adaptado de Bizzo; Hovell; Rezende (2009); Marques (2001); Zanusso-Junior et al (2011); Cunha; Roque; Nogueira (2012).

Seu uso medicinal no tratamento de diversas doenças vem contribuindo cada vez mais com estudos de suas propriedades terapêuticas (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Os OE's já são o foco de diversas pesquisas devido as suas propriedades biológicas, como ação antifúngica, antioxidante e antimicrobiana. Relatos de que os antioxidantes sintéticos, largamente utilizados pela indústria alimentícia, podem induzir o desenvolvimento de células cancerígenas, tem contribuído com o crescente interesse em desenvolver novos produtos de origem natural com as mesmas propriedades farmacológicas. (TEIXEIRA et al., 2012). O crescente número de bactérias multirresistentes também incentiva as pesquisas com OE, por exemplo, o OE da árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*) é reconhecido por possuir ação antibacteriana. Testes *in vitro* demonstraram que seus componentes são capazes de matar ou inibir o crescimento bacteriano (HALCÓN; MILKUS, 2004; STEA; BERAUDI; DE PASQUALE, 2014).

3.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

As florestas estão perdendo cada vez mais sua área de abrangência, seja por fatores naturais ou antrópicos. Esses ecossistemas estão sendo reduzidos drasticamente, principalmente aqueles localizados próximos às populações humanas onde são continuamente submetidos a diferentes estresses. Essa constante perturbação pode provocar um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) provocando um desequilíbrio e permitindo que as células da planta entrem em um estado conhecido como estresse oxidativo (BRANDÃO et al., 2017). As plantas retomam o equilíbrio controlando a eliminação das ERO's através de agentes antioxidantes. O grau de tolerância varia de espécie para espécie e de acordo com a eficiência de cada indivíduo em eliminar esses agentes agressores (SHARMA et al., 2012).

A produção de ERO's é um estado comum aos organismos aeróbicos em decorrência do metabolismo celular (MARTINS, 2012). Nos seres vivos, as ERO's e as espécies reativas de nitrogênio (ERN's) são geradas normalmente durante os processos metabólicos e são estritamente regulados por diferentes mecanismos antioxidantes (SEN et al., 2013). Acredita-se que as mitocôndrias sejam as responsáveis pelo estresse oxidativo devido a sua necessidade de oxigênio para a produção de energia.

As ERO's são radicais livres oriundos do O_2 . Estima-se que aproximadamente 1% do O_2 consumido é desviado para a sua produção. As ERO's por sua vez, a depender da concentração, podem causar danos ou benefícios. Quando em alta concentração, podem causar agressões as biomoléculas, enquanto em baixa / moderada concentração, atuam como segundo mensageiro na cascata de sinalização intracelular das células vegetais (SHARMA et al., 2012). O H_2O_2 , por exemplo, está envolvido em muitos mecanismos de resistência das plantas, inclusive atua como mensageiro secundário na cascata de transdução de sinais na ativação de genes de defesa e de proteção celular (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

As ERO's podem ser provenientes de fontes endógenas ou exógenas e as mais conhecidas são o radical superóxido ($O_2\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxila ($ROO\bullet$) e radical hidroxila ($HO\bullet$). Esses radicais têm função importante nas diversas reações biológicas no organismo (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006; SEN et al., 2013).

Os mecanismos de oxidação e redução são fundamentais para a sobrevivência das células, principalmente para produção de energia e síntese de biomoléculas importantes. Entretanto, os radicais produzidos por esses mecanismos, quando em excesso, podem acarretar sérios danos, e nas células humanas pode contribuir com o desenvolvimento de diversas doenças, como câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares (ALVES; DAVID, 2009; TABARAKI et al., 2013), doenças neurodegenerativas, dentre outras (MANOHARAN, et al., 2016).

Os efeitos causados pelas ERO's nas biomoléculas, além de colaborar com inúmeros processos patológicos, podem ser tóxicos aos componentes celulares (FRIZZO et al, 2008). Uma superprodução de ERO's associada a falhas no sistema antioxidante pode levar ao estresse oxidativo causando danos importantes para os sistemas vivos (ISLAM, 2016). Os radicais livres são capazes de oxidar biomoléculas importantes como as proteínas, causar danos ao DNA e peroxidação lipídica o que pode levar a alterações mutagênicas, danos aos tecidos e morte celular (SEN et al., 2013). Quando as células estão em estresse oxidativo,

produzem marcadores biológicos que são capazes de identificar os danos causados pelas ERO's no organismo. A presença do marcador malondialdeído, por exemplo, fornece um índice indireto de lesões oxidativas resultante da peroxidação lipídica (SOUZA JR; OLIVEIRA; PEREIRA, 2005; GROTO et al, 2008). Os marcadores são oriundos da oxidação lipídica, proteica ou de DNA (MORI et al., 2015).

Alguns organismos como as bactérias, se adaptam as ERO's controlando a expressão gênica relacionada ao sistema antioxidante, reparo de DNA e proteínas de manutenção da homeostase. Esses elementos são coordenados de modo geral por fatores transcricionais que regulam genes específicos e que na presença de agentes tóxicos, podem ter um aumento significativo de sua expressão (MARTINS, 2012). Assim, o sistema antioxidante coordena as atividades das enzimas e proteínas com o intuito de combater o estresse mantendo a homeostase e o estado redox da célula.

3.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são moléculas extremamente instáveis que possuem um elétron desemparelhado em sua órbita externa, gravitando em sentido oposto aos demais elétrons. São moléculas altamente reativas que para se estabilizar sequestram elétrons de estruturas muito frágeis, ou seja, estruturas que doam seus elétrons com muita facilidade como os componentes celulares (RUFINO et al., 2007; VANZIN; PIRES, 2011).

Os antioxidantes são compostos que protegem o sistema biológico contra os efeitos nocivos das reações oxidativas. Podem ser sintéticos ou naturais. Dentre os antioxidantes sintéticos mais conhecidos podemos destacar: o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ). Estes são comumente utilizados pelas indústrias alimentícias para impedir a deterioração oxidativa dos alimentos. Entretanto, os mesmos podem ser prejudicial à saúde devido a propriedades carcinogênicas relatadas para os antioxidantes sintéticos (ALVES et al., 2007), reforçando a importância da busca por compostos antioxidantes de fontes naturais.

Os antioxidantes naturais podem ser agrupados em classes de acordo com sua atividade enzimática e não-enzimática e quanto ao modo de ação podendo ser primários ou secundários (COTINGUIBA et al., 2013). Segundo os autores, os antioxidantes enzimáticos são aqueles capazes de impedir ou dificultar a iniciação da oxidação enquanto os não-enzimáticos interatuam com os radicais livres e são consumidos durante a reação. Em relação ao modo de

ação, os antioxidantes primários agem através da doação de elétrons aos radicais livres convertendo-os em moléculas estáveis. Já os antioxidantes secundários trabalham de forma a retardar as etapas de iniciação da auto-oxidação (AZEVEDO et al., 2011). Ou seja, os antioxidantes agem inibindo ou eliminando os radicais livres.

As defesas antioxidantes enzimáticas consistem na atividade da superóxido dismutase (Sod), glutaciona peroxidase/ redutase (GSH-PX/ GSHRd) e catalase (Cat). Essas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Os antioxidantes não enzimáticos podem se agregar a compostos produzidos pelo organismo como a glutaciona, ubiquinona e o ácido úrico, ou podem ser provenientes da dieta tais como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides (FRANÇA et al., 2013). Estes antioxidantes são produzidos naturalmente pelo nosso organismo, porém a taxa de produção decai com o envelhecimento, necessitando de consumo exógeno (RUFINO et al., 2007; MALINOWSKI, 2010). Moléculas tais como as vitaminas, enzimas, Fe^{2+} entre outras, também podem atuar como antioxidantes, ou seja, são capazes de neutralizar a ação dos radicais livres desempenhando um papel importante na manutenção da saúde do organismo ao proteger as células dos danos oxidativos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Podem ser encontrados na natureza em grupos de metabólitos como nos compostos fenólicos, flavonóides e taninos, e nos óleos essenciais também são relatadas atividades antioxidantes, principalmente os ricos em compostos fenólicos como o carvacrol, eugenol e timol, pela presença de um grupamento doador de elétrons na posição orto em relação a hidroxila fenólica (BOSCARDIN, 2009; SOUZA; FERREIRA, 2010).

3.6.1 Métodos de Avaliação Antioxidante

Os agentes antioxidantes têm a função de capturar os radicais livres antes que estes causem algum dano às moléculas biológicas. Eles atuam por doação de hidrogênio ou elétrons ou por transferência de prótons com a finalidade de produzir um composto estável. O índice dessas reações é determinado primeiramente pela propriedade redox, tal como energia de ligação de dissociação e o potencial de ionização do antioxidante (NIKI, 2010). Diferentes metodologias *in vitro* são já bem estabelecidas para testar a atividade antioxidante de amostras complexas. Os ensaios baseiam-se na capacidade de captura de radicais livres de

compostos antioxidantes (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Estão listados abaixo alguns métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

- *Método DPPH*

O método de DPPH é um ensaio amplamente utilizado para determinar a ação antioxidante. A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um radical livre estável que possui uma coloração purpura absorvendo a um comprimento de onda de 516 nm (BORGES et al, 2011). O método se baseia na capacidade de um composto antioxidante em sequestrar a molécula de DPPH reduzindo-o a hidrazina. Quando isso acontece, ocorre uma mudança na coloração para amarelo pálido. Este ensaio é considerado o mais fácil, rápido e reprodutível para determinação da atividade antioxidante seja de extratos vegetais ou substâncias puras.

- *Método ABTS*

Já o ABTS•+ (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) é um radical livre estável de coloração verde. Ele é solúvel em água e em álcool, sendo utilizado o comprimento de onda 734 nm para sua leitura em espectrofotômetro. Seus resultados também se baseiam na redução da intensidade de absorbância na presença da amostra, que é expressa em porcentagem, com atividade antioxidante sendo registrada depois de 6 min de incubação (KHLEBNIKOV et al., 2007; NIKI, 2010). De modo geral, o radical catiônico ABTS (ABTS • +) forma-se pela perda de um átomo de nitrogênio do ABTS que na presença de um agente antioxidante (doador de hidrogênio), o átomo de nitrogênio anula o de hidrogênio provocando a mudança de cor da solução (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011).

- *Atividade Antioxidante Total (ATT)*

Atividade Antioxidante Total - ATT- busca medir a capacidade de eliminação (“sequestro”) de radicais livres contidos em uma determinada amostra teste, por antioxidantes. Frequentemente, o Ácido Ascórbico (AA) é usado como composto de referência e a capacidade total é expressa em relação ao AA, considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante. Porém, alguns autores também utilizam Trolox como referência (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Esse método (também conhecido como método do fosfomolibdênio) baseia-se na oxidação num complexo azul de fosfomolibdênio pela adição de nitrito (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

- *Peroxidação Lipídica*

A peroxidação de lipídios corresponde a uma reação que ocorre em ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas celulares. Essa reação produz radicais livres que podem interferir na permeabilidade, fluidez e integridade das membranas (FRANÇA et al., 2013). O método consiste na medição da quantidade de hidroperóxidos de lipídeos (LOOH) formados nas fases iniciais de oxidação lipídica utilizando o ácido linoleico como substrato dessa oxidação. A oxidação do ferro, induzida pela presença de LOOH, a partir de um complexo Fe(II)-Tiocianato a um complexo Fe(III)-Tiocianato resulta numa intensa cor vermelha no fim. O ponto final da reação é a saturação do cromóforo - Fe(III)-Tiocianato detectado por espectrometria a 500 nm. Isto ocorre normalmente entre 7-10 dias após a reação inicial (KENNY; BRUNTON; SMYTH, 2015). A taxa de peroxidação é medida diariamente em espectrofotômetro a 500 nm até os controles atingirem absorvância máxima. Na presença de um antioxidante, a oxidação de lipídeos fica impedida e o ponto final da reação com o cloreto férrico é inibida.

3.7 BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

As bactérias podem ser encontradas no solo, ar, água, no exterior e/ou interior de outros seres vivos, fazendo parte da microbiota natural do corpo. O nicho desses seres vivos corresponde às suas funções no habitat e características de adaptação às diversas condições ambientais. Cada espécie apresenta suas particularidades nutricionais, propriedades cinéticas e bioquímicas distintas (BOSSOLAN, 2002). As diferentes condições do ambiente podem afetar direta ou indiretamente o estado fisiológico de um organismo, alterando o seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento. E como os microrganismos não apresentam defesas físicas, precisam desenvolver continuamente estratégias adaptativas que possam garantir sua sobrevivência.

Dentre as características que possibilitam essa ampla distribuição no ambiente pode ser destacada o tamanho muito reduzido, que favorece uma grande capacidade de dispersão; a diversidade metabólica e fisiológica, que permite melhor adaptação e tolerância às condições ambientais desfavoráveis; e sua grande capacidade de transferência horizontal de genes (THG), esse é um mecanismo bastante conhecido em procariotos (WIJAYAWARDENA; MINCHELLA; DEWOODY, 2013) que possibilita a recombinação de caracteres positivos, bem como permite adaptação por um longo período de tempo (LAWRENCE, 2002). Neste

contexto, as variações ambientais e temporais impulsionam para a evolução de microrganismos e aquisição de novos genes, por meio de elementos genéticos móveis. Esses elementos são chamados plasmídeos e podem ser transferidos entre bactérias através do processo de conjugação levando ao surgimento de cepas multirresistentes (DAMASCENO 2010). A transferência horizontal de genes é um importante mecanismo na adaptação de procaríotos a um nicho específico, pois a aquisição de um conjunto gênico já preparado e melhorado aumenta a adaptabilidade destes microrganismos. Uma dessas adaptabilidades conferiu aos microrganismos a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos. A resistência é uma consequência das mutações e das pressões seletivas sofridas pelos microrganismos expostos continuamente aos agentes bacterianos (LAXMINARAYAN et al., 2013), além de conferir uma vantagem seletiva sobre as estipes não mutadas.

Por muito tempo, infecções causadas por bactérias eram a principal causa de morbidade. Com a descoberta da sulfanilamida, em meados de 1930, pensou-se ser o fim dessas enfermidades. Todavia, uma década depois, surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a essa droga e até os dias atuais esse número vem aumentando (SANTOS et al., 2007). A resistência dos microrganismos aos antibióticos data desde a sua descoberta por Fleming em 1929, onde ele observou que algumas bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, não eram inibidas pelo antibiótico (TAVARES, 2000).

Os antibióticos correspondem ao tratamento primário das infecções bacterianas e vem recebendo merecida atenção nos últimos anos. Anualmente, só nos Estados Unidos, as infecções bacterianas contribuem direta ou indiretamente com cerca de 23.000 mortes (SHARMA et al., 2015). Dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) atenta que a resistência às bactérias comuns cresceu consideravelmente, atingindo níveis alarmantes em diversas localidades do planeta, frisando os riscos de uma era pós-antibiótica em que simples infecções podem ser fatais, até mesmo para indivíduos saudáveis (WANG et al., 2016).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno de escala global sendo sua causa atribuída principalmente ao uso indiscriminado ou mesmo prescrito da terapia antibiótica (LAHMAR et al., 2016). Atualmente, o crescente número de cepas multirresistente as drogas (MDR) é descrita para a maioria das espécies de microrganismos. Essa resistência alastrou-se a praticamente todas as classes conhecidas de antibióticos, tornando uma

necessidade vital à busca de novas drogas. Essa resistência ocorreu de forma súbita principalmente para as classes de antibióticos β -lactamases (LAXMINARAYAN et al., 2013).

Nas últimas quatro décadas a descoberta de novos medicamentos avançou muito lentamente. O principal entrave encontra-se nas dificuldades de identificar novas substâncias capazes de combater essas infecções sem causar efeitos colaterais danosos (KON; RAI, 2012). Se por um lado a descoberta de novos antibióticos diminuiu, na outra direção, houve um aumento crítico do número de cepas multirresistentes (ASAMIZU, 2017), o que justifica a busca incansável por novas tecnologias e estratégias na tentativa de criar novos medicamentos.

O uso descontrolado de antibióticos facilita as bactérias a evoluir para as formas MDR e, conseqüentemente a causar surtos epidemiológicos. Muitas dessas bactérias MDR são bastante conhecidas na clínica como é o exemplo de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA), *Enterococos* resistentes à Vancomicina (VRE), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a fluoroquinolonas, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ceftazidima, *Acinetobacter baumannii* MDR (KON; RAI, 2012), entre outras. Essa condição dificulta ainda mais a cura por limitar a disponibilidade de antibióticos para tratamento. A resistência aos antimicrobianos dá-se por diferentes vias que incluem a modificação enzimática ou degradação da molécula de antibiótico, alteração do alvo que evita que a droga se ligue ao alvo específico ocasionando assim, a perda da sua finalidade, extravasamento do fármaco nas células bacterianas pelas bombas de efluxo, além de alterações na sua fisiologia que afetam a sensibilidade aos antimicrobianos (KON; RAI, 2012).

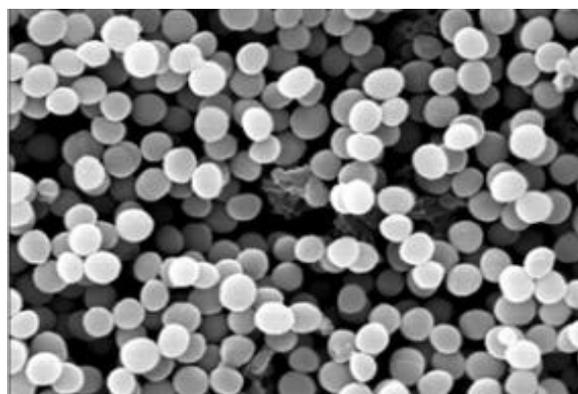
Enxergando a necessidade urgente de novos tratamentos no combate a infecções causadas por patógenos MDR, inclusive MRSA, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (Infectious Diseases Society of America - IDSA) criou uma iniciativa chamada 10x'20 onde visa o desenvolvimento de 10 novos fármacos capazes de tratar as infecções causadas por esses patógenos resistentes (chamados coletivamente de ESKAPE) até 2020 (KUMAR; CHOPRA, 2013). A necessidade imediata de novos medicamentos se esbarra em duas grandes dificuldades: descoberta e lançamento de um novo produto no mercado. Primeiro, por que os custos são altíssimos chegando a cerca de 800 milhões de dólares. Segundo e não menos complicado, o tempo. Um medicamento leva cerca de 10 a 15 anos entre o seu descobrimento, pré-testes e testes clínicos até sua liberação para uso (MEINERS, 2008).

O aumento da resistência associado aos efeitos nocivos provocados pelos antibióticos sintéticos impulsionou a busca de drogas naturais com ação antimicrobiana como alternativa para o tratamento de infecções bacterianas. Os compostos ativos oriundos de vegetais como os óleos essenciais, por exemplo, vêm sendo estudados no desenvolvimento de novos medicamentos a serem usados isoladamente ou em conjunto com as drogas tradicionais, comumente utilizadas na clínica (ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014).

3.7.1 *Staphylococcus aureus*

Descrita pela primeira vez em 1878, *Staphylococcus aureus* é ainda hoje um dos grandes causadores de infecções. Trata-se de um cocco Gram-positivo, catalase positiva e anaeróbia facultativa pertencente à família Staphylococcaceae e onde pelo menos 200 linhagens diferentes já são conhecidas (DURAI; NG; HOQUE, 2010). A cor dourada das colônias é uma característica marcante de *S. aureus*, e deve-se a presença de carotenóides. Acredita-se que os mesmos possam estar envolvidos nos fatores de virulência da bactéria além de conceder proteção contra agentes oxidativos (PLATA et al., 2009). Neste caso, a ação antioxidante deve-se a presença de uma molécula denominada estafiloxantina (responsável também pela cor) que protege o microrganismo das ERO's produzidas pelos neutrófilos (FITZGERALD-HUGHES; DEVOCELLE; HUMPHREYS, 2012). As suas células estão dispostas em cachos (Figura 8) e sua superfície é rica em proteínas que se encontram aderidas aos peptidoglicanos da parede celular (BRESOLIN et al., 2005), que junto às toxinas proteicas extracelulares são fatores determinantes para a virulência de *S. aureus* (XIANG et al., 2012).

Figura 8: Colônia de *S. aureus* em biofilme



Legenda: Colônia de *S. aureus* unidas formando um biofilme bacteriológico observada em microscopia. Fonte: Lee et al, (2014).

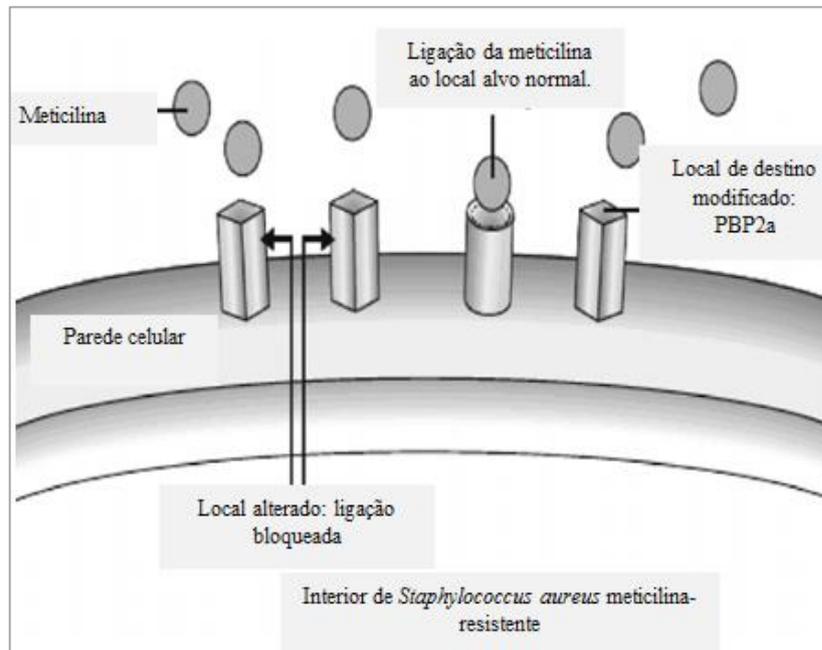
As proteínas da parede celular de *S. aureus* desempenham funções importantes como, facilitar a adesão e invasão nas células e tecidos do hospedeiro, evasão da resposta imune e formação de biofilme. Desse modo, elas estão envolvidas nos fatores de virulência cruciais para a sobrevivência da bactéria no estado comensal e durante as infecções invasivas (FOSTER et al., 2014). Esta última é causada quando o tecido do hospedeiro está lesionado em decorrência da ação bacteriana que ao atravessar essa barreira e escapar da resposta imune do hospedeiro consegue sobreviver na corrente sanguínea (FERRO et al., 2016). A capacidade de defesa inata do hospedeiro se reflete diretamente nas habilidades que a bactéria utiliza para fugir da morte por fagocitose. *S. aureus* dispõe de vários exopolímeros que se unem para formar um revestimento o qual ajuda a bactéria a se camuflar, uma vez não sendo reconhecidas pelos leucócitos conseguem se evadir da resposta imunológica (DELEO; DIEP; OTTO, 2009).

S. aureus é um dos patógenos mais estudados na clínica, principalmente por ser um dos microrganismos mais comum que infecta o ser humano. Estão envolvidos em diversas patologias como infecções dermatológicas e endovasculares, pneumonia, osteomielite, endocardite e até complicações mais graves como sepsia (MILLER; KAPLAN, 2009; DAVID; DAUM, 2010) e possui uma considerável capacidade de resistir aos antimicrobianos. Bastou apenas 10 anos após a descoberta da penicilina, para o aparecimento de cepas resistentes (DELEO et al., 2010). Essa resistência aumentou consideravelmente na década de 1950 e desde então as taxas de infecção continuam crescendo e tornando o tratamento cada vez mais complicado (SYDNOR; PERL, 2011). Em 1940, quando ainda não se utilizava a penicilina no tratamento de infecções de *S. aureus*, foi registrada uma taxa de mortalidade em torno de 80% entre os indivíduos infectados (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

A resistência aos fármacos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas tornou-se um grave problema de saúde pública. Além disso, o que é preocupante não é apenas a alta prevalência de resistência entre as bactérias, mas também o rápido aumento dos níveis de resistência (KON; RAI, 2012). *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são resistentes a todas as penicilinas e outros antibióticos β -lactâmicos. As moléculas de β -lactamases se ligam as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) na parede celular bacteriana inibindo a atividade da transpeptidase causando assim, a morte celular. A resistência à meticilina em *S. aureus*, dá-se pela aquisição horizontal de PBP2a (PBP2 modificada) e codificada pelo gene *mecA* (Figura 9). Essa alteração da proteína ocasiona a diminuição da afinidade da ligação dos

agentes de β - lactamase e conseqüentemente ajuda a promover a resistênciã (FARREL et al., 2012).

Figura 9: A resistênciã à metilicilina em *Staphylococcus aureus* é conseguida por uma modificação estrutural do local alvo de ligação da metilicilina.

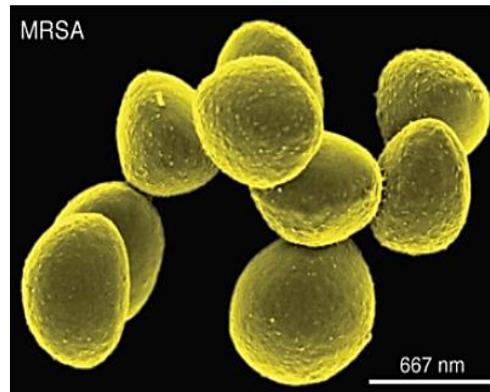


Fonte: Barbosa (2017), adaptado de Bereket et al., (2012).

Cepas de MRSA eram praticamente restritas ao ambiente hospitalar, hoje em dia é alarmante o número de indivíduos infectados por MRSA que nunca frequentou o serviço de saúde (DAVID; DAUM, 2010), ou seja, indivíduos que nunca estiveram internados ou submetidos a algum procedimento cirúrgico. Apesar do modo de infecção por MRSA dá-se de forma direta (pele a pele), a transmissão indireta (através de objetos contaminados) ou utilizando animais como vetores também podem ocorrer (DURAI; NG; HOQUE, 2010).

O surgimento e a prevalência de MRSA (Figura 10) é preocupante, pois diminuem as opções de escolha dos antimicrobianos e interfere no tratamento de infecções muito comuns (MCCARTHY; LINDSAY, 2010).

Figura 10: *S. aureus* resistente a metilicina



Fonte: DeLeo; Chambers (2009).

Desde o primeiro relato em 1961, até os dias atuais MRSA se espalhou e é persistente em hospitais de todo o mundo. Nos Estados Unidos, *S. aureus* é a principal causa de infecções hospitalares, incluindo MRSA que causa a morte de aproximadamente 20% dos indivíduos infectados. Esse número ultrapassa as mortes decorrentes de complicações em pacientes infectados por HIV/AIDS (DELEO; CHAMBERS, 2009).

Um estudo realizado nos Estados Unidos revelou que por ano, as infecções de pele causadas por *S. aureus* ocasionaram aproximadamente 12 milhões de consultas e emergências e cerca de meio milhão de internações. Esta bactéria costuma colonizar a pele e a mucosa dos seres humanos. É crucial compreender os mecanismos que facilitam a colonização de microrganismos, pois se trata de um importante fator para a infecção subsequente de *S. aureus* (KRISHNA; MILLER, 2012). Com as opções limitadas de antibióticos para o tratamento das infecções causadas por esses patógenos, a ciência permanece na busca incessante de novas moléculas promissoras.

3.7.2 *Staphylococcus aureus* e óleos essenciais

Historicamente, os produtos naturais exercem importância fundamental na identificação e principalmente no desenvolvimento de agentes antibacterianos. O interesse por essas moléculas tinha diminuído nos últimos anos, mas o surgimento de cepas multirresistentes e o aumento de mortes causadas por infecções oportunistas forçou sua reavaliação como uma rota de identificação de novas substâncias capazes de driblar os mecanismos de resistência bacteriana (MOLONEY, 2016).

Compreender a finalidade desses agentes é um passo crucial para o entendimento de suas ações farmacológicas, além de servir como estudos preliminares para desenvolvimento de novas drogas. Este ponto é fundamentalmente importante para o Brasil por dispor de uma vasta biodiversidade, o que pode contribuir para o progresso da saúde com o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com menos danos colaterais no combate a resistência e a patogenicidade de microrganismos (OSTROSKY et al., 2008).

Os microrganismos, como *S. aureus*, afetam a saúde dos seres humanos há muito tempo. Estes por sua vez, buscam na natureza, principalmente nas plantas, substâncias capazes de curar ou aliviar os sintomas provocados por esses patógenos. Muitos são estudos que relacionam a ação antimicrobiana de óleos essenciais contra cepas de *S. aureus*. Millezi et al. (2014) investigou a ação antibacteriana dos óleos essenciais de *Satureja montana* L. (Lamiaceae), *Cymbopogon nardus* L. (Poaceae) e *Citrus limonia* Osbeck (Rutaceae) contra *S. aureus* e constatou a maior sensibilidade da bactéria para o óleo de *C. limonia*. O OE de *C. limonia* é rico em limoneno e o mecanismo de ação desse composto baseia-se nos efeitos tóxicos que ele causa a membrana celular do patógeno comprometendo assim, a sua permeabilidade seletiva. Estudo semelhante foi realizado por Pesavento et al. (2015), no qual os óleos essenciais de cinco plantas (*Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Salvia officinalis*) foram testados contra diferentes microrganismos, incluindo *S. aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que todos os óleos foram ativos tanto para as cepas sensíveis quanto para as mais resistentes.

A natureza hidrofóbica é a principal característica dos OE's, sendo a que mais influencia na atividade antimicrobiana. Tal característica permite que o mesmo possa atravessar as membranas bacterianas e assim, agir diretamente sobre elas causando-lhes perda de íons, redução do potencial de membrana, perda da função das bombas de prótons e esgotamento de ATP (DI PASQUA et al., 2006) ou ainda danos as macromoléculas e organelas presentes na célula bacteriana (BAKKALI et al., 2008).

Os OE's também possuem ação contra bactérias multirresistentes. O primeiro estudo com EO que demonstrou atividade contra MRSA foi realizado por Walsh e Longstaff (1987), com o óleo da árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*). Essa descoberta gerou inúmeros outros estudos como os de Carson et al., (1995), que avaliaram a ação antimicrobiana do óleo em 64 isolados de MRSA da Austrália e do Reino Unido atestando a susceptibilidade dessas cepas ao OE de *M. alternifolia*. Desde o ano 2000 até os dias atuais, a atividade anti-MRSA de OE's

foram o foco de inúmeras pesquisas (BRADY et al., 2006; LAPLANTE, 2007; CHAO et al., 2008; DORAN et al., 2009; MAHDAVI; YAACOB; DIN, 2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Através da Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG/MS) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC/FID) foi possível identificar e quantificar os constituintes voláteis de *Xylopiia frutescens* e *Eugenia umbrosa*. Os sesquiterpenos foram os compostos predominantes nos OE's;
- Não foi possível identificar os componentes do óleo essencial de *C. dichotoma* pela técnica de (CG/MS) e (GC/FID) sendo necessárias outras técnicas mais sensíveis como RMN;
- A atividade hemolítica revelou baixa citotoxicidade em eritrócitos para todos os OE's testados;
- A melhor atividade antioxidante dos OE's foi observada no método do fosfomolibdênio, com destaque para o OE de *X. frutescens* que apresentou também os melhores resultados nos demais métodos, devendo ser mais investigada nesse aspecto;
- O antibiograma revelou que oito do total de dezessete cepas de *S. aureus* são multirresistentes (MDR);
- A CIM/CBM para a maioria das cepas de *S. aureus* foi moderada/alta. No entanto, para confirmar a ação antimicrobiana dos OE's estudados é necessário que os mesmos sejam avaliados frente a outros patógenos;
- Através da curva de crescimento foi possível observar que a morte bacteriana ocorreu nas primeiras horas de contato das cepas de *S. aureus* com os OE's;
- Este é o primeiro estudo sobre os constituintes voláteis e atividades antioxidante e antimicrobiana de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* presentes na Mata Atlântica do Nordeste.

REFERÊNCIAS

- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n.6, p. 407- 426, 2010.
- AHMED, F.; RAHMAN, M. S. Preliminary assessment of free radical scavenging, thrombolytic and membrane stabilizing capabilities of organic fractions of *Callistemon citrinus* (Curtis.) skeels leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 247, 2016.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 240-254, 2014.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, p. 2202-2210, 2009.
- AMORIM, B. S.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Myrtaceae. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 499-514, 2011.
- AMORIM, B. S.; ALVES, M. Myrtaceae from lowland Atlantic Forest areas in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 40, n. 1, p. 33-54, 2012.
- AMORIM, B. S.; ALVES, M. A New Species of *Eugenia* (Myrteae, Myrtaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. **Systematic Botany**, v. 37, n. 3, p. 694-698, 2012.
- AMORIM, B. S.; ALVES, M. *Eugenia submontana* (Myrteae, Myrtaceae), a new species from the Atlantic Forest of northeastern Brazil and notes on *Eugenia culicina*. **Phytotaxa**, v. 208, n. 3, p. 209-216, 2015.
- ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 3, n. 1, 2011.
- ASAMIZU, S. Biosynthesis of nitrogen-containing natural products, C₇N aminocyclitols and bis-indoles, from actinomycetes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, p. 1-11, 2017.
- AZEVEDO, R. R. S.; ALMEIDA, V. G. A.; SILVA, E. M. F.; SILVA, A. L.; GOMES, N. R. S.; MATIAS, T. M. S.; SOUZA, L. I. O.; SANTOS, A. F. Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. **Revista Semente**, v. 6, n. 6, 2013.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M.

Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BAKAR, A. A.; SULAIMAN, S.; OMAR, B.; ALI, R. M. Evaluation of *Melaleuca cajuputi* (Family: Myrtaceae) Essential Oil in Aerosol Spray Cans against Dengue Vectors in Low Cost Housing Flats. **J Arthropod-Borne Dis**, v. 6, n. 1, p. 28, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BEREKET, W.; HEMALATHA, K.; GETENET, B.; WONDWOSSEN, T.; SOLOMON, A.; ZEYNUDIN, A.; KANNAN, S. Update on bacterial nosocomial infections. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 16: 1039-1044, 2012.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim.Nova**, Vol. 32, No. 3, 588-594, 2009.

BRADY, A.; LOUGHLIN, R.; GILPIN, D.; KEARNEY, P.; TUNNEY, M. *In vitro* activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and –sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. **J. Med. Microbiol**, v. 55, n. 10, p. 1375-1380, 2006.

BRANDÃO, M. G. L.; PAULA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. Belo Horizonte. **Anais do XIV Seminário de Economia Mineira**, p. 1-10, 2010.

BRANDÃO, S. E.; BULBOVAS, P.; LIMA, M. E. L.; DOMINGOS, M. Biochemical leaf traits as indicators of tolerance potential in tree species from the Brazilian Atlantic Forest against oxidative environmental stressors. **Science Of The Total Environment**, v. 575, p. 406-417, 2017.

BRASIL - MATA ATLÂNTICA Hotspot de BIODIVERSIDADE. **Critical Ecosystem Partnership Fund**. p.29, 2001.

BRASIL - Ministério do Meio Ambiente. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental** / Maura Campanili e Wigold Bertoldo Schaffer. – Brasília: MMA/SBF, p. 96, 2010.

BOSSOLAN, N. R. S. **Introdução à Microbiologia**. Apostilha. Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos. São Paulo, v. 3, p. 28-38, 2002.

BRESOLIN, B. M. Z.; DALL'STELLA, J. K.; FONTOURA-DA-SILVA, S. E. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba/Paraná/Brasil. **Estud. Biolog**, v. 27, 2005.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists. Courier Companies. **Inc. Waldorf, MD**. 2000.

- CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SANTOS, L. S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881-23904, 2015.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; ARRELLY, H. D.; RILEY, T.V. Susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 421-424, 1995.
- CARVALHO JUNIOR, A. R.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; Carvalho, M. G. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, p. 477-482, 2014.
- COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-7, 2013.
- CHAO, S.; YOUNG, G.; OBERG, C.; NAKAOKA, K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavor and Fragrance Journal*, v. 23, n. 6, p. 444-449, 2008. **Flavour Fragr. J.** 23, 444–449, 2008.
- CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p. 5-40, 2012.
- CRONQUIST, A. **Na Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press. p. XIII-XVIII, 1981.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.
- CUNHA, A. P., ROQUE, O. R., NOGUEIRA, M. T. **Plantas aromáticas e óleos essenciais – Composição e aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2012.
- DAMASCENO, Q. S. **Características epidemiológicas dos microrganismos resistentes presentes em reservatórios de uma Unidade de Terapia Intensiva**. Dissertação (Mestrado). Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.
- DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616-687, 2010.

- DELEO, F. R.; CHAMBERS, H. F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, 2009.
- DELEO, F. R.; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.
- DELEO, F. R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B. N.; CHAMBERS, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, 2010.
- DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 747-763, 2008.
- DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745-2749, 2006.
- DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.
- DORAN, A. L.; MORDEN, W. E.; DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. **Letts. Appl. Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 387-392, 2009.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- DURAI, R.; NG, P. C. H.; HOQUE, H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Update. **AORN Journal**, v. 91, n. 5, p. 599-609, 2010.
- FABANI, M. P.; LUNA, L.; BARONI, M. V.; MONFERRAN, M. V.; IGHANI, M.; TAPIA, A.; WUNDERLIN, D. A.; FERESIN, G. E. Pistachio (*Pistacia vera* var. Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1347-1356, 2013.
- FARRELL, D. J.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R. E.; SADER, H. S.; JONES, R. N. In Vitro Activity of Ceftaroline Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*: A Review of Published Studies and the AWARE Surveillance Program (2008–2010). **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. suppl 3, p. S206-S214, 2012.
- FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G. N.; RADI, E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 322, p. 254-262, 2012.

FERRAZ, R. P. C.; CARDOSO, G. M. B.; SILVA, T. B.; FONTES, J. E. N.; PRATA, A. P. N.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 196-200, 2013.

FERRER, M.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; ROJO, D.; BARBAS, C.; MOYA, A. Antibiotic use and microbiome function. **Biochemical Pharmacology**, 2016.

FERRO, T. A. F.; ARAÚJO, J. M. M.; PINTO, B. L. S.; SANTOS, J. S.; SOUZA, E. B.; SILVA, B. L. R.; COLARES, V. L. P.; NOVAIS, T. M. G.; FILHO, C.M. B.; STRUVE, C.; CALIXTO, J. B.; MONTEIRO-NETO, V.; SILVA, L. C. N.; FERNANDES, E. S. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. **Front Microbiol.**, v. 21, n. 7, p. 2052, 2016.

FITZGERALD-HUGHES, D.; DEVOCELLE, M.; HUMPHREYS, H. Beyond conventional antibiotics for the future treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: two novel alternatives. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 65, p. 399-412, 2012.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A.; GANESH, V. K.; HÖÖK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 49-62, 2014.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae Essential Oils: A Review. **J. Essent. Oil Res.**, v. 11, p. 131-142, 1999.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLANTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica período 2015-2016. RELATÓRIO TÉCNICO.** 69 pg. São Paulo, 2017.

FLORENCE, N. T.; BENOIT, M. Z.; JONAS, K.; ALEXANDRA, T.; DÉSIÉ, D. D. P.; PIERRE, K.; THÉOPHILE, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 784-790, 2014.

FLORES, G.; WU, S-B.; NEGRIN, A.; KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, v. 170, p. 327-335, 2015.

FRANCA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES JR, A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE J Port Gastrenterol**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FRIZZO, M. N.; MONTANO, M. A. E.; CRUZ, I. B. M.; PANSERA-DE- ARAÚJO, M. C. Estudo da associação do polimorfismo do gene da superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) com atividade física ao longo do envelhecimento. Saúde Integrada – **Revista da Saúde do Instituto Cenecista**, Ano 1. n. 1, 2008.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2009. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, Período 2005–2008**. São Paulo, SP, Brazil. 2009.

GAVAMUKULYA, Y.; ABOU-ELELLA, F.; WAMUNYOKOLI, F.; AEL-SHEMY, H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pac J Trop Med.**, v. 7, p. 355-363, 2014.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, V.29, n.4, p.509-530, out.-dez. 2006.

GROENEVELD, J.; ALVES, L. F.; BERNACCI, L. C.; CATHARINOF, E. L. M.; KNOGGE, C.; METZGER, J. P.; PÜTZ, S.; HUTH, A. The impact of fragmentation and density regulation on forest succession in the Atlantic rain forest. **Ecological Modelling**, v. 220, n. 19, p. 2450-2459, 2009.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; BOEIRA, S.; PANIZ, C.; SANTA MARIA, L.; VICENTINI, J.; MORO, A.; CHARÃO, M.; GARCIA, S. C. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo – malondialdeído. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, pag 275-279, 2008.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 3, p. 243–265, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

HALCÓN, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, p. 402-408, 2004.

HANSEN, M. C.; POTAPOV, P. V.; MOORE, R.; HANCHER, M.; TURUBANOVA, S. A.; TYUKAVINA, A.; THAU, D.; STEHMAN, S. V.; GOETZ, S. J.; LOVELAND, T. R.; KOMMAREDDY, A.; EGOROV, A.; CHINI, L.; JUSTICE, C. O.; TOWNSHEND, J. R. G. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. **Science**, v. 342, n. 6160, p. 850-853, 2013.

HÖLLERHAGE, M.; RÖSLER, T. W.; BERJAS, M.; LUO, R.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; SABAA-SRUR, A. U.; MAIA, J. G. S.; MORAES, M. R.; GODOY, H. T.; HÖGLINGER, G. U.; SMITH, R. E. Neurotoxicity of Dietary Supplements from Annonaceae Species. **International Journal of Toxicology**. v. 34, n. 6, p. 543-550, 2015.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**. Oxford, Clarendon Presse, p. 22-168, 1978.

ISLAM, M. D. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 39, n. 1, p. 73-82, 2016.

JOHANNESSEN, M.; SOLLID, J. E.; HANSEN, A. Host and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 56, 2012.

KON, K. V.; RAI, M. K. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 10, n. 7, p. 775-790, 2012.

KUMAR, K.; CHOPRA, S. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 1465-1470, 2013.

LAHMAR, A.; BEDOUI, A.; MOKDAD-BZEUICH, I.; DHAOUIFI, Z.; KALBOUSSI, Z.; CHERAIF, I.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. **Microbial Pathogenesis**, 2016.

LANDIM, M. F.; LANDRUM, L. R. The genus *Campomanesia* (Myrtaceae) in Atlantic rainforest fragments in Sergipe, Northeast region of Brazil. **Contributions to Botany**, v. 20, n. 1, p. 205-214, 2002.

LARRANAGA, N.; HORMAZA, J. I. DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus *Annona* (Annonaceae). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 589, 2015.

LAURANCE, W. F.; SAYER, J.; CASSMAN, K. G. Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, p. 107-116, 2013.

LAWRENCE, J. G. Gene Transfer in Bacteria: Speciation without Species? **Theoretical Population Biology**, v. 61, p. 449-460, 2002.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases Commission**, v. 13, 2013.

LEE, J. H.; KIM, Y. G.; RYU, S. Y.; CHO, M. H.; LEE, J. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, pag 47–55, 2014.

LEWIS, S. L.; EDWARDS, D. P.; GALBRAITH, D. Increasing human dominance of tropical forests. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 827-832, 2015.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5837, p. 161-65, 2009.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, v. 763, p. 1–10, 2013.

LORENZO, V. P.; LUCIO, A. S.; SCOTTI, L.; TAVARES, J. F.; FILHO, J. M.; LIMA, T. K.; ROCHA, J. D.; SCOTTI, M. T. Structure- and Ligand-Based Approaches to Evaluate Aporphinic Alkaloids from Annonaceae as Multi-Target Agent Against *Leishmania donovani*. **Curr Pharm Des.**, v. 22, n. 34, p. 5196-5203, 2016.

LUCAS, E. J.; HARRIS, S. A.; MAZINE, F. F.; BELSHAM, S. R.; LUGHADHA, E. M. N.; TELFORD, A.; GASSON, P. E.; CHASE, M. W. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v. 56, n. 4, p. 1105-1128, 2007.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch.(Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KENNY, O.; BRUNTON, N. P.; SMYTH, T. J. In Vitro Protocols for Measuring the Antioxidant Capacity of Algal Extracts. In: **Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols**. Chap 24. Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols, v. 1308, p. 375-402, 2015.

KHAIRUNISSA, N.; ZAWAWI, N. A.; AHMAT, N.; AHMAD, R.; JAAFAR, F. M.; AB GHANI, N. Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopiya ferruginea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 7-9, 2012.

KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., DOMINA, N. G., KIRPOTINA, L. N., QUINN, M. T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg.Med. Chem.**, v. 15, p. 1749–1770, 2007.

KRISHNA, S.; MILLER, L. S. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 1, p. 28-35, 2012.

LAPLANTE, K. L. *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 4, p. 413-418, 2007.

LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. **Rev. bras. ciênc. Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 3, p. 251-258, 2003.

MAHDAVI, B.; YAACOB, W. A.; DIN, L. B. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of essential oils from *Etilingera sayapensis* A.D. Poulsen & Ibrahim. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 10(8): 819–826, 2017.

MANOHARAN, S.; GUILLEMIN, G. J.; ABIRAMASUNDARI, R. S.; ESSA, M. M.; AKBAR, M.; AKBAR, M. D. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Volume 2016.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**. V. 8, n.1, p.195 - 206, 2001.

- MARTINS, P. F. **Aspectos da regulação metabólica bacteriana em resposta a herbicidas: um enfoque ao sistema antioxidante**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2012.
- MELO, A.; AMORIM, B. S.; GARCÍA-GONZÁLEZ, J.; SOUZA, J. A. N.; PESSOA, E. M.; MENDONÇA, E.; CHAGAS, M.; ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M.; Updated floristic inventory of the angiosperms of the Usina São José, Igarassu, Pernambuco, Brazil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 20, n. 2, p. 3-26, 2011.
- MEINERS, C. M. M. A. Patentes farmacêuticas e saúde pública: desafios à política brasileira de acesso ao tratamento anti-retroviral. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 7, p. 1467-1478, 2008.
- MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v.16 n.1, 2014.
- MIGUEL, M. G.; Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.
- MILLER, L. G.; KAPLAN, S. L. *Staphylococcus aureus*: A Community Pathogen. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, p. 35-52, 2009.
- MILLER, J. H.; NOVAK, J. T.; KNOCKE, W. R.; PRUDEN, A. Survival of Antibiotic Resistant Bacteria and Horizontal Gene Transfer Control Antibiotic Resistance Gene Content in Anaerobic Digesters. **Frontiers in Microbiology**, Volume 7 Article 263 March, 2016.
- MORANTE-FILHO, J. C.; ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; LOHBECK, M.; TSCHARNTKE, T.; FARIA, D. Tropical forest loss and its multitrophic effects on insect herbivory. **Ecology**, v. 97, n. 12, p. 3315-3325, 2016.
- MORI, N. C.; HORN, R. C.; OLIVEIRA, C.; LEAL, P. A. P.; GOLLE, D. P.; KOEFENDER, J.; BORTOLOTTI, J.; DIAS, H. M. Alterações bioquímicas e toxicológicas de agricultores familiares da região do Alto Jacuí, Rio Grande do Sul. **Sci Med.**, v. 25, n. 3, 2015.
- MOLONEY, M. G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 37, n. 8, p. 689-701, 2016.
- MCCARTHY, A. J.; LINDSAY, J. A. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. **BMC Microbiology**, v.10 p. 173, 2010.
- MURPHY, B. P.; ANDERSEN, A. N.; PARR, C. L. The underestimated biodiversity of tropical grassy biomes. **Phil. Trans. R. Soc.**, v. 371, p. 319, 2016.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; JENNIFER KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, 2000.

NAKAZATO, R. K.; RINALDI, M. C. S.; DOMINGOS, M. Tropical trees: Are they good alternatives for biomonitoring the atmospheric level of potential toxic elements near to the Brazilian Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.134, p.72–79,2016.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503–515, 2010.

NISHIYAMA Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; MUTISO, P. B. C.; JUMA, F. D. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopiaparviflora*. **Phytochemistry**, v. 67 p. 2671–2675, 2006.

NÓBREGA, H. N.; FERREIRA, J. A. B.; ROMÃO, C. M. C. P. A.; CAPASSO, I. R. V. F. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos por meio de técnica time kill. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 72, n. 3, p. 226-33, 2013.

OLIVEIRA, M. I. U.; FUNCH, L. S.; LANDRUM, L. R. Flora da Bahia: *Campomanesia* (Myrtaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 91, 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; BEATRIZ R. FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAULA, C.S.; CANTELI, V.C.D.; VERDAM, M.C.S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B.C.K.; MIGUEL, O.G.M.; MIGUEL, M.D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, p.189-195, 2014.

PAULA, J. A. M.; REIS, J. B.; FERREIRA, L. H. M.; MENEZES, A. C. S.; PAULA, J. R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Rev. bras. plantas med**, Botucatu, v.12, n.3, 2010.

PEREIRA, A. A.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica Enteritidis* por óleos essenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.11, p.2022-2028, 2014.

PEREIRA, A. B.; Mata Atlântica: uma abordagem geográfica. **Nucleus**, v.6, n.1, 2009.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; AND S FLÔRES, S. H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 3061–3067, 2012.

PERES, L. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: *Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, p. 1-10, 2004.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A. R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M. C.; LO

NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thy mus essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Listeri amonocytogenes* in beef meat balls. **Food Control**, v. 54 p.188-199, 2015.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M.C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochem & Anal Biochem**, v. 1, p. 106, 2011.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56 n. 4, p. 597–612, 2009.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxincontamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381-391, 2015.

PROENÇA, C. E. B.; OLIVEIRA, M. I. U.; MARCOS SOBRAL, M.; LANDIM, M. F. Novelties in Myrtaceae: contributions to the Flora of the State of Sergipe, Brazil. **Phytotaxa**, v. 173, n. 3, 2014.

RAMOS, M. F. S; SIANI, A. C.; SOUZA, M. C.; SOUZA, M. C.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Óleos Essenciais de Cinco Espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, v.2, n.02, 2006.

REIS, D.; JONES, T. Aromatherapy: using essential oils as a supportive therapy. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2017.

RESENDE, M. L. V.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatol. bras.** v.28, n 2, 2003.

SANEI-DEHKORDI, A.; SEDAGHAT, M. M.; VATANDOST, H.; ABAI, M. R. Chemical Compositions of the Pel Essential Oil of *Citrus aurantium* and Its Natural Larvicidal Activity against the Malaria Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Comparison with *Citrus paradisi*. **J Arthropod-Borne Dis**, v. 10, n.4, p. 57–585, 2016.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SEN, S.; DE, B.; DEVANNA, N.; CHAKRABORTY, R. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meynas pinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 2, p. 149–157, 2013.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; CECHINEL FILHO, V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 578-582, 2007.

SILVA, L. C. N. MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; MACEDO, A. G.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p 2358-2364, 2013.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alkaloids and other constituents from *Xylopi langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1.566-1.570, 2009.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **J. Venom. Anim. Toxinsincl. Trop. Dis.**, v.16, n.3, p.402-413, 2010.

SILVA, T. B.; MENEZES, L. R. A.; SAMPAIO, M. F. C.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. P. Chemical composition and anti-trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopi frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Nat Prod Commun**, V. 8, p. 403- 6, 2013.

SOBRAL, M.; LUCAS, E.; LANDRUM, L.; SOARES-SILVA, L. Myrtaceae. In: STEHMANN, J., FORZZA, R.C., SALINO, A., SOBRAL, M., COSTA, D.P. & KAMINO, L.H.Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro, p. 352–36, 2009.

SOMOVA, L. I.; SHODE, F.O.; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 165–74, 2001.

SOUZA, I. L. L.; CORREIA, A. C. C.; ARAÚJO, L. C. C.; VASCONCELOS, L. H. C.; SILVA, M. C. C.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Essential oil from *Xylopi frutescens* Aubl. Reduces cytosolic calcium level songuine apigileum: mechanis munderlying its spasm olyticpotential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 327, 2015.

SOUZA JR, T. P.; OLIVEIRA, P. R.; PEREIRA, B. Physical exercise and oxidative stress: effect of intense physical exercise on the urinary chemiluminescence and plasmatic malondialdehyde. **Rev Bras Med Esporte** _ Vol. 11, Nº 1, 2005.

SFAIR, J. C.; ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; SANTOS, B. A.; TABARELLI, M. Taxonomic and functional divergence of tree assemblages in a fragmented tropical forest. **Ecological Applications**, v. 26, Issue 6. p. 1816-1826, 2016.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, Article, 2012.

SHARMA, V. K.; JOHNSON, N.; CIZMAS, L.; MCDONALD, T. J.; KIM, H.A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Chemosphere**, v. 150, p. 702-714, 2015.

SHIWAKOTI, S.; SALEH, O.; POUDYAL, S.; BARKA, A.; QIAN, Y.; ZHELJAZKOV, V. D. Yield, Composition and Antioxidant Capacity of the Essential Oil of Sweet Basil and Holy Basil as Influenced by Distillation Methods. **Chem. Biodivers**, Dec 2016.

STEA, S.; BERAUDI, A.; DE PASQUALE, D. Essential Oils for Complementary Treatment of Surgical Patients: State of the Art. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 6 pages, 2014.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, 2011.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 516, 2009.

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clinical Microbiology reviews**, p. 141–173, 2011.

TABARAKI, R.; NATEGHI, A.; AHMADY-ASBCHIN, S. In Vitro Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activities of Six Edible Plants from Iran. **J Acupunct Meridian Stud.**, v. 6, n.3, p. 159-162, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21–26, 2006.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEIXEIRA, M. L.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; MACHADO, S. M. F.; ANDRADE, M. A.; GOMES, M. S.; ANDRADE, J. *Citrumelo Swingle*: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. **Magistra**, Cruz das Almas- BA, v. 24, n. 3, p. 194-203, jul./set. 2012.

THUY, T. T. T.; QUAN, T. D.; ANH, N. T. H.; SUNG, T. V. Cytotoxic and antimicrobial aporphine alkaloids from *Fissistigma poilanei* (Annonaceae) collected in Vietnam. **Natural Product Research**, v. 26, n. 14, p. 1296–1302, July 2012.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; GASPER, A. L.; ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

TRUGILHO, P. F.; MORI, F. A.; LIMA, J. T.; CARDOSO, D. P. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS NA CASCA DE *Eucalyptus spp.* **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 2. p. 246-254, 2003.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

VIEIRA, P. M.; PAULA, J. R.; CHEN-CHEN, L. *Solanum paniculatum* L. Leaf and fruits extracts: assessment of modulation of cytotoxicity and genotoxicity by micronucleus test in mice. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n. 6, p. 1-7, 2010.

VILLAS BÔAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 23, n. 6, p.1463-1471, 2007.

WANG, Q.; WANG, H.; XIE, M. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. **Archives of microbiology**, v. 192, n. 11, p. 893-898, 2010.

WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2469-2493, 2010.

WALSH, L. J.; LONGSTAFF, J. The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens. **Periodontology** 8, p. 11–15, 1987.

WIJAYAWARDENA, B. K.; MINCHELLA, D. J.; DEWOODY, J. A. Hosts, parasites, and horizontal gene transfer. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, July 2013.

WINGFIELD, M. J.; BROCKERHOFF, E. G.; WINGFIELD, B. D.; SLIPPERS, B. Planted forest health: The need for a global strategy. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 832-836, 2015.

WOGUEM, V.; FOGANG, H. P. D.; MAGGI, F.; TAPONDJOU, L. A.; WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; VITTORI, S.; BARBONI, L. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopiya parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, v. 149, p. 183–189, 2014.

YOO, C.; HAN, K.; CHO, K.; HA, J.; PARK, H.; NAM, J.; KIL, U.; LEE, K. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer letters**, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005.

XIANG, H.; FENG, Y.; WANG, J.; LIU, B.; CHEN, Y.; LIU, L.; DENG, X.; YANG, M. Crystal Structures Reveal the Multi-Ligand Binding Mechanism of *Staphylococcus aureus* ClfB. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 6, 2012.

ZANUSSO-JUNIOR, G.; MELO, J.O.; ROMERO, A.L.; DANTAS, J.A.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANIAMADO, C. A.; CUMAN, R.K.N. Avaliação da atividade antiinflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em Roedores. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.13, n.1, p.17-23, 2011.

APÊNDICE A - Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Plantas da Mata Atlântica

Amanda Virginia Barbosa^{1*}, amandavirginia88@gmail.com

Barbara de Azevedo Ramos¹, barbara.a.ramos@hotmail.com

Milena Martins Correia da Silva², milenamartins.c@hotmail.com

Alexandre Gomes da Silva¹, agsilva@live.com

Claudio Augusto Gomes da Camara², claudio_agc@hotmail.com

Maria Tereza dos Santos Correia¹, mtscorreia@gmail.com

Marcia Vanusa da Silva¹,marciavanusa@yahoo.com.br

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Artigo a ser enviado para a Revista Journal of Pharmacy and Pharmacology

Regras da revista:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)20427158/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)20427158/homepage/ForAuthors.html)

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 127/255 (Pharmacology & Pharmacy)

Online ISSN: 2042-7158

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo foi analisar a composição química, as atividades antioxidante e antimicrobianas dos óleos essenciais das folhas de *Xylopiia frutescens*, *Campomanesia dichotomae* e *Eugenia umbrosa*.

Métodos: A caracterização química de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* foram analisadas por GC/MS e GC/FID. Para avaliar a atividade antioxidante, utilizaram-se os métodos de sequestro do DPPH, ABTS, peroxidação lipídica e ensaio do fosfomolibdênio. A atividade antibacteriana foi avaliada por concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) além da verificação da cinética de morte inicial de estirpes MDR de *Staphylococcus aureus*.

Resultados: Foram identificados 25 compostos para o óleo essencial de *X. frutescens* sua maior parte pertencente a classe dos sesquiterpenos tendo o Biciclogermacreno. A cromatografia do OE de *E. umbrosa* identificou um total de 32 compostos. O constituinte majoritário foi o β -copaeno-4 α -ol. Não foi possível identificar o OE de *C. dichotoma* por GC/MS e GC/FID. O óleo essencial de *X. frutescens* apresentou atividade antioxidante mais significativa que os demais óleos. Todos os óleos apresentam baixo grau de hemólise e demonstraram ação bactericida contra *S. aureus* na concentração de 4mg/mL com a morte bacteriana ocorrendo nas primeiras horas do contato do OE com o microrganismo.

Conclusões: Este é o primeiro relato sobre a análise dos componentes voláteis das folhas de *E. umbrosa*. Trata-se também do primeiro estudo da atividade antimicrobiana, antioxidante e hemolítica para os três óleos analisados.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Antioxidantes; *Staphylococcus aureus*; Óleos essenciais;

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são amplamente usados como matéria-prima para a síntese de compostos bioativos ^[1]. Cerca de 80% da população mundial faz uso de remédios tradicionais como alternativas medicamentosas iniciais, principalmente os fitoterápicos. O Brasil possui um rico patrimônio florístico, com uma grande parcela de plantas nativas nunca exploradas ^[2]. A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros que está presente em grande parte da região litorânea. É uma das mais importantes florestas tropicais do mundo, apresentando uma rica biodiversidade ^[3]. Nela há um elevado número de espécies vegetais (em sua maioria, endêmicas), que são fontes promissoras de inúmeras moléculas bioativas. As famílias Annonaceae e Myrtaceae estão presentes no Domínio Atlântico e seus representantes são bastante estudados quanto aos seus efeitos farmacológicos que incluem ação antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, entre outros ^[4,5].

No Brasil, a busca por produtos de origem natural vem crescendo bastante nos últimos anos. O que tem aumentado significativamente o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à descoberta de novos fármacos ^[6]. Os produtos naturais derivados de vegetais já são conhecidos por suas ações farmacológicas no combate a diversas doenças como câncer e diabetes ^[7,8], e por suas propriedades antimicrobianas e antiparasitárias ^[9]. Dos medicamentos disponíveis atualmente cerca de 40% são oriundos de fontes naturais, principalmente de plantas.

Dentre os compostos naturais sintetizados pelas plantas destacam-se os óleos essenciais que cada vez mais estão se tornando o foco de diversas pesquisas. A estimativa é de que cerca de três mil óleos essenciais já foram descritos, dos quais cerca de trezentos são destinados ao mercado de fragrâncias ^[10]. O uso de óleos essenciais na fitoterapia está ligado às diversas ações farmacológicas apresentadas por seus constituintes e são bastante estudados principalmente quanto a sua ação antioxidante e antimicrobiana. Uma vez elucidados todos os seus constituintes e confirmado seu potencial antioxidante, podem vir a ser utilizados como antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos geralmente utilizados pela indústria alimentícia. Por outro lado, a atividade antimicrobiana é o ponto inicial para diversos estudos incluindo o desenvolvimento de novos fármacos. Além do mais, tem-se observado uma crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos comumente prescritos na clínica ^[11]. A partir dessas considerações este estudo tem como objetivos caracterizar quimicamente os componentes dos óleos essenciais de *Xylopia frutescens* Aubl, *Campomanesia dichotoma*

(O.Berg) Mattos e *Eugenia umbrosa* O.Berg, provenientes da Mata Atlântica, além de avaliar suas atividades antioxidante e antimicrobiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 2,6-ditert-butil-4- metilfenol (BHT), 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico ácido (ABTS), Trolox®, ácido linoleico, quercetina, ácido ascórbico, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Meios de cultura Mueller-Hinton ágar e Mueller-Hinton caldo foram obtidos da Himedia Laboratories (Mumbai, Índia). O óxido de cariofileno, valenceno, β -cariofileno e α -humuleno utilizados nas identificações dos compostos voláteis, foram adquiridos da Sigma-Aldrich - Brasil.

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Xylopia frutescens*, *Campomanesia dichotoma* e *Eugenia umbrosa* foram coletadas entre os meses de maio/junho de 2015, na Usina São José - PE, Usina Coruripe - AL e Chapada do Araripe - CE, respectivamente. Após as coletas, as amostras vegetais foram identificadas e depositado no herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

Extração dos componentes voláteis

As folhas de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* foram secas em estufa a uma temperatura de 40° C. Em seguida foram trituradas e submetidas a extração dos óleos essenciais através da técnica de hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger durante 4h. O rendimento foi calculado pelo peso seco do material vegetal. Os óleos essenciais foram armazenados a 20 °C negativos e protegido da luz.

Caracterização química dos OE's e Identificação dos componentes

A identificação química dos compostos presentes nos óleos foi realizada por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (GC/FID) e por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS).

Análise GC/FID

As análises GC quantitativas foram realizadas utilizando um aparelho GC Hewlett-Packard 5890 Series II equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 não polar (película com espessura de 30 x 0,25 mm x 0,25 mm μ m) (J & W Scientific). A temperatura programada do forno foi de 60 a 240 ° C a uma taxa de 3 ° C / min para efeitos de integração. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 ° C. Utilizou-se o hidrogênio como gás de suporte a uma taxa de fluxo de 1 L / min e 30 p.s.i. de pressão de entrada no modo de divisão (1:30). O volume de injeção foi de 0,5 μ L de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano. A quantidade de cada composto foi calculada a partir das áreas de pico de CG na ordem da eluição da coluna DB-5 e expressa como uma porcentagem relativa da área total dos cromatogramas.

Análise GC/MS

A análise qualitativa de GC/MS foi realizada utilizando um sistema Varian 220-MS IT GC com um detector de massa seletiva, espectrômetro de massa em EI 70 eV com um intervalo de varrimento de 0,5 s e fragmentos de 40 a 550 Da. Equipado com o mesmo programa da coluna e temperatura que o dos experimentos GC, com os seguintes parâmetros: gás transportador = hélio; taxa de fluxo = 1 mL / min; Modo de divisão (1:30); Volume injetado = 1 μ l de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano.

Identificação dos componentes

A identificação dos componentes baseou-se nos índices de retenção de GC com referência a uma série homóloga de n-alcenos C₈-C₄₀ utilizando a equação de Van den Dool e Kratz^[12], por correspondência contra uma biblioteca espectral de massa de um sistema de dados GC/MS (NIST 98 e WILEY) e co-injeção com padrões autênticos, bem como outros espectros de massa publicados^[13]. Os sesquiterpenos óxido de cariofileno e valenceno (para *E. umbrosa*), β -cariofileno e α -humuleno (para *X. frutescens*) foram utilizados para identificação dos compostos voláteis.

Atividade Antioxidante

Sequestro de radicais livres - DPPH

O método é baseado na metodologia de Blios^[14], utilizando o radical estável DPPH[•]. Após o preparo do reagente DPPH, foram pesados 1 mg de cada óleo e misturados a 1 mL de metanol

e feitas as diluições seriadas (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/mL). Em uma placa de microtitulação, foi adicionado 40 µL de cada concentração do óleo, 250 µL da solução de DPPH e mantida no escuro. Após 25 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. A eliminação de radicais de DPPH foi calculada através da fórmula:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Onde: Abs = Absorbância. BHT foi utilizado como padrão. IC₅₀ foi calculado como a concentração que causou 50% de inibição de DPPH.

Inibição do radical ABTS

O método ABTS utilizado foi descrito por Re et al^[15] e modificado por Kuskoski et al^[16]. O radical ABTS⁺ é formado por uma reação química com o persulfato de potássio. Após 16 horas do preparo do reagente ABTS, foi pesado 1 mg de cada óleo e misturados em 1mL de metanol. Em seguida foram realizadas as diluições seriadas (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25µg/mL). Posteriormente (no escuro), foi colocado em cubetas 1mL da solução ABTS junto com 10 µL de cada amostra de óleo e a absorbância foi medida em espectrofotômetro exatamente após 6 minutos. Os resultados foram expressos em Porcentagem de inibição (% I) e o BHT foi utilizado como padrão de referência.

Atividade Antioxidante Total (ATT)

O óleo essencial das folhas de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* foram diluídas para concentração de 1 mg/mL, onde 100 µL foi misturado a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente colocados em banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Após voltarem à temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm^[17]. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela fórmula:

$$\text{ATT I(\%)} = \frac{\text{Aa} - \text{Ac}}{\text{Aaa} - \text{Ac}} \times 100$$

Onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

Peroxidação Lipídica

Foi pesado 1 mg de cada óleo e dos padrões (BHT, quercentina e Trolox®) e dissolvidos em 1 mL de metanol. Em seguida, 200 µL da amostra, dos padrões e do branco (etanol) foram colocados em um tubo (separadamente) junto com 200 µL da solução de ácido linoleico (2,5 M), 400 µL de tampão fosfato (20 mM, pH 7) e 200 µL de água destilada (v.f. 1 mL). Posteriormente, os tubos foram incubados no escuro por 24h a 40° C. Após a incubação, 50 µL da mistura foi adicionado a 50 µL de etanol à 75%, 50 µL da solução de tiocianato de amônio (0,3 M) e 50 µL de solução de cloreto ferroso (20 mM) em placa de microtitulação. Após 3 min, foi mensurada a densidade ótica em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 500 nm. A mistura original voltou para incubadora e o experimento foi realizado a cada 24h até 1 dia após o controle positivo atingir o seu valor máximo de absorbância. Os resultados foram expressos em Porcentagem de Inibição (% I), calculados pela fórmula:

$I (\%) = [(Abs \text{ do controle positivo do último dia} - Abs \text{ da amostra no último dia}) / Abs \text{ do controle positivo do último dia}] \times 100$, onde Abs = absorbância.

Atividade Hemolítica

A atividade foi realizada seguindo a metodologia de Almaaytah et al ^[18]. Eritrócitos humanos foram isolados por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. O plasma foi removido e os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salina (PBS 0,9%; pH 7,4). Uma alíquota de 1100 µL de suspensão de eritrócitos foi misturada a 400µL do óleo essencial em várias concentrações (500, 250, 125, 62,5 e 31,25 mg/mL). O controle negativo (branco) e controle positivo receberam 400 µL de metanol e de Triton X-100, respectivamente. Após 60 minutos de incubação à 37° C as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa em relação à ação do Triton X-100 e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

Sendo, A_b a absorbância do controle (branco, sem extrato), A_s a absorbância na presença de extrato e A_c sendo referente a absorbância da solução de Triton X-100.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Amostras bacterianas e condições de crescimento

Foram utilizados isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco oriundo de diferentes sítios de infecção (ponta de cateter, fragmento de osso, exsudado purulento, secreção de ferida, secreção de ulcera, secreção traqueal e secreção nasal). A linhagem ATCC foi utilizada como controle de referência em todos os experimentos realizados [19]. Todas as culturas foram mantidas em óleo mineral e crescidas em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller-Hinton a 37°C.

Perfil de susceptibilidade

Os isolados de *S. aureus* foram testados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos de diferentes mecanismos de ação: Ampicilina (AMP) 10 µg, Oxacilina (OXA) 1µg, Ciprofloxacina (CIP) 5µg, Amicacina (AMI) 30µg, Gentamicina (GEN) 10µg, Clidamicina (CLI) 2µg, Clorafenicol (CLO) 30µg e Tetraciclina (TET) 30µg. Os experimentos foram realizados em triplicata por meio do antibiograma, através do método de difusão em discos (Kirby-Bauer) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute [19]. As placas foram incubadas por 24 h a 37 ° C. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e comparados com a tabela padrão para testes de susceptibilidade aos antibióticos e classificados como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R).

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM):

A avaliação antimicrobiana dos OE's das espécies de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* foi realizada em modelo experimental de microdiluição seriada, conforme descrito pela CLSI [19] em placas de 96 poços. A suspensão de bactéria foi ajustada à Densidade Ótica (OD₆₀₀) entre 0,150 a 0,200 e em seguida, as placas contendo o meio de cultivo e as amostras (microrganismo e OE's) foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura das microplacas foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm nos tempos de 0h e 24h. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano. A CBM foi realizada nas mesmas condições da CIM e determinada como a menor concentração do composto para a qual não foi observada bactéria viável. Os antibióticos ampicilina e tetraciclina foram utilizados como controle.

Avaliação da capacidade bactericida e bacteriostática

A atividade antibacteriana sobre um microrganismo pode ser observada através da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e também através da relação CBM / CIM onde pode-se determinar o índice de multirresistência. Se a razão CBM / CIM = 1 ou 2, o efeito é considerado bactericida, mas se a razão CBM / CIM = 4, 8, 16 ou 32, o efeito é definido como bacteriostático [20].

Ensaio da Curva de Crescimento

Para o ensaio da curva de crescimento seguiu-se a metodologia proposta por Klepser et al [21] com algumas modificações, no qual cepas de isolados clínicos de *S. aureus* foram submetidos à morte celular por exposição aos óleos essenciais testados nas concentrações da CBM nos períodos de tempo de 0,1,2,3,4,5,6,8, 10, 12, 18, 22 e 24h. Em placa de 96 cavidades foi colocado o meio Mueller-Hinton caldo (pH 7,2), os antibióticos, as amostras (óleo) e as bactérias completando um volume final de 200 µl em cada poço. Como controle positivo da morte celular foi utilizado meio de cultura acrescido de antibiótico, o controle negativo corresponde ao meio de cultura junto ao microrganismo e o controle de esterilidade contendo apenas o meio de cultivo. Após a leitura de 0h, as placas foram incubadas a 37°C e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, calculadas suas médias e desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram aceitos como estatisticamente significantes em comparação com o grupo controle. O software *GraphPad Prism 5.0* foi utilizado para análises estatísticas assim os gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização

O proceso de hidrodestilação das folhas de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* geraram um óleo essencial com rendimentos médios de 0,65%, 0,90% e 3,27% respectivamente. Vinte e cinco componentes do OE de *X. frutescens* (Tabela 1) foram identificados de acordo com a análise GC/MS e GC/FID representando 99.40% da composição química do óleo. O óleo mostrou-se ser rico em sesquiterpenos (97.94%). Bicyclogermacreno (30.91%) foi o constituinte majoritário, seguido por viridifloreno

(27.19%), β -cariofileno (13.62%), Allo aromadendreno (6.91 \pm 0.00) e α -humuleno (5.50 \pm 0.00).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Xylopia frutescens*.

Compostos	IR ^a	IR ^b	Área (%)	Método de identificação
(E)- β -ocimeno	1039	1044	0.46	IR, MS
α -cubebeno	1342	1345	0.70	IR, MS
Longipineno	1347	1350	0.58	IR, MS
β -patchouleno	1372	1379	0.75	IR, MS
β -cubebeno	1383	1387	0.84	RI, MS
β-cariofileno	1414	1417	13.62	IR, MS, CI
β -humuleno	1431	1436	1.39	IR, MS
α -guaiano	1433	1437	0.34	IR, MS
Aromadendreno	1436	1439	0.40	IR, MS
α-humuleno	1448	1454	5.50	IR, MS, CI
Allo aromadendreno	1454	1558	6.91	IR, MS
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1472	1475	0.45	IR, MS
γ -muuroleno	1473	1478	0.90	IR, MS
Germacreno D	1482	1484	1.09	IR, MS
Viridifloreno	1490	1496	27.19	IR, MS
Biciclogermacreno	1496	1500	30.91	IR, MS
α -muuroleno	1501	1500	0.46	IR, MS
γ -cadineno	1508	1513	0.23	IR, MS
β -curcumeno	1511	1514	0.26	IR, MS
β -sesquifellandreno	1517	1521	0.92	IR, MS
δ -cadineno	1519	1522	1.96	IR, MS
γ -vetiveno	1526	1531	0.91	IR, MS
10-epi-cubebol	1529	1533	0.93	IR, MS
α -cadineno	1531	1537	0.50	IR, MS
Germacreno	1550	1559	0.20	IR, MS
Monoterpenos			0.46%	
Sesquiterpenos			97.94%	
Total			98,40 \pm 0,00	

^a Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos numa coluna capilar de 30m DB-5. ^b Índices de retenção linear da literatura. IR = índice de retenção, MS = espectro de massa, CI = co-injeção com padrões autênticos.

Resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com dados reportados na literatura para óleo essencial de *X. frutescens* de diferentes localidades da região Nordeste [22,23] e Sudeste do Brasil [24]. A presença de biciclogermacreno, γ -muuroleno, spathulenol, germanceno D e alguns outros compostos identificados no OE de *X. frutescens* é relatado em óleos essenciais de outras espécies da família Annonaceae. A análise da composição química do óleo essencial das folhas de *Annona foetida* (Annonaceae) constatou que o seu componente majoritário foi o biciclogermacreno (35,12%). Outros compostos como α -humuleno (2,22%),

Aromadendreno (1,81%), Allo-aromadendreno (1,51%) e spathulenol (1,11%) também estavam presentes, mas, em pequenas concentrações^[25].

Para o gênero *Xylopi*a, Germacreno D (27,0%), biciclogermacreno (12,8%), (E)-cariofileno (8,6%), γ -muuroleño (8,6%), δ -cadineno (6,8%) e germacreno B (6,0%) foram os principais componentes do óleo essencial das folhas de *X. laevigata*^[26], *X. brasiliensis* apresenta o sesquiterpeno Spathulenol (40,8%) como composto majoritário seguido pelos monoterpenos 1,8-cineol (11,1%) e verbenona (11,1%) como constituintes do óleo essencial extraído das folhas^[27]. O Spathulenol é considerado um marcador quimiotaxonômico para Annonaceae, por se tratar de um sesquiterpeno comum para a maioria das espécies desta família^[28].

A tabela 2 mostra os constituintes químicos do OE de *E. umbrosa*, listando um total de 32 compostos representando 96.07% do óleo. Todos os compostos identificados são pertencentes a classe dos sesquiterpenos. O constituinte majoritário foi o β -copaeno-4 α -ol (25.03), seguido por β -vetiveno (11.69%), β -patchouleno (7.80%), ar-curcumeno (7.24%) e *cis*-thujopsadieno (6.75%).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial das folhas de *E. umbrosa*.

Compostos	IR ^b	IR ^a	Área (%)	Método de identificação
mirtenil acetato	1324	1320	0.66	IR, MS
δ -elemeno	1335	1330	0.85	IR, MS
Silphiperfol-4,7-(14)-dieno	1358	1361	0.80	IR, MS
Linalool isobutanoato	1373	1369	0.88	IR, MS
β-patchouleno	1379	1375	7.80	IR, MS
β -panasinseno	1381	1379	0.42	IR, MS
α -gurjuneno	1409	1405	1.33	IR, MS
2-epi- β -funebreno	1411	1418	0.98	IR, MS
Neo- α -cloveno	1452	1449	0.81	IR, MS
<i>cis</i>-thujopsadieno	1464	1465	6.75	IR, MS
Acoradieno	1469	1466	0.62	IR, MS
Cumacreno	1470	1472	2.05	IR, MS
10-epi-acoradieno	1474	1476	2.13	IR, MS
γ -gurjuneno	1475	148	1.50	IR, MS
β -chamigreno	1476	1479	1.39	IR, MS
ar-curcumeno	1479	1483	7.24	IR, MS
valenceno	1496	1490	0.60	IR, MS, CI

<i>trans</i> -cicloisolongifol-5-ol	1513	1516	5.59	IR, MS
Nootkateno	1517	1519	1.15	IR, MS
γ -himachaleno	1530	1530	1.65	IR, MS
γ -vetiveno	1531	1532	0.75	IR, MS
10-epi-cubebol	1533	1536	0.82	IR, MS
β -Silphiperfol-5-em-3-ol	1534	1540	0.49	IR, MS
α -copaeno-11-ol	1541	1544	0.96	IR, MS
Selina-3,7-(11)-dieno	1545	1549	0.65	IR, MS
occidentalol	1550	1551	0.45	IR, MS
norpatchoulenol	1553	1553	1.17	IR, MS
β-vetiveno	1554	1560	11.69	IR, MS
spathulenol	1577	1572	3.36	IR, MS
Óxido de cariofileno	1582	1577	3.90	IR, MS, CI
Allo cerol	1598	1593	1.60	IR, MS
β-copaeno-4α-ol	1590	1597	25.03	IR, MS
Sesquiterpenes			96.07%	
Total			96.07%	

^a Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos numa coluna capilar de 30m DB-5. ^b Índices de retenção linear da literatura. RI = índice de retenção, MS = espectro de massa, CI = co-injeção com padrões autênticos.

A constituição química de outras espécies vegetais do gênero *Eugenia* apresentam uma complexa mistura de constituintes. A caracterização química do óleo essencial de *E. uniflora* demonstrou que os seus constituintes majoritários foram a Atractilona (26,78%), Curzereno (17,96%) e Germacreno B (9,31%) e em pequenas quantidades o Spathulenol (1,08%) e δ -elemeno (0,16%) [29]. Outro estudo realizado com a mesma espécie apresentou como principais componentes Spathulenol (15,8%), α -copaeno (10,96%) Muurola 4,10-dieno-1- β -ol (9,3%), óxido de Cariofileno (8,93%) e Allo-aromadendreno (5,5%) [30]. A caracterização do óleo essencial de *E. caryophyllata* demonstrou uma alta concentração de eugenol (88,58%) [31]. Para o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial de *E. umbrosa*.

O gênero *Eugenia* possui muitas espécies ricas em óleos essenciais com inúmeras atividades biológicas, incluindo antidiarreico [32], antifúngica [33], antileucêmica [34], antiviral [35], antimicoplasmática [36] têm sido relacionadas a elas além de seus constituintes químicos bem estabelecidos.

A presença de alguns compostos nos óleos essenciais pode diferir entre as diferentes espécies das famílias vegetais ou até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Este fato pode estar relacionado ao modo de extração do óleo essencial ou o estado do material no momento da extração. Os aspectos ambientais como temperatura, altitude, solo, luz,

sazonalidade, disponibilidade hídrica, além da maturidade da planta, herbivoria e ataque de patógenos podem alterar a constituição química e a quantidade de cada componente presente em uma amostra vegetal [37,38]. Um desses aspectos foi observado no estudo realizado por Zatelli et al [36] com o OE de *E. hiemalis*. Os autores observaram que houve uma mudança nas proporções dos constituintes de acordo com o período sazonal que os OE's foram coletados. O Spathulenol e δ -cadineno foram os principais compostos no inverno e outono, respectivamente, enquanto o biciclogermacreno e o β -cariofileno apresentaram maiores índices na primavera e no verão. Os coeficientes de variação dos compostos variam de 7% a 81%. Estes aspectos podem intervir de forma direta na qualidade e conseqüentemente, nos resultados de tratamento e dos testes biológicos [39].

A técnica de cromatografia gasosa para óleo essencial de *C. dichotoma* não conseguiu identificar seus componentes majoritários. A caracterização exige um índice de confiabilidade de pelo menos 95%. Desta maneira, não foi possível estabelecer o percentual dos constituintes de *C. dichotoma* devido os majoritários representarem a maior porcentagem não identificada do óleo. Outras técnicas mais sensíveis são necessárias para identificação dos componentes de *C. dichotoma*. Uma delas é a ressonância magnética nuclear-RMN. Esta técnica tem como vantagem fornecer uma análise espectral de um único espectro de hidrogênio e assim proporcionar informações como estrutura e composição química dos principais constituintes presentes em uma determinada amostra [40].

Atividades Antioxidantes

Os óleos essenciais de muitas espécies vegetais já são bem conhecidos pela ação antioxidante [41,42,43]. É uma propriedade biológica de grande interesse para a indústria alimentícia, devido a sua aplicabilidade na preservação dos alimentos contra ação oxidativa. Além disso, os antioxidantes naturais têm ganhado notoriedade, uma vez que há relatos de que os antioxidantes sintéticos como o BHT e o BHA possuem potencial cancerígeno [44].

No processo da avaliação da ação antioxidante, devem-se considerar dois parâmetros distintos. O primeiro é a efetividade do antioxidante em eliminar os radicais livres, o que pode ser determinada pela sua concentração e reatividade. E o segundo parâmetro, trata-se do espectro de ação do antioxidante que é modulado, dentre outros fatores, por sua solubilidade. Desta maneira, para avaliar o potencial antioxidante, *in vitro*, de uma determinada amostra, é

necessária a utilização de mais de um método [28]. Portanto, os OE's de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* foram avaliados por diferentes métodos.

Os métodos colorimétricos como o DPPH e o ABTS são relativamente simples e baseia-se na capacidade de um agente antioxidante reduzir os radicais livres presentes no meio [45]. A avaliação da capacidade de captura do radical livre DPPH pelos óleos testados é mostrado na Fig. 1. O óleo essencial de *X. frutescens* apresentou um $IC_{50}=391,3 \mu\text{g/ml}$ (355,0 a 431,1 $\mu\text{g/mL}$), com um percentual de sequestro de $94,34 \pm 2,60 \%$ na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para o óleo essencial de *C. dichotoma*, o percentual de sequestro máximo foi de $50,79 \pm 3,06 \%$ e com um $IC_{50}=993,9 \mu\text{g/ml}$ (906,3 a 1,090 $\mu\text{g/mL}$). Já o óleo essencial de *E. umbrosa* (ABA) apresentou o menor percentual de sequestro dentre os óleos testados $34,39 \pm 1,82\%$ na concentração 1000 $\mu\text{L/mL}$.

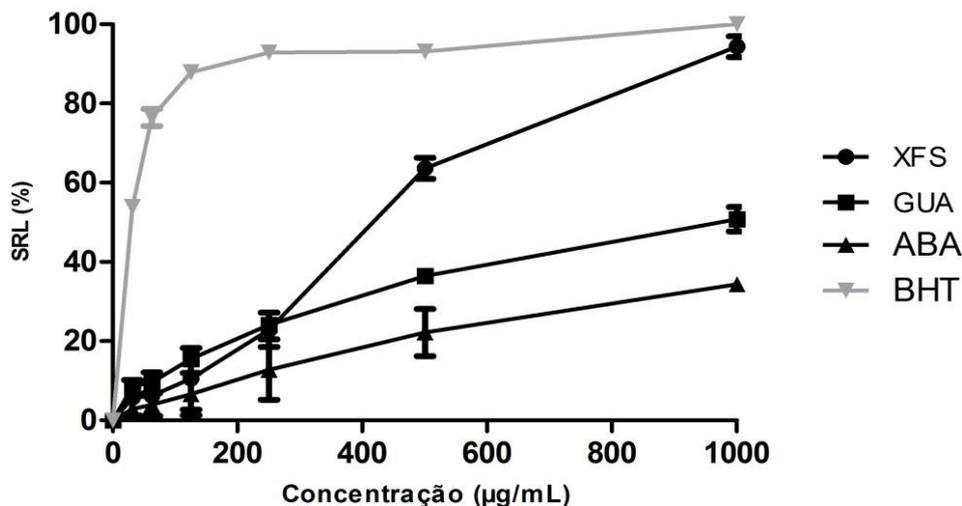


Figura 1: Porcentagem de sequestro de radicais livres nas diferentes concentrações dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*; BHT: butilhidroxitolueno.

Os óleos essenciais testados foram fracos sequestradores de radical DPPH comparados com o BHT ($IC_{50} = 35,04 \mu\text{g/mL}$). Porém, apresentaram significativa inibição no ensaio de eliminação de radicais ABTS. *X. frutescens* apresentou uma taxa máxima de eliminação de $93,60 \pm 2,46\%$, enquanto *C. dichotoma* inibiu $73,94 \pm 1,66 \%$ e *E. umbrosa* $43,99 \pm 2,57\%$. Os OE's de *X. frutescens* e *C. dichotoma* demonstraram ser mais ativos na inibição pelo método do ABTS que o padrão BHT ($58,96 \pm 2,08 \%$).

É relatado que óleos essenciais ricos em monoterpenos aromáticos ligados a grupos fenólicos possuem boa atividade antioxidante, enquanto os ricos em sesquiterpenos hidrocarbonetos apresentam fraca ação antioxidativa [46]. Desse modo, os resultados obtidos nos OE's *X. frutescens* e *E. umbrosa* para a atividades de sequestro de radicais livres, corrobora com o que é descrito na literatura.

A atividade antioxidante total (ATT) baseia-se na redução de íons metálicos. Corresponde a um método que determina quantitativamente a capacidade antioxidante através da formação de complexo fosfomolibdênio, onde o Mo(VI) é reduzido a Mo(V) formando o complexo de fosfato de molibdênio. A solução inicial possui coloração amarela, e sob condições de pH ácido, a solução de fosfato de molibdênio se reduz e ocorre a mudança para coloração verde [47].

Os resultados do ensaio de ATT exibidos na fig. 2 mostraram que o óleo essencial de *X. frutescens* e *E. umbrosa* foram capazes de reduzir o complexo fosfomolibdênio com o percentual de $96,11 \pm 4,41\%$ e $114,69 \pm 2,85\%$ respectivamente, comparáveis ao padrão ácido ascórbico. Entretanto, o óleo de *C. dichotoma* apresentou fraca capacidade antioxidante neste ensaio ($10,96 \pm 0,33\%$).

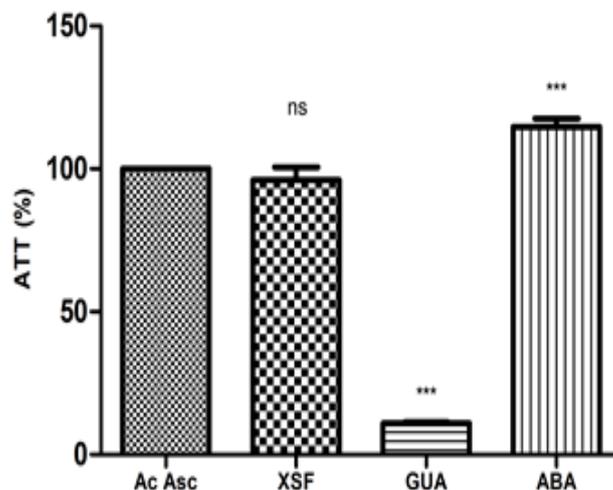


Figura 2: Atividade antioxidante total dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. Amostras comparadas com o controle da atividade (ácido ascórbico). Os resultados são expressos em média e desvio padrão. *** amostra significativamente diferente; ns – amostra não significativamente diferente; Significância $P < 0,05$. XSF: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa* Ac Asc: Ácido Ascórbico.

Este método possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto hidrofílicos, constitui em um método simples de avaliar a

capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de óleos essenciais [48].

Os óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* também foram avaliados pelo método da peroxidação lipídica para verificar o percentual de inibição (I %) de radicais livres (Figura 3). *X. frutescens* apresentou uma I% de $6,44 \pm 4,88\%$. Já *C. dichotoma* e *E. umbrosa* apresentaram uma I% de $4,78 \pm 0,59\%$ e $3,34 \pm 0,49\%$ respectivamente. O padrão quercetina apresentou uma taxa inibitória de $27,92 \pm 1,69\%$. A atividade inibitória da peroxidação dos óleos essenciais testados é relativamente baixa, ainda assim apresenta-se mais ativos comparados aos padrões Trolox ($1,15 \pm 0,27\%$) e BHT ($0,75 \pm 0,45\%$).

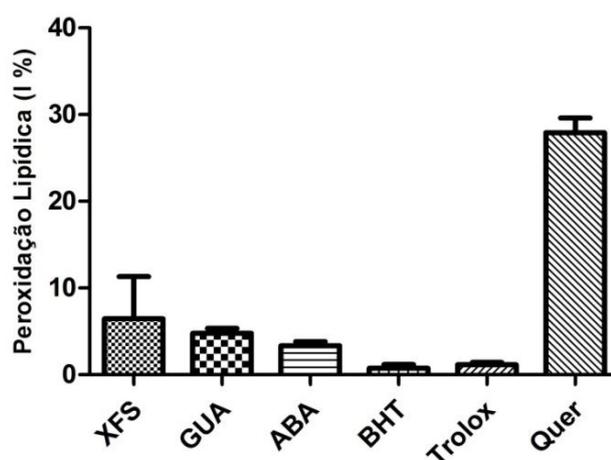


Figura 3: Peroxidação lipídica dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*; BHT: butilhidroxitolueno; Quer: Quercetina.

No método da peroxidação lipídica, o ácido linoléico sofre oxidação devido ao calor (40°C) resultando na formação de radicais LOOH. Se na amostra teste alguma molécula antioxidante estiver presente, esses radicais serão eliminados e, portanto, não ocorrerá a oxidação do Fe(II)-Tiocianato no passo seguinte da reação [49].

Atividade Hemolítica

O óleo essencial de *X. frutescens* na concentração de $500\mu\text{g/mL}$ apresentou um baixo percentual hemolítico de $0,201 \pm 0,156\%$ e a menor concentração ($31,25\mu\text{g/mL}$) não exibiu nenhum grau de hemólise (Figura 6). Os óleos essenciais de *C. dichotoma* e *E. umbrosa* demonstraram uma taxa de hemólise de $3,483 \pm 0,452\%$ e $1,565 \pm 0,340\%$ respectivamente, nas maiores concentrações testadas (Figura 4). Todos os óleos testados demonstraram baixa citotoxicidade.

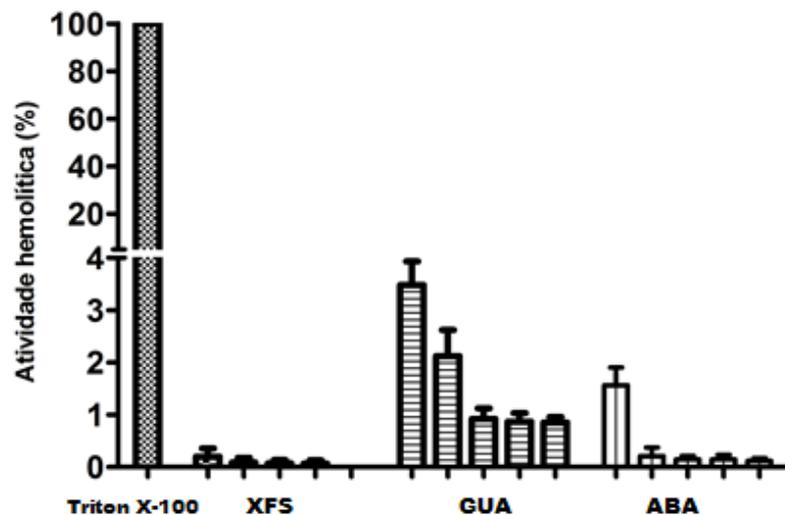


Figura 4: Atividade hemolítica dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa*. Atividade hemolítica em porcentagem de óleo essencial nas concentrações: 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 microgramas / mL. XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*; Triton X-100: controle positivo.

A atividade hemolítica consiste na dissolução de eritrócitos, membranas celulares, aumento da permeabilidade de membranas e lise celular. Este método avalia a ruptura de membrana e a morte celular, ou seja, consistem na verificação de possíveis danos que uma determinada substância pode causar em eritrócitos que quando lisados liberam hemoglobina ao meio ^[50]. A hemólise é consequência da ação de substâncias sobre as membranas dos eritrócitos como medicamentos ou extratos/óleos de plantas ^[4].

A atividade citotóxica de algumas plantas com propriedades medicinais já foi investigada, contudo, em decorrência da grande biodiversidade do Brasil, as propriedades terapêuticas de inúmeras espécies botânicas continuam indeterminadas ^[51].

Atividades antimicrobianas

A resistência antimicrobiana corresponde a uma insusceptibilidade relativa que um determinado microrganismo apresenta a um tratamento específico, sob determinadas condições ^[52]. De todo modo, sempre que houver uma mudança de susceptibilidade que causa uma ineficácia de um antibiótico contra um determinado microrganismo, este organismo é conhecido como resistente. E essa resistência, deve-se a fatores fisiológicos e bioquímicos de cada organismo em particular ^[53]. Para o teste de susceptibilidade, 19 cepas de *S. aureus* foram testadas a fim de averiguar seu perfil de sensibilidade aos diferentes antibióticos (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil de resistência dos isolados clínicos de *S. aureus* frente aos antimicrobianos penicilinas, Quinolonas, aminoglicosídeos, Lincosaminas, Cloranfenicol e Tetraciclina.

	AMP	OXA	CIP	AMI	GEN	CLI	CLO	TET
02	S	S	S	S	S	S	S	S
659	R	R	R	R	R	R	I	R
662	R	R	S	S	S	S	S	R
670	S	S	S	S	S	S	S	S
671	R	R	R	R	R	R	R	I
672	R	S	S	S	S	S	S	R
679	R	R	S	S	S	S	S	S
683	R	R	R	R	R	R	S	I
691	S	S	R	I	S	S	R	S
699	R	R	S	S	S	S	S	S
700	R	R	R	R	R	R	R	R
705	S	S	R	S	S	S	S	S
709	R	R	R	R	R	R	R	I
718	S	S	R	S	S	S	S	S
726	R	R	R	R	R	R	R	I
731	R	S	I	S	S	R	R	S
733	R	R	R	S	S	S	R	S

Legenda: S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente

Os antibióticos testados representam classes de drogas importantes para o tratamento de infecções bacterianas. De modo geral, todos os isolados, com exceção da cepa 02, apresentaram resistência a mais de uma classe de antibióticos sendo a Ampicilina, Oxacilina e Ciprofloxacina os mais susceptíveis.

Ampicilina e Oxacilina são penicilinas que corresponde a primeira classe de antibióticos descobertos e que foram utilizados exhaustivamente na clínica. A resistência à penicilina foi observada em *S. aureus*, pouco tempo após a sua liberação e se espalhou rapidamente no ambiente hospitalar no início da década de 1950. Sua resistência a penicilinas ocorreu por aquisição da penicilinase PC1 plasmídica, codificada pelo gene *blaZ* [54]. Outros antibióticos Quinolona como a Ciprofloxacina são drogas sintéticas, ou seja, não são encontradas na natureza e trinta anos após a sua introdução na clínica já é observada uma resistência generalizada. Para se ter uma ideia, estudos genômicos propõem que a resistência a essa classe de antibiótico foi um fator concludente para a evolução de MRSA em hospitais [55].

A multirresistência observada para as dezoito cepas avaliadas nesse ensaio pode ser atribuída ao ambiente as quais as mesmas foram isoladas. Provavelmente, por sofrer uma

maior pressão seletiva devido à exposição contínua a esses agentes no ambiente hospitalar, esses isolados clínicos acabaram por desenvolver mecanismos de defesa e assim tornam-se resistentes. O uso descontrolado de antibióticos certamente é outro fator que contribui para o aumento da resistência [56].

A multirresistência está se tornando cada vez mais comum entre os microrganismos patogênicos. Essa resistência pode ser observada em praticamente todas as classes de antibióticos, tornando uma necessidade à busca por novos medicamentos. Este fato colabora com o crescente interesse em substâncias antimicrobianas de fontes naturais. Os óleos essenciais são fontes de inúmeras moléculas e vêm sendo bastante estudados devido as suas propriedades antimicrobianas [57,58,59].

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é um método bastante utilizado nos testes com microrganismos para definir a menor concentração de uma substância que inibe o crescimento dos organismos após um determinado período de tempo de incubação (24h ou mais para os anaeróbios). As concentrações dos antibióticos ou dos compostos com propriedades antimicrobianas são definidas pela duplicação, ou seja, a diluição das concentrações para mais ou para menos a partir de 1mg/mL^[60]. Assim, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* foi avaliada contra nove isolados clínicos de *S. aureus*. A Tabela 4 apresenta esses resultados.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cepas de *S. aureus*.

Cepas de <i>S.aureus</i>	XFS(mg/mL)		CMB/CIM	GUA(mg/mL)		CMB/CIM	ABA(mg/mL)		CMB/CIM	AMP	TET
	CIM	CBM		CIM	CBM		CIM	CBM		(mg/mL)	(mg/mL)
02	4	4	1	>2	4	2	2	4	2	0,03125	0,1
679	4	>4	1	4	>4	1	4	4	1	0,05	0,03125
683	4	4	1	4	4	1	4	4	1	0,05	>0,5
699	4	>4	1	0,5	2	4	4	>4	1	0,1	>1
700	4	4	1	2	4	2	2	2	1	0,025	0,25
705	4	4	1	2	2	1	2	2	1	0,0031	<0,03125
709	4	4	1	2	4	2	4	4	1	0,025	0,0625
731	4	4	1	2	4	2	1	2	2	0,05	<0,03125
733	4	4	1	2	>4	2	4	4	1	0,0125	<0,03125

Legenda: CBM: Concentração Bactericida Mínima; MIC: Concentração Inibitória Mínima; XFS: *X. frutescens*; GUA: *C. dichotoma*; ABA: *E. umbrosa*; AMP: Ampicilina; TET: Tetraciclina. CMB/CIM: Índice de multirresistência.

O óleo essencial de *X. frutescens* para maioria das cepas testadas apresentou uma CIM no valor de 4 mg/mL. O mesmo pode ser observado para o OE de *C. dichotoma* exceto para cepa 699, no qual a inibição ocorreu na concentração de 0,5 mg/mL. Já o OE de *E. umbrosa* apresentou diferentes valores de CIM para as cepas analisadas. Além disso, os OE's testados

na maioria das cepas são bactericidas, pois a razão CBM/CIM variou entre 1 e 2 exceto para o OE de *C. dichotoma* (GUA) na cepa 699 no qual o índice de multirresistência foi de 4 sendo assim, bacteriostático.

As nove estirpes de *S. aureus* utilizadas foram selecionadas devido ao seu grau de resistência aos antimicrobianos, conforme observado no teste de susceptibilidade. Os resultados da CIM apresentam valores moderados, porém foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* multirresistentes. De fato, o número de bactérias multirresistentes vem crescendo a uma taxa alarmante causando sérios prejuízos para os sistemas de saúde além de resultar em altos níveis de mortalidade. Assim, a busca por novas moléculas com potencial antibacteriano, é um passo fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos.

Alguns estudos ^[61,62] relacionam os constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais como o responsável pelas atividades biológicas apresentadas por eles. Mendes et al ^[28] relacionou a ação antimicrobiana exercida pelo OE de *X. sericea* contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, especialmente *S. aureus*, ao sesquiterpeno spathulenol. Costa et al ^[25] analisando os OE's de *A. foetida* observou que eles são ricos em sesquiterpenos e apresentaram importante atividade antimicrobiana. Os autores atribuíram sua atividade a presença conjunta do Bicyclogermacreno com o (E) – cariofileno sendo este último relatado em óleos essenciais que apresentam atividade antimicrobiana. Dessa maneira, a atividade antimicrobiana do OE de *X. frutescens* pode estar relacionada a presença do Bicyclogermacreno assim como do spathulenol em *E. umbrosa*. Entretanto, o Bicyclogermacreno também é relatado para atividade antifúngica ^[63]. Em relação à CBM, a maioria dos óleos testados foram bactericidas na concentração de 4mg/mL. Os OE's são muito utilizados para testes antimicrobianos devido a sua eficiente ação bacteriostática assim como microbicida. Sobeh et al ^[30] analisando o OE de *E. uniflora*, verificou que mesmo na maior concentração testada do OE (10 mg/mL), não foi eficiente contra *S. aureus* (ATCC). Resultado semelhante foi observado por Martins et al ^[2] para o OE de *Aeollanthus suaveolens* frente a *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *S. aureus*. Os autores relataram que a concentração de 100mg/mL não foi bactericida para *S. aureus*. Estes estudos diferem dos resultados obtidos no presente trabalho.

A maior parte dos estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de OE's examina principalmente a atividade dependente da concentração do composto pelo método de microdiluição, enquanto que a atividade dependente do tempo analisadas pelo método das curvas de morte/crescimento, não são bem investigadas. Este é um ensaio que visa verificar o tempo aproximado da morte de um microrganismo em relação à concentração de um

composto. É um método mais preciso, pois permite verificar o tempo de resposta e a melhor concentração no qual um determinado composto age sobre o microrganismo ^[64]. Nesta técnica o produto a ser testado é colocado junto ao microrganismo de interesse por um tempo específico e lido em intervalos pré-estabelecidos. Variações da técnica incluem temperatura, agitação, adição de agentes químicos, entre outros ^[65]. Assim, o ensaio da curva de crescimento foi realizado com quatro cepas de *S. aureus* (02, 699, 700 e 733) que apresentaram os melhores valores de CBM. As curvas são ilustradas na figura 5.

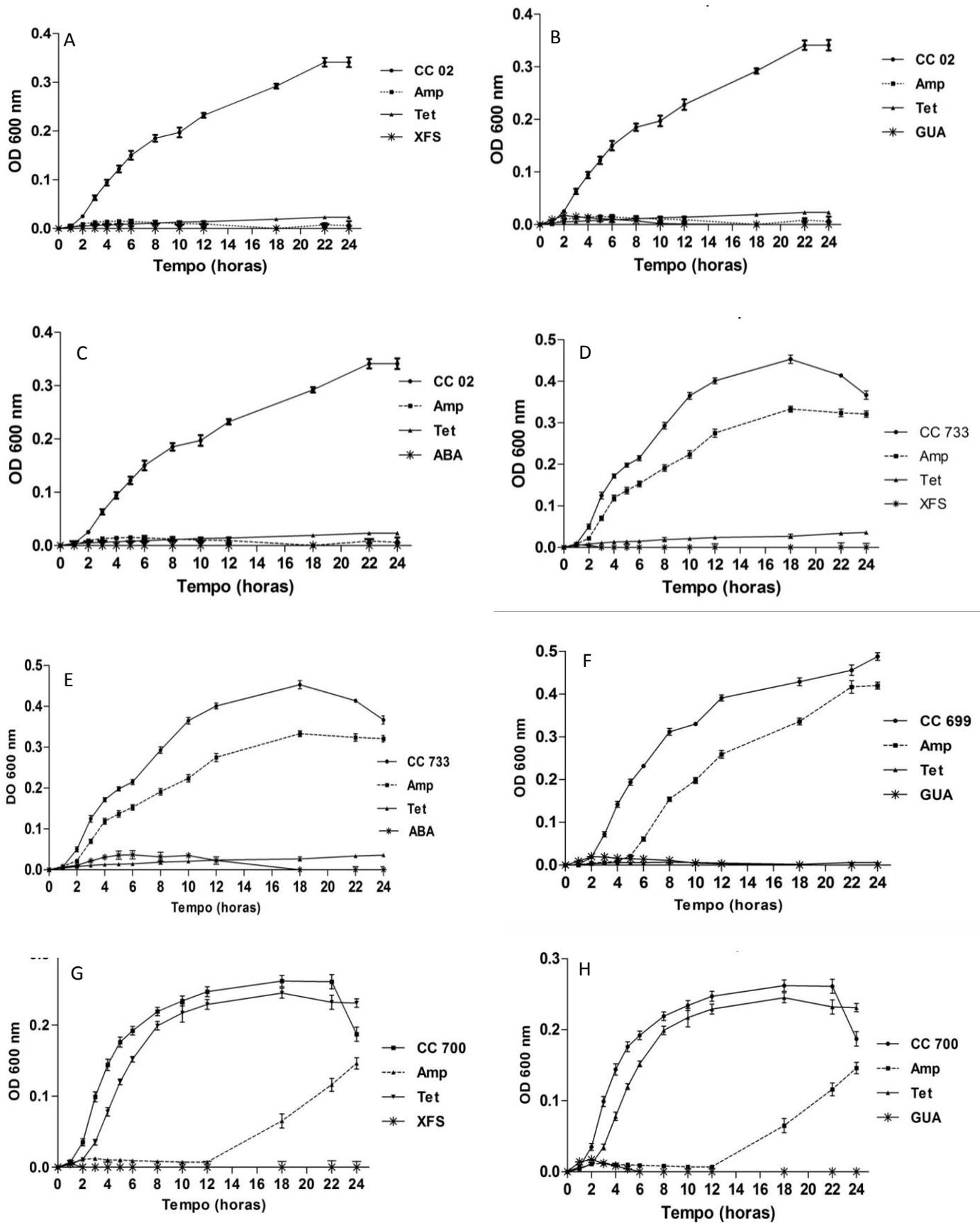


Figura 5: Curva de crescimento dos óleos essenciais de *X. frutescens*, *C. dichotoma* e *E. umbrosa* para as diferentes cepas de *S. aureus*. A,D e G = curva de crescimento do óleo essencial de *X. frutescens* (XFS) frente as cepas 02, 733 e 700, respectivamente; B, F e H = curva de crescimento do óleo essencial de *C. dichotoma*

(GUA) para as cepas 02,699 e 700, respectivamente; C, E = curva de crescimento do óleo essencial de *E. umbrosa* (ABA) com as cepas 02, 709 e 733, respectivamente. CC – controle de crescimento.

De acordo com os dados mostrados acima, foi possível observar que os OE's agiram nas primeiras horas de contato com as cepas de *S.aureus*. A cinética de morte mostrou que as bactérias foram reduzidas rapidamente, o que não é possível demonstrar apenas com os resultados da CIM ou CBM. Assim, as curvas de crescimento fornecem um dado mais preciso dessa reposta bacteriana aos OE's do que apenas uma simples medição estática [66]. Além desses dados, outras informações podem ser obtidas por este método. Selestino Neta et al [67] avaliou a cinética de morte para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e concluiu que a morte ocorria mais rapidamente (primeiras 4 h para *S. aureus*) e mais tardiamente para os microrganismos do outro grupo.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato sobre a análise dos componentes voláteis das folhas de *E. umbrosa*. Trata-se também do primeiro estudo a cerca das atividades antimicrobiana, antioxidante e hemolítica para os três óleos analisados. Baseado nesses resultados, podemos indicar que a melhor atividade antioxidante para os OE's testados foi observada no método do fosfomolibdênio, com destaque para o OE de *X. frutescens* que apresentou também resultados satisfatórios nos demais métodos. A CIM/CBM para a maioria das cepas de *S. aureus* foi moderada/alta, com as concentrações de 2mg/mL e 4mg/mL capazes de inibir e matar respectivamente, esses patógenos multirresistentes, sendo observado também através da curva de crescimento.

REFERÊNCIAS

1. Barreiro EJ, et al. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: Simões CMO, Schenkel PE, Gosmann G, Mello PCJ, Mentz AL, Petrovick RP. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6^{ed}. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p147–209, 2007.
2. Martins RL, et al. Chemical Composition, an Antioxidant, Cytotoxic and Microbiological Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. *PLoS ONE*. 11(12): e0166684, 2016.
3. Pereira AB. Mata Atlântica: uma abordagem geográfica. *Nucleus*, v.6, n.1, 2009.
4. Paula CS. et al. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas. 16(2): 189-195, 2014.
5. Ferraz RPC, et al. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopiya frutescens* Aubl. (Annonaceae). *Food Chemistry*. 141(1):196-200, 2013.
6. Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica. Práticas integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. *Cadernos de Atenção Básica*. 31, p.156, Brasília, 2012.
7. De Corte BL. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 59 (20): 9295–9304, 2016.
8. Alam F, et al. Updates on Managing Type 2 Diabetes Mellitus with Natural Products: Towards Antidiabetic Drug Development. *Curr Med Chem*. 2016.
9. Singh, I. P e Mahajan, S. Berberine and its derivatives: a patent review (2009 -- 2012). *Expert Opin. Ther. Patents* 23(2), 2013.
10. Martins RL, et al. Chemical Composition, an Antioxidant, Cytotoxic and Microbiological Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. *PLoS ONE*, 11(12): e0166684, 2016.
11. Teixeira ML, et al. *Citrumelo Swingle*: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. *Magistra, Cruz das Almas-BA*. 24(3): 194-203, 2012.
12. Van den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 11:463-471, 1963.

13. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed. *Allured Publishing Corporation: Carol Stream*, p804, 2007.
14. Blois, MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200, 1958.
15. Re R, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10):1231-1237, 1999.
16. Kuskoski, EM. et al. Actividade antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. 24(4): 691-693, 2004.
17. Pietro P, et al. Spectrophotometric quantification of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269(2): 337–341, 1999.
18. Almaaytah A, et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauriporin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide. *Int J Pept Res Ther*. 20(4): 397-408, 2014.
19. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2014.
20. Berche P, Gaillard JL, Simonet M. In Nosocomial Infections Caused by Bacteria and Their Prevention in Bacteriology Edited by: Flammarion Medicine Sciences, 64-71, 1988.
21. Klepser ME, et al. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 1998, p. 1207–1212
22. Souza ILL, et al. Essential oil from *Xylopi frutescens* Aubl. reduces cytosolic calcium levels on guinea pig ileum: mechanism underlying its spasmolytic potential. *BMC Complement Altern Med*. 16(15): 327, 2015.
23. Nascimento AMD, et al. Repellency and larvicidal activity of essential oils from *Xylopi laevigata*, *Xylopi frutescens*, *Lippia pendunculosa*, and their individual compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus, 2016. Ferraz RPC, et al. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopi frutescens* Aubl. (Annonaceae), 2013.
24. Ferraz RPC, et al. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopi frutescens* Aubl. (Annonaceae). *Food Chemistry*. 141(1):196-200, 2013.
25. Costa VE, et al. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Quim. Nova*. 32(1): 78-81, 2009.

26. Da Silva TB, et al. Chemical composition and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). *Nat Prod Commun.* 8(3):403-406, 2013.
27. Lago JHG, et al. Mono and Sesquiterpenes from the Leaf Essential Oil of *Xylopia brasiliensis* Spreng. (Annonaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 15: 406-407, 2003.
28. Mendes RF, et al. The essential oil from the fruits of the Brazilian spice *Xylopia sericea* A. St.-Hil. Presents expressive in-vitro antibacterial and antioxidant activity. *J of Pharmacy and Pharmacology.* 54(12): 3093-3102, 2017.
29. Lago JHG, et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules.* 16: 9827-9837, 2011.
30. Sobeh M, et al. Chemical Profiling of the Essential Oils of *Syzygium aqueum*, *Syzygium samarangense* and *Eugenia uniflora* and Their Discrimination Using Chemometric Analysis. *Chemistry and Biodiversity.* 13(11): 1537-1550, 2016.
31. Chaieb K, et al. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytother Res.* 21(6):501-6, 2007.
32. Galheigo MRU, et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. *Natural Product Research.* 30(10), 2015.
33. Costa TR, et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology.* 72(1-2): 111-117, 2000.
34. Vitek R, et al. Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. *Nat Prod Res.* 2016.
35. Cecílio, AB et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology.* 141(3): 975-981, 2012.
36. Zatelli GA, et al. Antimycoplasmic activity and seasonal variation of essential oil of *Eugenia hiemalis* Cambess. (Myrtaceae). *Nat Prod Res.* 30(17):1961-4, 2016.
37. Lima HRP, et al. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente.* 10(2): 71-77, 2003.
38. Prins CL, et al. Growth regulators and essential oil production. *Braz. J. Plant Physiol.* 22(2): 91-102, 2010.
39. Morais SM, et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 19(1B): 315-320, 2009.

40. Morais SM, et al. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Espécies de Croton do Nordeste Do Brasil. *Quim. Nova*, 29(5): 907-910, 2006.
41. Andrade MA, et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*. 43(2): 399-408, 2012.
42. Mitropoulou G, et al. Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil. *Microb Ecol Health Dis*. 6(26): 26543, 2015.
43. Prakash B, et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*. 47: 381-391, 2015.
44. Tavares LA e Ferreira AG. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via Ressonância Magnética Nuclear. *Quim. Nova*. 29(5): 911-915, 2006.
45. Shalaby EA e Shanab SMM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciencs*. 42(5): 556-564, 2013.
46. Chowdhury JU, et al. Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Bangla J Pharmacol*. 3: 59-63, 2008.
47. Zengin G, et al. Two Ganoderma species: profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food Funct*. 6: 2794-2802, 2015.
48. Campos JS, et al. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 32(3):363-368, 2011.
49. Kenny O, et al. *In Vitro* Protocols for Measuring the Antioxidant Capacity of Algal Extracts. In: Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols. Chap 24. *Methods in Molecular Biology*. Vol 1308. Humana Press, 2015.
50. Miyazaki CMS. et al. Coumarin isolation and comparative study of biological activities of *Pterocaulon alopecuroides* DC and *Pterocaulon lorentzii* Malme. *International Journal of Phytomedicine*. 5: 298-301, 2013.

51. Silva TBC, et al. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16:199, 2016.
52. Carneiro DO, et al. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59(4): 869-876, 2007.
53. Kümmerer, K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54, 311–320, 2004.
54. Farrell DJ, et al. *In Vitro* Activity of Ceftaroline Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*: A Review of Published Studies and the AWARE Surveillance Program (2008–2010). *Clinical Infection Diseases*. (Suppl 3) 55, 2012.
55. Laxminarayan R, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 13(12):1057-1098, 2013.
56. Kon KV e Rai MK. Óleos essenciais de plantas e seus constituintes em lidar com bactérias multirresistentes. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 10(7): 775–790, 2012.
57. Tajkarimi MM, et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21: 1199–1218, 2010.
58. Lucena BFF, et al. Avaliação da Atividade antibacteriana e moduladora de Aminoglicosídeos do Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf. *Acta Biol.Colomb*. 20(1):39-45, 2015.
59. Miranda CASF, et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*. 47(1): 213-220, 2016.
60. Ferrer M, et al. Antibiotic use and microbiome function. *Biochemical Pharmacology* 2016.
61. Ziaei A, et al. Identification of Spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytoterapy Reseach*, 25: 557-562, 2011.
62. Govindarajan M.e Benelli G.; Eco-friendly larvicides from Indian plants: Effectiveness of lavandulyl acetate and bicyclogermacrene on malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 133: 395–402, 2016.

63. Silva L, et al. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(3): 361-367, Jul/Set. 2007.
64. Chalkley LJ e Koornhof HJ. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob. Agents Chemother*. 28(2): 331-342, 1985.
65. Nóbrega HN, et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos por meio de técnica *time kill*. *Rer Inst Adolfo Lutz*. 72(3):226-233, 2013.
66. Barbour M, et al. Application of pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and simulation for the prediction of target attainment of ceftobiprole against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* using minimum inhibitory concentration and time–kill curve based approaches. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 43: 60–67, 2014.
67. Selestino Neta MC, et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time–kill curve studies. *Pharmaceutical Biology*. 55(1): 190–197, 2016.