



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR – PPBM

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
MODULADORA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia brasiliensis* Lam E *Piper  
mosenii* C. DC. ASSOCIADOS A LUZ AZUL DE LED**

RAKEL OLINDA MACEDO DA SILVA

**CRATO – CE  
2019**

RAKEL OLINDA MACEDO DA SILVA

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
MODULADORA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia brasiliensis* Lam E *Piper  
mosenii* C. DC. ASSOCIADOS A LUZ AZUL DE LED**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:**

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

**CRATO**

**2019**

Ficha Elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA  
Bibliotecária - Ana Paula Saraiva de Sousa - CRB 3/1000

Silva, Rakel Olinda Macedo da.  
S586p Perfil químico e avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC. Associados a luz azul de led/ Rakel Olinda Macedo da Silva. – Crato-CE, 2019  
78p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. *Eugenia brasiliensis*, 2. LED, 3. *Piper mosenii*, 4. Resistência bacteriana, 5. Modulação; I. Título.

CDD: 615.3

**RAKEL OLINDA MACEDO DA SILVA**

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
MODULADORA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia brasiliensis* Lam E *Piper  
mosenii* ASSOCIADOS A LUZ AZUL DE LED**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Dissertação apresentada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA  
(Orientador da Dissertação)

---

Profa. Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues - URCA  
(Avaliador interno)

---

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares - UNILEÃO  
(Avaliador externo)

---

Dr. José Galberto Martins da Costa - URCA  
(Avaliador interno - Suplente)

Dedico este trabalho ao meu filho **Mauricio**.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade de concretizar meus sonhos e por ter me dado forças para superar as dificuldades.

Ao meu Esposo e filho por todas as vezes em que não estive presente e fui compreendida, por terem sido meu motivo para continuar e meu porto seguro.

A minha sogra Terezinha que acreditou no meu potencial e me impulsionou a chegar ao mestrado.

A toda minha família pelo carinho e apoio durante esta jornada.

A coordenação, responsável técnica e todos os preceptores da Biomedicina – UNILEÃO pelo incentivo sempre e compreensão com as atividades do mestrado.

A minhas amigas Carolina, Livia, Karollyna, Janielle que me ajudaram nos momentos mais difíceis, me incentivando e tornando essa caminhada muito mais fácil (sem vocês eu não teria conseguido).

Ao meu Aluno Walber, pela ajuda nos testes e todo apoio.

A minhas amigas Meks Maiana, Williane e Raíra com quem compartilho minhas angústias e alegrias e que mesmo de longe acompanharam minha trajetória e estão sempre me apoiando.

Ao meu orientador Henrique Douglas por todo suporte, correções e incentivo.

Aos professores do PPBM pelo empenho com qual conduziram as suas disciplinas.

A Universidade Regional do Cariri (URCA) pelo acolhimento.

Às agências brasileiras fomentadoras de pesquisa FUNCAP e FUNEP pelo auxílio financeiro de grande importância para o desenvolvimento das pesquisas.

Aos funcionários e técnicas do Laboratório de Microbiologia da UNILEÃO pela ajuda e atenção dedicadas.

Aos amigos e colegas do PPBM pelo companheirismo e momentos alegres.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

*“Seja forte e corajoso! Não se apavore e nem desamine, porque o senhor teu DEUS é contigo por onde quer que você ande.” (Josué 1:9)*



## RESUMO

A espécie *Eugenia brasiliensis* Lam possui diversas propriedades medicinais e numerosos compostos bioativos e *Piper mosenii* C.DC. pertence a um gênero de grande importância econômica, rico em plantas utilizadas para fins medicinais, com várias atividades biológicas comprovadas. Estas duas espécies são encontradas na Mata Atlântica e possuem composição química terpenóide. Os óleos essenciais extraídos de plantas são amplamente estudados, pois possuem constituintes que atuam no combate aos microrganismos, sendo importantes para a produção novos fármacos que possam tratar infecções causadas por agentes já resistentes às drogas comuns. A terapia luminosa por *Light Emithing Diodes* (LED) também representa uma forma de tratamento usada na cura de infecções, apresentando ação antibacteriana. Neste estudo objetivou-se avaliar a constituição química e o potencial antibacteriano e modulador dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e *Piper mosenii* C. DC.(OEPm) associados a luz azul do LED. Os óleos essenciais das folhas foram obtidos através de hidrodestilação e os componentes químicos foram avaliados por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A avaliação da atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli* padrão ATCC 25922 e multirresistente 06 e *Staphylococcus aureus* padrão ATCC 25923 e multirresistente 10 e a ação moduladora de antibióticos frente a cepas multirresistentes de *E. coli* 06 e *S. aureus* 10 foram testadas utilizando o método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O efeito antibacteriano e combinado com aminoglicosídeos associado ao uso do LED azul também foi determinado. O composto  $\alpha$ -muurolol (12,01%) foi majoritário no OEEb, enquanto que o  $\alpha$ -pineno (14,59%) e o biciclogermacreno (12,25%) foram encontrados em maior quantidade no OEPm. O OEEb apresentou CIM  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$  para *E. coli* e *S. aureus*, enquanto o OEPm apresentou CIM = 512  $\mu\text{g/mL}$  para as cepas de *S. aureus*. No teste de modulação utilizando o OEEb foi possível evidenciar sinergismo quando junto ao macrolídeo norfloxacin frente a *S. aureus* e associado à quinolona eritromicina contra *E. coli*. Para o OEPm foram observadas interações sinérgicas junto aos fármacos gentamicina e eritromicina apenas contra *E. coli*. Uma ação promissora da luz azul de Led foi evidenciada em conjunto com os óleos essenciais testados, potencializando a ação dos antibióticos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, principalmente frente a cepa bacteriana Gram negativa. Estes são dados pioneiros, pois não são encontrados na literatura relatos de atividade moduladora de *E. brasiliensis* Lam e de atividades biológicas de *P. mosenii* C.DC. Os resultados demonstram um potencial antibacteriano do OEPm, bem como atividade moduladora de OEEb e OEPm em associação com antimicrobianos de diferentes classes farmacológicas. A junção destes óleos essenciais com a luz azul de LED revela a presença de compostos químicos fotossensibilizadores nas espécies em estudo, que permitiram a interação da luz com as células bacterianas e os fármacos.

**Palavras-Chave:** *Eugenia brasiliensis*. LED. *Piper mosenii*. Resistência bacteriana. Modulação.

## ABSTRACT

The species *Eugenia brasiliensis* Lam has several medicinal properties and numerous bioactive compounds and *Piper mosenii* C.DC. belongs to a genus of great economic importance, rich in plants used for medicinal purposes, with several biological activities proven. These two species are found in the Atlantic forest and have terpenoid chemical composition. Essential oils extracted from plants are widely studied because they have constituents that act in the fight against microorganisms, being important to produce new drugs that can treat infections caused by agents already resistant to common drugs. Light therapy by Light Emission Diodes (LED) also represents a form of treatment to be used to cure infections and may have antibacterial action. The objective of this study was to evaluate the chemical composition and the antibacterial and modulatory potential of the essential oils of *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) and *Piper mosenii* C. DC. (OEPm) associated with blue LED light. The essential oils from the leaves were obtained by hydro distillation and the chemical components were evaluated by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS). The evaluation of antibacterial activity against *Escherichia coli* standard ATCC 25922 and multidrug resistant 06 and *Staphylococcus aureus* standard ATCC 25923 and multidrug resistant 10 and the modulating action of antibiotics against multiresistant strains of *E. coli* 06 and *S. aureus* 10 were tested using the microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The antibacterial and combined effect with aminoglycosides associated with the use of the blue LED was also determined. The  $\alpha$ -muurolol compound (12.01%) was the majority of OEEb, whereas  $\alpha$ -pinene (14.59%) and bicyclogermacrene (12.25%) were found in greater amounts in OEPm. OEEb had MIC  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$  for *E. coli* and *S. aureus*, while OEPm  $\mu\text{g/mL}$  showed MIC = 512 for *S. aureus* strains. In the modulation test using the OEEb it was possible to show synergism when together with the macrolide norfloxacin against *S. aureus* and associated with quinolone erythromycin against *E. coli*. Synergistic interactions with the drugs gentamicin and erythromycin against *E. coli* were observed for the OEPm. A promising action of the blue LED light was evidenced together with the essential oils tested, potentializing the action of the aminoglycoside antibiotics ampicillin and gentamicin, mainly against the Gram-negative bacterial strain. These are pioneer data, as no reports of modulating activity of *E. brasiliensis* Lam and biological activities of *P. mosenii* C.DC. are found in the literature. The results demonstrate an antibacterial potential of OEPm, as well as modulatory activity of OEEb and OEPm in association with antimicrobials of different pharmacological classes. The combination of these essential oils with blue LED light reveals the presence of photosensitizing chemical compounds in the species under study, which allowed the interaction of light with bacterial cells and drugs.

**Key words:** *Eugenia brasiliensis*. LED. *Piper mosenii*. Bacterial resistance. Modulation.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® Marca registrada

ANOVA - *Analysis of varianses* (Análise de Variância)

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - *Breat Heart Infusion*

CE - Estado do Ceará

CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DIC - Detector de Ionização por Chama

DMSO - dimetilsulfóxido

*et al* - e outros; e colaboradores (latim)

HIA - *Agar Heart Infusion*

LED - *Light Emithing Diodes*

LMBM -Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA)

MBM - Museu Botânico Municipal

NCCLS - Comitê Nacional de Normas de Laboratórios Clínicos

URB - Universidade Regional de Blumenau

URCA - Universidade Regional do Cariri

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 PRODUTOS NATURAIS .....	15
2.2 <i>Eugenia brasiliensis</i> LAM .....	16
2.2.1 Características gerais e botânicas .....	16
2.2.2 Características químicas .....	17
2.2.3 Uso etnofarmacológico .....	18
2.2.4 Atividades biológicas .....	18
2.3 GÊNERO <i>Piper</i> .....	20
2.3.1 Características gerais e botânicas .....	20
2.3.2 Características químicas .....	21
2.3.3 Uso etnofarmacológico .....	22
2.3.4 Atividades biológicas .....	22
2.4 ANTIBIÓTICOS .....	24
2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	25
2.6 FOTOTERAPIA .....	26
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	30
4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	30
4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	31
4.4 ANTIBIÓTICOS, MEIOS DE CULTURA E APARELHO.....	31
4.5 MICRORGANISMOS .....	32
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	32

4.7 PREPARO DOS INÓCULOS .....	32
4.8 PREPARO DOS ANTIBIÓTICOS .....	32
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	33
4.10 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR CONTATO DIRETO .....	33
4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA COM EXPOSIÇÃO À LUZ DE LED AZUL.....	33
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>5 CAPÍTULO I .....</b>	<b>45</b>
<b>6 CAPÍTULO II.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento, cura e prevenção de doenças através das plantas medicinais é umas das mais antigas formas de terapia utilizada pelo homem. O acúmulo de conhecimentos empíricos sobre a ação dessas espécies por diferentes grupos étnicos foi de fundamental importância para a sedimentação dessa prática com passar dos anos (PERFEITO, 2012).

O uso desses vegetais com propriedades medicinais tornou-se relevante para a área da saúde tanto pela sua utilização na forma de fitoterápicos como para descoberta de novos fitofármacos. De acordo com o Ministério da saúde, 25% dos medicamentos elaborados estão relacionados de forma direta ou indireta às plantas medicinais através da união do conhecimento popular às tecnologias modernas (BRASIL, 2012).

No Brasil, essa prática é bastante utilizada e isso se deve principalmente a compatibilidade cultural, fácil acesso e baixo custo. No entanto, muitas espécies ainda permanecem sem estudos químicos (LIMA; LIMA; MACIEL, 2014). Assim, se torna necessária a verificação dos seus constituintes secundários em busca de isolá-los, bem como a avaliação da efetividade de sua ação conhecida de forma empírica (MACHADO et al., 2008).

A espécie *Eugenia brasiliensis* Lam é uma planta florestal nativa pertencente a família Myrtaceae, conhecida popularmente como Grumixama (LORENZI, 2002). Possui uso medicinal, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, ação antibacteriana e antifúngica (GARCIA, 2016; LIMA, 2017; REVILLA, 2002; SIEBERT et al., 2017).

A planta *Piper mosenii* C. DC., pertencente à família Piperaceae, não apresenta atividades biológicas e nome popular relatadas na literatura. Entretanto, está incluída no gênero *Piper*, que possui diversas espécies das quais podem ser extraídos óleos essenciais com importante potencial para produção de novas drogas e que já apresentam atividades biológicas comprovadas, como antimicrobiana e antiproliferativa. (BERNUCI et al., 2016; LOPEZ; HUDSON; TOWES, 2001; VELANDIA et al., 2018).

Estas duas espécies são encontradas na Mata Atlântica e possuem composição química terpenóide em seus óleos essenciais (APEL et al., 2004; FISCHER et al., 2005; KRINSKI; FOERSTE; DESCHAMPS, 2018).

Os óleos essenciais extraídos de plantas são amplamente estudados, pois possuem constituintes que atuam no combate aos microrganismos. Por possuírem muitas aplicações biológicas, como atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica, demonstrando ação efetiva em pesquisas farmacológicas, se tornam importantes para a produção novos fármacos

que possam tratar infecções causadas por agentes resistentes (SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Estes também podem atuar como moduladores da resistência a antimicrobianos, pois apresentam compostos que auxiliam na atividade desses fármacos, potencializando seu efeito (CIRINO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2014; GIBBONS, 2005). Dessa forma, se torna uma alternativa para tratamento de infecções a mistura de compostos bioativos com antibióticos, que resulta muitas vezes em um efeito biológico positivo (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

A terapia luminosa por *Light Emithing Diodes* (LED) também representa uma forma de tratamento a ser usado na cura de infecções, podendo apresentar ação antibacteriana, inibindo espécies como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (LIPOVISKY et al., 2010). Esta é uma alternativa para cicatrização de feridas, reparação tecidual e tratamento de outras patologias de pele, sem causar efeitos colaterais ao paciente (DOURADO et al., 2011).

Desta forma, a ampliação dos conhecimentos relacionados a espécies utilizadas para fins medicinais, através de avaliação dos seus compostos químicos, atividade farmacológica e sua ação combinada com antimicrobianos e outros aparelhos já utilizados para terapia é de fundamental importância tanto para a confirmação e segurança do seu uso terapêutico como para o surgimento de novas formas de tratamento, contribuindo para o combate a resistência microbiana (BLAIR, 2015).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

De acordo com o Ministério da Saúde, as plantas medicinais são aquelas, que cultivadas ou não, são utilizadas com finalidade terapêutica, e estas, são notificadas como drogas vegetais pela ANVISA, sendo elas plantas ou parte das mesmas, que contenham substâncias que desempenham papel terapêutico, após colheita e preparação, usadas íntegras ou trituradas (BRASIL, 2010).

Os medicamentos obtidos exclusivamente através de matéria prima vegetal são conhecidos como fitoterápicos, estes possuem a segurança e efetividade baseados em evidências clínicas e publicações na literatura técnico-científica que demonstram seu uso seguro e efetividade (BRASIL, 2014).

A utilização de plantas como instrumento da manutenção da saúde e bem-estar, coincide com o início da humanidade, pois desde as primeiras civilizações, algumas plantas já eram utilizadas, fossem com finalidade de cura, alimentação ou prevenção de doenças, sendo estas experiências passadas de uma geração para outra, de maneira totalmente empírica (SALVAGNINI et al., 2008; SILVEIRA et al., 2009).

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), uma grande parcela da população mundial ainda faz uso de plantas medicinais, principalmente em países subdesenvolvidos, nos quais existem indivíduos, que por diversas razões, não dispõem total ou parcialmente da medicina moderna (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007).

São vários os fatores que tem contribuído para esta grande utilização, entre esses estão o seu fácil acesso, pois muitas vezes são cultivadas nos quintais, baixo custo, a dificuldade por parte da população em obter assistência médica e o custo elevado de medicamentos industrializados (FONTANELA; SPECK; PIOVEZAN, 2007; ISERHAD et al., 2009; ZENI; BOSIO, 2007).

Baseado neste uso empírico, os óleos essenciais e extratos das plantas medicinais estão sendo amplamente estudados por apresentarem resultados promissores no tratamento de diversas enfermidades e com poucos efeitos colaterais. Estes possuem em sua constituição metabólitos secundários, que apresentam importantes atividades biológicas de interesse farmacológico (HOSSEINZADEH et al., 2017; SOBRINHO et al., 2011; SOUZA et al., 2015).



Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, substâncias com baixo peso molecular, lipofílicas, líquidas, que na maioria das vezes são odoríferas. Muitos apresentam em sua constituição moléculas de natureza terpênica, originadas do metabolismo secundário do vegetal (MORAIS, 2009).

Vários estudos têm demonstrado suas propriedades antioxidantes, atividade antibacteriana frente a cepas Gram positivas e negativas, antifúngica e antiparasitária, representando um potencial na produção de fármacos eficazes para o tratamento de infecções (ANDRADE et al., 2012; SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

## 2.2 *Eugenia brasiliensis* LAM

### 2.2.1 Características gerais

A espécie *E. brasiliensis* é encontrada no Brasil, desde o Norte da Bahia até Santa Catarina, podendo também estar presente em outros estados. Esta espécie é amplamente cultivada devido aos seus frutos que são saborosos e consumidos pelo homem (ARÉVALO et al., 2014; LORENZI, 2002).

É uma árvore de porte médio que apresenta frutificação entre os meses de novembro a dezembro. Os frutos são do tipo baga e possuem forma globosa com cores variadas como amarela, roxo-escuro ou preta e são conhecidos como "cereja brasileira", "ibaporoiti", "grumixaba" e "cumbixaba" (SUGUINO et al., 2011; DONADIO; MÔRO; SERVIDONE, 2002; SARTORI, 2012).

O gênero *Eugenia* possui espécies com grande potencial econômico, utilizadas como plantas ornamentais, na comercialização dos frutos, extração de madeira e óleos essenciais, apresentando também vasto potencial terapêutico, pois são utilizadas no tratamento de infecções bacterianas, virais e fúngicas e possuem atividade antidiarreica, antioxidante, antimoluscicida (QUEIROZ et al., 2015).

A planta *Eugenia brasiliensis* Lam apresenta várias aplicabilidades, como sua utilização no reflorestamento de áreas desmatadas, alimentação pelo consumo dos seus frutos, além de possuir diversas propriedades medicinais e numerosos compostos bioativos, no entanto ainda são poucos os estudos farmacológicos e químicos sobre esta espécie (BENFATTI et al., 2010; MAGINA et al., 2012; SUGUINO et al., 2011).

**Figura 1:** Folha, flor e fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam



**Fonte:** MAGINA, 2008

### 2.2.2 Características químicas

Espécies do gênero *Eugênia* apresentam em sua constituição flavonoides, leucociantocianidina (polifenol pertencente à classe dos bioflavonoides), compostos fenólicos, esteroides, ácidos graxos, limoneno,  $\beta$ -pineno, cineol, pulegona, cânfora, triterpenos e compostos sesquiterpênicos (VELOSO, 2016).

Em estudos que relataram a composição do óleo essencial das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam, foram descritos componentes como  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, espatulenol, t-cadinol,  $\alpha$  e  $\beta$ -selineno (APEL et al., 2004; FISCHER et al., 2005).

Na pesquisa realizada por Moreno et al. (2007) foram identificados cinquenta e nove compostos neste tipo de óleo, sendo também os principais componentes encontrados  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, juntamente com 1,8-cineol, enquanto que no óleo extraído das frutas foram observados compostos como óxido de cariofileno e  $\alpha$ -cadino.

Estudos realizados por Flores et al. (2012) identificaram 9 antocianinas partir dos frutos comestíveis desta espécie: Delfinidina-3-glicosídeo, Cianidin-3-galactosídeo, Cianidina-3-glucosídeo, Cianidin-3-arabinosídeo, Delphinidina-3-pentosídeo, Cianidin-3-xilosídeo, Malvidina-3-glucosídeo, Delfinidina e Cianidina.

A presença de catequina, miricetina, isoquercetina, rutina, quercetina e galangina foi relatada por Siebert et al. (2017) no extrato hidroalcoólico das folhas e catequina, isoquercetina, galangina e apigenina na fração acetato de etila. Os compostos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (em uma mistura), betulina, ácido 29-hidroxi-oleanólico também foram isolados de diferentes extratos das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam (MAGINA et al., 2012).

### 2.2.3 Uso etnofarmacológico

De acordo com Lamarca et al. (2013) as espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* apresentam grande potencial econômico através da alimentação e também medicinal, sendo seu uso na medicina tradicional preservado em diferentes comunidades. Estas espécies são recomendadas para doenças estomacais e dores de garganta, apresentando propriedades antiinflamatórias ou antioxidantes.

A infusão das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam é uma das principais formas da sua utilização como planta medicinal, podendo ser empregada no tratamento de reumatismo e artrite; possuindo também ação antidiarreica e diurética (REVILLA, 2002). Esta espécie apresenta casca e folhas aromáticas e adstringentes, utilizadas como calmante, antidepressiva e anti-inflamatória (COLLA, 2015).

### 2.2.4 Atividades biológicas

No estudo de Magina et al. (2009) o óleo essencial das folhas de *E. brasiliensis* apresentou atividade moderada frente à cepas Gram negativas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e melhor inibição quando testado frente à bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* no teste de microdiluição em placas de 96 poços.

Outras espécies do gênero *Eugenia* também apresentam atividade antimicrobiana em seus óleos essenciais, como o Cravo (*Eugenia caryophyllata*) que levou a formação de halos de inibição frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em teste de disco difusão, em diferentes concentrações testadas (POMBO et al., 2018).

O óleo essencial extraído das flores frescas de *Eugenia klotzschiana* (Pêra-do-cerrado) demonstrou atividade antimicrobiana frente às formas tripomastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi* e atividade citotóxica testada em células LLCMK2 (CARNEIRO et al., 2017).

A inibição da transição morfológica de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foi provocada pelo óleo essencial de *Eugenia uniflora* (pitanga) quando associado ao fármaco antifúngico fluconazol, o que leva a interferência no processo de invasão tecidual desses fungos (SANTOS et al., 2018).

Em estudo que testou o extrato bruto e frações das folhas de *E. brasiliensis*, Magina et al. (2012) observou uma menor atividade frente à *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto que a melhor ação observada foi frente à bactéria *Escherichia coli*, em

teste de microdiluição. Dentre as substâncias isoladas no mesmo estudo, a quercetina extraída da fração acetato de etila apresentou boa atividade frente à todas as cepas testadas.

Analisando a atividade antifúngica e antibacteriana da polpa dos frutos de *E. brasiliensis* por microdiluição em caldo frente a microrganismos causadores de infecção urinária, Garcia (2016) observou atividade efetiva frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Candida albicans*.

Em outro estudo, utilizando cepas de referência de *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma arginini* e *Mycoplasma hominis*, a atividade antibacteriana de *E. brasiliensis* Lam foi observada, sendo esta capaz de inibir o crescimento bacteriano, resultado importante já que estes achados podem constituir novas fronteiras nas áreas da micoplasmologia (BENFATTI et al., 2010).

Óleos essenciais de espécies de *Eugenia* foram testados quanto à atividade antiinflamatória nos modelos de pleurisia induzida por zimozan e lipolissacarídeo (LPS) e foi observada um importante resultado relacionado à espécie *Eugenia jambolana*, que levou a redução de leucócitos totais e inibiu a migração de eosinófilos, além de reduzir potencialmente a produção de óxido nítrico *in vitro*. Neste estudo, o óleo essencial de *E. brasiliensis* não apresentou atividade anti-inflamatória (HENRIQUES et al., 2006).

No entanto, em estudo de Siebert et al. (2017), utilizando extrato hidroalcoólico bruto e a fração acetato de etila das folhas de *E. brasiliensis*, em camundongos com pleurisia aguda, foi observado uma importante atividade anti-inflamatória, pois os extratos inibiram a migração de leucócitos para o local da inflamação e a fração acetato de etila levou a redução de óxido nítrico nas amostras pleurais dos animais testados.

Em outra pesquisa, as antocianinas encontradas em frutos de *Eugenia brasiliensis* Lam também apresentaram efeitos inibitórios da inflamação ocasionada pela exposição à fumaça, estas diminuíram a ação da quimiocina Interleucina-8, desta maneira, estes compostos podem representar uma nova forma de tratamento para a doença pulmonar obstrutiva crônica (FLORES et al., 2012).

Magina et al. (2010), utilizando extratos vegetais desta espécie, demonstraram sua capacidade antioxidante, pois estes apresentaram ação sequestrante de radicais livres usando DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), potencial redutor e potencial inibidor da peroxidação lipídica. Os autores atribuíram estas ações ao alto teor de compostos fenólicos encontrados nesta espécie.

O extrato bruto hidroalcoólico e acetônico das folhas desta espécie também apresentaram capacidade antioxidante, prevenindo alterações nas atividades enzimáticas, na

peroxidação lipídica e no conteúdo total de sulfidrilas no sangue e fígado de ratos tratados com altas dosagens de óleo de côco (LIMA, 2017).

No estudo de Dametto (2014), o potencial antioxidante dos extratos aquoso e metanólico das folhas desta espécie foi avaliado através de ensaios de redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio] e reações radicalares (inibidoras de lipoperoxidação) e resultados promissores foram apresentados, importantes para preservação do equilíbrio redox em sistemas biológicos.

O óleo essencial de *E. brasiliensis* não foi estudado em relação a sua atividade antioxidante, no entanto, em estudo com óleo de espécie pertencente ao mesmo gênero, *Eugenia caryophyllata*, foi relatado potencial antioxidante pela neutralização do DPPH, que aumentou proporcionalmente ao aumento de concentração deste óleo (SILVESTRI et al., 2010)

Colla et al., (2012) concluíram que *Eugenia brasiliensis* Lam também pode apresentar importante valor terapêutico no tratamento da depressão, pois o seu extrato hidroalcoólico foi avaliado quanto a sua atuação como antidepressor do sistema nervoso, apresentando efeito mediado por sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos, além de produzir um sinergismo quando utilizado junto a antidepressivos fluoxetina, imipramina e bupropiona, sugerindo que sua utilização causa uma causa um efeito benéfico melhorando a eficácia desses fármacos.

## 2.3 GÊNERO *Piper*

### 2.3.1 Características gerais

A espécie *Piper mosenii* C. DC. não apresenta nome popular ou atividades biológicas relatadas na literatura. No entanto, várias espécies pertencentes ao gênero *Piper* possuem importância econômica e atividades comprovadas, sendo também utilizadas como plantas medicinais, como *Piper crassinervium* H.B. & K. (jaborandi), *Piper hispidinervum* C.DC. (pimenta longa), *Piper aduncum* L. (pimenta-de-macaco), *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), a partir destas é possível a extração dos óleos essenciais (GOGOSZ et al., 2012).

A família Piperaceae encontra-se distribuída por toda a América e contém 5 gêneros e em torno de 500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). O gênero *Piper*, pertencente a esta família é o mais rico do neotrópico e se encontra entre os mais representativos no Brasil, com 272 espécies (BFG, 2015; CHRIST et al, 2018).

**Figura 2:** Folha e espiga de *Piper mosenii* C. DC.



**Fonte:** FUNEZ, 2018

### 2.3.2 Características químicas

No estudo de Fidyt et al. (2016), utilizando óleo essencial de espécies do gênero *Piper*, o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e pineno ( $\alpha$  e  $\beta$ ) foram identificados como constituintes principais. No óleo essencial obtido de folhas, flores e talos de espécies também deste gênero, o linalol (37,2%) e o trans-P-cariofileno (8,8%) são a maioria na espécie *Piper cumanense*; em *Piper subflavum*,  $\alpha$ -pineno (18,9%), trans-P-cariofileno (15,9%) e  $\beta$ -pineno (13,2%) são a maioria e em *Piper eripopodon* o  $\alpha$ -pineno (18,6%),  $\beta$ -pineno (16,1%) e  $\beta$ -cariofileno (11,6%) são componentes majoritários (VELANDIA et al., 2018).

Na pesquisa de Bernuci et al. (2016) avaliando as composições químicas dos óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Piper* mostraram uma variabilidade química, com compostos sesquiterpênicos predominantes na maioria nas espécies avaliadas. Estes autores descreveram pela primeira vez a composição do óleo essencial da espécie *Piper mosenii* C. DC., tendo como compostos majoritários óxido de cariofileno e  $\alpha$ -humuleno e outros compostos como  $\beta$ -pineno, p-cimeno, (E)-cariofileno, biciclogermacreno,  $\gamma$ -cadineno, *trans-calameneno*, *alo-aromadendreno*, *globulol*, *Viridiflorol* e  $\alpha$ -cadinol.

Krinski; Foerste; Deschamps (2018) também descreveram em seu estudo a presença de  $\beta$ -pineno, limoneno, (E)-cariofileno e óxido de cariofileno no óleo essencial das folhas secas de *Piper mosenii* C. DC.

### 2.3.3 Uso etnofarmacológico

De acordo com Nakamura et al. (2006) espécies pertencentes ao gênero *Piper* foram listadas como remédio para aliviar dores no estômago e como antiinflamatório, bem como repelente de insetos. Raízes e frutos de espécies deste gênero têm muitas aplicações na medicina, dentre elas o tratamento de problemas respiratórios como asma e bronquite (PARMAR et al., 1997). Estas também são amplamente utilizadas para o tratamento de vaginites, como antimicrobiano, no tratamento de acidente vascular cerebral e de diversos distúrbios intestinais (REDDY et al., 2004; WANG et al., 2017).

### 2.3.4 Atividades biológicas

As espécies *Piper diospyrifolium* e *Piper aduncum* apresentaram atividade contra *Leishmania amazonensis* e foram mais seletivas para o parasita do que para os macrófagos. Neste mesmo estudo *Piper rivinoides*, *Piper cernuum* e *Piper diospyrifolium* apresentaram atividade moderada contra *Mycobacterium tuberculosis* (Bacilo H37Rv), resultados importantes, pois sugerem o potencial das espécies pertencentes a este gênero para utilização terapêutica frente a microrganismos (BERNUCI et al., 2016).

O óleo essencial obtido das folhas de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) apresentou atividade antifúngica frente a fitopatógenos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, através de método de diluição em ágar, onde foi observada a taxa de crescimento micelial (TCM) (ZACARONI et al., 2009).

Em pesquisa com teste de microdiluição para determinação da CIM dos óleos essenciais extraídos das folhas de *P. marginatum* Jacq, *P. aleyreanum* C.DC., *P. dilatatum* L. C. Rich., *P. aduncum* L. e *P. alatabaccum* Trel & Yuncker, foi observada atividade antifúngica de todas as espécies estudadas frente a cepas de *Candida* spp., demonstrando a importância do gênero *Piper* no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (NASCIMENTO, 2011).

No estudo de Brazão (2012), o óleo essencial de *Piper aduncum* foi testado frente a cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus* spp. através de metodologia de microdiluição em caldo e contagem de unidades formadoras de colônias. Este apresentou moderada atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus lentus*.

O óleo essencial extraído dos frutos de *Piper tuberculatum* apresentou atividade moduladora em associação ao fármaco imipenem frente às cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, em teste de microdiluição, mostrando ser uma alternativa na produção de novos fitoterápicos (SALES, et al., 2017).

Um estudo de avaliação da atividade antimicrobiana, utilizando o método de disco difusão, demonstrou que os extratos e frações das espécies de *Piper* apresentam potencial antibacteriano e antifúngico, nessa pesquisa o extrato etanólico bruto e as frações hexânica e  $\text{CHCl}_3$  das folhas de *Piper mollicomum* mostraram atividade antibacteriana frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e as frações hexânicas de *Piper arboreum*, de *Piper caldense* e de *Piper mollicomum* apresentaram atividade antifúngica frente à espécies padrões do gênero *Candida* (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*) (ALVES et al., 2016).

Krinski; Foerste; Deschamps (2018) analisaram a toxicidade de óleos essenciais obtidos das folhas secas de espécies brasileiras pertencentes à família Piperaceae sobre ovos de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja). Neste estudo todos os produtos reduziram a eclosão larval, no entanto as espécies *Piper fuliginum*, *Piper mollicomum*, *Piper mosenii*, *Piper aduncum* e *Piper marginatum* tiveram as menores concentrações letais observadas. A partir disso os autores concluíram que os óleos essenciais de 16 espécies de *Piper* avaliadas apresentaram potencial para uso como inseticidas vegetais.

Espécies deste gênero, utilizadas como plantas medicinais, Pimenta branca (*Piper nigrum* L.) e pimenta longa (*Piper longum* L.) apresentam ação anti-inflamatória, pois foi possível observar importante efeito no tratamento de lesões em ratos com isquemia cerebral. A fração diclorometano suprimiu a produção de IL-1, IL-6 e TNF enquanto que a fração diclorometano mostrou atividade contra a lesão reduzindo os radicais livre de oxigênio (WANG et al., 2017).

O tratamento oral com óleo essencial de folhas, flores, raízes e caules *Piper amalago* em ratos com pleurisia e edema de pata induzidos por injeção de carragenina demonstrou importante ação antiinflamatória, pois este produto natural foi capaz de reduzir significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural e o para o edema de pata (BARROS et al., 2015).

A atividade antiproliferativa dos óleos essenciais obtidos das folhas, talos e flores de *Piper cumanense*, *Piper subflavum* e *Piper eriopodom* foi avaliada em linhas celulares de cancro da mama, do cancro do colo do útero e do cancro do fígado. Estes óleos essenciais



mostraram atividade anti-p Piper amalagoroliferativa (IC<sub>50</sub>: 50 ug / ml) em células HeLa (cancro do colo do útero) e / ou células MCF-7 (cancro da mama), reduzindo a viabilidade das células cancerosas (VELANDIA et al., 2018).

## 2.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são medicamentos que revolucionaram o tratamento de infecções bacterianas, apresentando grande impacto na saúde, pois reduziram em todo o mundo as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a essas infecções (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Para que sua ação seja eficaz, é necessário que exista um alvo onde o mesmo atue na célula bacteriana, a concentração ao atingir este alvo deve ser suficiente para destruir ou impedir a reprodução do microrganismo, não podendo ocorrer alteração na estrutura ou inativação deste fármaco (COSTA, 2016).

A população brasileira é uma das que mais consomem medicamentos, ocupando a quarta colocação no ranking mundial. De acordo com Sindicato das Indústrias Farmacêuticas cerca de 40% destes são antibióticos, o que demonstra sua ampla disseminação no país (NOVARETTI et al., 2014).

Estes fármacos são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo atuar na inibição da síntese proteica, causando alterações na parede e na membrana celular, inibindo a síntese de ácidos nucleicos ou interferindo na síntese de folatos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As fluoroquinolonas são antimicrobianos que atuam interrompendo a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), através da inibição das enzimas DNA girase e a topoisomerase IV, que são importantes para replicação e transcrição do DNA bacteriano (KATZUNG; TREVOR, 2015; SCHOLAR, 2002) .

Esta classe apresenta atividade contra microrganismos Gram positivos e Gram negativos, com um largo espectro de atividade, incluindo as bactérias anaeróbias e também resistentes a outros fármacos. A sua administração é fácil, além de apresentar boa absorção e possuir alto índice terapêutico, podendo ser utilizado em associação a outros fármacos, com poucas interações que causam efeitos colaterais (SILVA; HOLLENBACH, 2010; SOUZA, 2005).

Os aminoglicosídeos são utilizados para tratamento de infecções bacterianas graves, causadas principalmente por bactérias Gram negativas (BALAKUMAR; ROHILLA; THANGATHIRUPATHI, 2010). Estes são constituídos por aminoaçúcares ligados à hexose

ou aminociclitol e atuam na inibição da síntese proteica, reduzindo a produção de proteínas e causando a leitura incorreta do RNA mensageiro ao se ligar na porção 30S ribossomo bacteriano, causando a morte da célula bacteriana pela alteração das funções da membrana celular e consequente saída de componentes essenciais (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Os macrolídeos apresentam amplo espectro de ação, tendo ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (WANG, 2009). São antibióticos utilizados no tratamento de diversas infecções bacterianas, sendo a segunda classe mais importante utilizada para cura desta patologia, estando atrás apenas dos beta lactâmicos (HU; HU, 2005). Estes agentes atuam na porção 50S do ribossomo, bloqueando a síntese proteica através da ligação com RNA ribossomal, impedindo a formação da cadeia polipeptídica (VON NUSSBAUM, 2006).

## 2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A utilização inadequada dos antibióticos pode levar a sérios problemas, como a indução à resistência bacteriana, que se apresenta como um fenômeno ocasionado por diversos mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos através da evolução e adaptação genética (SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018).

Esta pode ser natural, ou seja, intrínseca ao microrganismo que naturalmente resiste a determinado antimicrobiano, ou adquirida, ocasionada pela aquisição de mecanismos, como alterações na permeabilidade, impedindo que o antibiótico atinja o sítio de ligação da bactéria; efluxo rápido (bomba de efluxo), ocorrendo através de proteínas que atuam como bombas que expõem o medicamento; e alterações no sítio de ligação, por meio de modificações genéticas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Outro mecanismo de extrema importância é a produção de enzimas, como as betalactamases, uma das principais formas pelas quais cepas bacterianas adquirem resistência a antibióticos betalactâmicos (RANG et al., 2012). Algumas enzimas também podem alterar a estrutura química do agente antimicrobiano como é o caso das aminoglicosídeoquinas, tendo como exemplo as bactérias Gram negativas produtoras de enzimas de adenilação, fosforilação, ou acetilação, que alteram e inativam os aminoglicosídeos (WRIGHT, 2005).

Os microrganismos que apresentam resistência podem causar infecções bem mais graves em relação aquelas causadas por cepas comuns, e além de serem de maior gravidade ainda apresentam menor resposta ao tratamento, prolongando assim o período da antibioticoterapia e dificultando o prognóstico do paciente (CASTANHEIRA, 2013).

Outras consequências relacionadas a resistência são retardo no estabelecimento de terapias adequadas, maior utilização de antibióticos de alto custo e amplo espectro, necessidade de utilização de fármacos com farmacocinética não muito conhecida e aumento da mortalidade de pacientes com infecções, sendo este um dos principais problemas de saúde pública mundial (NATHAN; CARS, 2014; PILTCHER et al., 2018).

A organização mundial de saúde (OMS) publicou em fevereiro de 2017 um documento demonstrando as principais bactérias que devem ser estudadas na pesquisa de novos antibióticos, por apresentam escassas opções de tratamento. Entre essas, encontram-se espécies Gram negativas de Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e espécies Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e vancomicina (WHO, 2017).

Bactérias multirresistentes não se restringem mais ao ambiente hospitalar, pois, atualmente, são comumente isoladas de pacientes com infecções comunitárias, além disso, o surgimento e aprovação de novas drogas não ocorrem na mesma velocidade do crescente desenvolvimento dos mecanismos de resistência, dessa forma os antibióticos passaram a ser um recurso não renovável e ameaçado (LAZOVSKI, 2017; TRONCOSO, 2017).

Tendo em vista essa problemática, a atividade moduladora da resistência bacteriana, principalmente com a utilização de produtos naturais, apresenta grande importância, pois estes podem aumentar a ação de antibióticos, reduzindo assim a quantidade utilizada destes medicamentos, por consequência proporciona uma maior eficácia com redução dos riscos inerentes a utilização de antibióticos (MATIAS, 2010).

São muitos os resultados que mostram eficácia na utilização em conjunto de antibióticos e derivados de produtos naturais, comprovando assim, esta ação sinérgica, que vem se tornando cada dia mais uma importante e eficiente alternativa para o controle bacteriano, principalmente tratando-se de cepas multirresistentes, como a MRSA (COUTINHO et al., 2012).

## 2.6 FOTOTERAPIA

De acordo com Caffarel-Salvador et al. (2015) o uso da terapia fotodinâmica é uma nova forma de terapia antimicrobiana, esta que já é utilizada para tratamento de lesões de pele cancerosas tem sido avaliada quanto a eficiência como recurso terapêutico de infecções. Este é um método de baixo custo, que proporciona um reequilíbrio biofísico e bioquímico para a cura de doenças, além de não ser invasivo (BUENO; CRISTOFOLINI, 2014).

A fototerapia pode levar a alterações na membrana celular e atingir as mitocôndrias inibindo o processo de respiração, esta pode também causar inativação de enzimas essenciais para o metabolismo e impedir a divisão celular (GREBENOVA et al., 2003).

Esta terapia torna-se um método alternativo muito importante para tratamento de infecções locais como aquelas associadas a traumas, necrose e gangrena, já que antibióticos orais com efeitos sistêmicos não são tão efetivos para tecidos que não são bem perfundidos, e os microrganismos vem adquirindo cada vez mais resistência a estes medicamentos. Desta forma, o uso da luz com dose e comprimento de onda adequado em associação a aplicação tópica de um fotossensibilizador na área afetada pode ser a solução para estas infecções de difícil tratamento (LAPINSKI, 2018; PERUSSI, 2007).

A utilização do aparelho de LED é uma inovadora e poderosa terapia de luz não térmica utilizada para tratamentos cosméticos e de câncer de pele. A luz emitida por esses aparelhos está constatemente melhorando em brilho, eficiência energética e longevidade, estando disponível em comprimentos de onda variando de ultravioleta (UV) até infravermelho próximo (NIR) (247 a 1300 nm) (BAROLET, 2008).

O LED azul pode atuar eliminando bactérias Gram positivas e negativas, ação que pode ocorrer através da indução do estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2017). Este efeito acontece quando a luz é associada a compostos químicos encontrados nas plantas medicinais, que atuam como fotossensibilizadores, os quais serão excitados resultando na formação de espécies reativas de oxigênio intracelulares, que causam oxidação de constituintes essenciais das células bacterianas com conseqüente morte destas (COUTINHO et al., 2009; RÀGAZ et al., 2013).

Estudos já demonstram a atividade antibacteriana da luz de LED azul em associação com produtos naturais e antibióticos. Pereira et al. (2017), ao avaliar a atividade moduladora através do contato gasoso e direto, demonstrou ação sinérgica desta luz quando associada ao óleo essencial de *Eugenia jambolana* e antibióticos frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estes autores ressaltaram a importância de novos estudos relacionando óleos essenciais com as luzes do diodo emissor de luz para descoberta de novas terapias eficazes contra bactérias resistentes.

Matias et al. (2017) utilizando também combinação entre antibióticos, óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. e luzes azul de LED verificou que esta associação pode modificar a resistência de bactérias Gram negativas. Neste estudo foi observado efeito sinérgico entre os antibióticos Ciprofloxacina e Norfloxacina, luz azul de LED e óleo frente a *E. coli* e *S. aureus* utilizando metodologia de contato gasoso.

No estudo de Goulart et al. (2010) foi demonstrado que o uso da terapia fotodinâmica utilizando laser em combinação com o corante rosa bengala (utilizado como fotosensibilizador) foi capaz de reduzir significativamente a formação de biofilmes, que apresentam bactérias mais resistentes aos antibióticos. Estes autores ressaltam a importância da realização de novos estudos com diferentes fotossensibilizadores e luzes como o laser e também o LED, pois estes podem surgir como uma opção para o tratamento clínico, em conjunto com o uso de antimicrobianos, melhorando os efeitos destes e reduzindo os efeitos colaterais nos pacientes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico e a ação antibacteriana e moduladora dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC. associados a luz azul de LED.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os compostos químicos do óleo essencial de *P. mosenii* e *E. brasiliensis* por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS);
- Determinar a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de *P. mosenii* e *E. brasiliensis* utilizando a metodologia de microdiluição frente a bactérias padrões e multirresistentes;
- Verificar a eficácia dos óleos na modulação da resistência bacteriana utilizando antibióticos das classes: macrolídeo, fluoroquinolona e aminoglicosídeo por metodologia de microdiluição;
- Avaliar o potencial modulador dos óleos em combinações com antibióticos aminoglicosídeos e luz azul do aparelho de LED.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC., assim como a metodologia de coleta do material, extração dos óleos e determinação da composição química foram cedidas pela equipe do professor Luiz Everson, da Universidade Federal do Paraná, e fazem parte do projeto Biodiversidade química.

### 4.1 SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas frescas de *Eugenia brasiliensis* Lam foram coletadas em Atalanta – Santa Catarina, Brasil com coordenadas: 25° 29.830' S e 49° 00.919' W e uma altitude de 640 metros. Uma exsicata da espécie foi deposita no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein da Universidade Regional de Blumenau (FURB) sob o número: FURB32094.

As folhas frescas de *Piper mosenii* C. DC. Foram coletadas na Reserva Biológica Bom Jesus no município de Guaraqueçaba - Paraná, Brasil com coordenadas: S 25° 13.939' e W 48° 34.821' e uma altitude de 13 metros. Uma exsicata da espécie foi deposita no Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM) em Curitiba sob o número: MBM396409 (SISGEN Nº A37FBDC).

### 4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e de *Piper mosenii* C. DC.(OEPm) foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho tipo Clevenger, onde 100g das folhas frescas e 50g das folhas secas, respectivamente, foram trituradas e colocadas em um balão de vidro juntamente com 1,0L de água destilada, permanecendo em ebulição por 2h e 30 minutos para extração do OEEb e 4,5 horas para extração do OEPm (WASICKY, 1963).

As folhas de *P. mosenii* foram secadas com secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40° C por 24 horas. Para determinação do rendimento do óleo essencial em base seca, foi aferido a massa total de óleo essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano na proporção de 1 % e 1,0  $\mu\text{L}$  da solução foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N. O injetor foi mantido a 250 °C. A separação dos constituintes foi obtida em coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e utilizando hélio como gás carreador (1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C a uma taxa de 3°C  $\text{min}^{-1}$ . O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras  $\text{s}^{-1}$  e faixa de massas de 40 a 450 u. A linha de transferência foi mantida a 260° C, a fonte de íons a 230° C e o analisador (quadrupolo) a 150° C.

Para a quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280°C. Foram empregadas as mesmas coluna e condições analíticas descritas acima, exceto pelo gás carreador usado, que foi o hidrogênio, a uma vazão de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ . A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotescas (WILEY, 1994; NIST, 2016) e também por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos ( $\text{C}_7\text{-C}_{26}$ ) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

#### 4.4 ANTIBIÓTICOS, MEIOS DE CULTURA E APARELHO

Os antibióticos líquidos norfloxacin, eritromicina, gentamicina e amicacina foram obtidos de LaborClin, Brasil. Os meios de cultura Agar infusão de coração (HIA) e *Brain Heart Infusion* (BHI) foram adquiridos de HIMEDIA. O aparelho utilizado durante o procedimento experimental foi *Light Emithing Diodes*- LED, que é um diodo emissor de luz, da marca NEW Estética®, o qual possui os espectros de luz vermelha, azul e amarela, permitindo também a combinação destas cores. A luz utilizada foi a azul, com um comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho, de 415nm.



#### 4.5 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* 10, respectivamente.

#### 4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram pesadas 10 mg (10.000 µg) de cada óleo a ser testado e diluídos em 0,5 mL de DMSO. Em seguida, essa solução foi diluída 9,265 mL de água, perfazendo um total de 9,765 mL de solução com concentração de 1024 µg/mL para cada substância. Essa solução foi utilizada para os testes de atividade antibacteriana e modulação. Os antibióticos utilizados no teste também foram preparados na concentração inicial de 1024 µg/mL.

#### 4.7 PREPARO DOS INÓCULOS

As culturas de bactérias foram semeadas em meio HIA e colocadas na estufa a 37°C para crescimento por 24 horas. Após esse período, foram coletadas amostras de cada cultura microbiana e diluídas, em triplicata. Após esse procedimento, foi testada a turbidez da solução com tubo 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em meio BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

Os *Eppendorfs* do teste foram preparados em triplicata para cada bactéria e para cada substância, cada um contendo 1350 µL de BHI a 10% + 150 µL do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para a CIM.

#### 4.8 PREPARO DOS ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados no teste foram norfloxacin, eritromicina, gentamicina e amicacina todos na concentração inicial de 1024 µg/mL, estes foram diluídos em água destilada estéril.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Foram adicionados 100 µL da solução final dos inóculos em cada poço da placa de microdiluição, e em seguida foi feita a microdiluição seriada com a solução de 100 µL de cada óleo, por coluna, variando nas concentrações de 512 µg/mL no primeiro poço a 0,5 µg/mL no penúltimo poço. As microdiluições foram realizadas em triplicata. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C. (NCCLS, 2003).

Após esse período, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina. Esta solução foi preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após o período de incubação, 20 µg/mL da solução indicadora foi acrescentada nas placas em cada cavidade e após uma hora em temperatura ambiente foi realizada a leitura do teste. Esta é determinada através da coloração do meio de cultura, sendo considerada positiva para os poços que não apresentaram crescimento microbiano, ou seja, permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT et al., 2001).

O controle positivo do teste foi realizado com os meios de cultura contendo o inóculo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente.

#### 4.10 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR CONTATO DIRETO

Para verificar a modulação do efeito antibacteriano foram utilizados antibióticos de diferentes classes (norfloxacina, gentamicina e eritromicina) frente às cepas testadas, através do método proposto por Coutinho et al. (2008). Os antibióticos foram diluídos em um volume de 100 µL seriadamente nos poços contendo o meio de cultura BHI a 10% e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o produto natural na concentração subinibitória (CIM/8). O controle positivo do teste foi realizado com o meio de cultura contendo o inóculo. As placas foram incubadas por 24 horas  $35 \pm 2$  °C. Após a incubação foi utilizado a resazurina sódica para evidenciar a atividade moduladora.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA COM EXPOSIÇÃO À LUZ DE LED AZUL

Para a realização destes testes, inicialmente foram utilizadas as mesmas metodologias referentes ao teste de avaliação da atividade antibacteriana e moduladora por contato direto. Os antibióticos utilizados foram os aminoglicosídeos gentamicina e amicacina. Após isso, as placas foram subdividas em dois grupos, onde o primeiro foi submetido à luz de LED azul durante vinte minutos e o segundo grupo não foi submetido à luz de LED. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. Os testes foram realizados em triplicata e para determinação da CIM foi utilizada a resazurina sódica (PEREIRA et al., 2017)

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0* e analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando a média geométrica das triplicatas como dado central e o desvio padrão da média. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde  $p < 0,05$  é considerado significativo).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.

AGRA, M. F; FRANÇA, P.F; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known a medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 114-140, 2007.

ALVES, H.S.; ROCHA, W.R.V.; FERNANDES, A.F.C.; NUNES, L.E.; PINTO, D.S.; COSTA, J.I.V.; CHAVES, M.C.O.; CATÃO, R.M.R. Actividad antimicrobiana de productos obtenidos a partir de especies de *Piper* (Piperaceae). **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 21, 2016. Disponível em: <<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/342/168>>. Acesso em: 28/08/2018.

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 399-408, 2012.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M. Essential oils from *Eugenia* species. Part VII: Sections Phylloclalyx and Stenocalyx. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p.135-138, 2004.

ARÉVALO, R. P.; SERVIGNINI, L.P.; SILVA, L.A.; MALDONADO, C.A.B.; ARTHUR, V.; AREVALO-PINEDO, A. Concentração de Minerais Presentes em Frutos da Grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam). **Cadernos de Agroecologia**, v.9, p. 1-9, 2014.

BALAKUMAR, P.; ROHILLA, A.; THANGATHIRUPATHI, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? **Pharmacological Research**, v. 62, p. 179-186, 2010.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. In: **Seminars in cutaneous medicine and surgery**. Frontline Medical Communications, v. 27, n. 4, p. 227-238, 2008.

BARROS, A.L.; RIWAMOTO, L.D.; CARDOSO, C.A.L.; VITORINO, G.T.; MOTA, J.S.; FERNANDES, C.V.; LANZA JUNIOR, U.; ARENA, A.C.; SHINZATO, M.M.; KASSUYA, C.A.L. Análise anti-inflamatória do óleo essencial obtido de *Piper amalago* (Piperaceae). **PECIBES**, v.1, p.34-39, 2015.

BENFATTI, C.S.; CORDOVA, S.M.D.; GUEDES, A.; MAGINA, M.D.A.; CORDOVA, C.M.M.D. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, p.33-39, 2010.

BERNUCI, K.; IWANAGA, C.C.; FERNANDEZ-ANDRADE, C.M.M.; LORENZETTI, F.B.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. D. S.; GONÇALVES, J.E.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; SCODRO, R.B.L.; CARDOSO, R.F.; BALDIN, V.P.; CORTEZ,

D.A.G. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of *Piper* Species. **Molecules**, v.21, 2016.

BFG - Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

BLAIR, J. M. A.; BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências.** RDC nº 10/2010. Diário Oficial da União, Brasília, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica.** Cadernos de Atenção Básica, n. 31, Brasília – DF, 2012.

BRAZÃO, M.A.B. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente dilapiol, frente a *Staphylococcus spp.* multirresistentes.** Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, 2012.

BUENO, J.; CRISTOFOLINLI, G.M.A.F. Led terapia na faixa do vermelho ao infravermelho: uma nova abordagem sob a visão quântica para a saúde. **Revista Saúde Quântica**, v. 3, n. 3, p. 102-110, 2014.

CAFFAREL-SALVADOR, E.; KEARNEY, M.C.; MAIRS, R.; GALLO, L.; STEWART, S.A.; BRADY, A.J.; Donnelly, R.F. Methylene Blue-Loaded Dissolving Microneedles: Potential use in Photodynamic antimicrobial chemotherapy of infected wounds. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 397-412, 2015.

CARNEIRO, N.S.; ALVES, J.M.; ALVES, C.C.F.; ESPERANDIM, V.R.; MIRANDA, M.L.D. Óleo Essencial das Flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): Composição Química e Atividades Tripanocida e Citotóxica In Vitro. **Rev. Virtual Quim**, v.9, n.3, p. 1381-1392, 2017.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. **Mecanismos de resistência a antibióticos.** 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CHRIST, J.A.; HOLLUNDER, R.K.; CARVALHO, M.S.; FERREIRA, M.F.D.S.; GARBIN, M.L.; CARRIJO, T.T. DNA fingerprinting based on SSR amplification profiles for *Piper* species identification (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, 2018.

CIRINO, I.C.S.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P. **Modulação da resistência a drogas por óleos essenciais em linhagens de *Staphylococcus aureus***. 2014. Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular) - Universidade Federal da Paraíba, 2014.

COLLA, A.R.S.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.; COLLA, G.; MAGINA, M.D.; BRIGHENTE, I.M.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 720–731, 2012.

COLLA, A. R. S. **Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais**. 2015. 168f. Tese (Doutorado em neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, v. 7, p. 45-57, 2017.

COSTA, A. L. P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção**. 2016. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, supl. p. 670-675, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; Falcão-Silva, V.; Lima, E. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**. v. 41, p. 67-72, 2012.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **J Photochem Photobiol B: Biology**. v. 96, p. 63-65, 2009.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. 2. ed. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002.

DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 426-443, 2007.

DOURADO, K.B.V.; CARNEVALI-JUNIOR, L.C.; PAULO, R.J.F.; GOMES, A.C. LEDTERAPIA, uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual. **Ensaios e Ciência: ciências agrárias, biológicas e da saúde**, v. 15, n.6, p. 231-248, 2011.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZAŁA, L.; SZUMNY, A.  $\beta$ -Caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Med**, v. 5, p. 3007-3017, 2016.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.499-500, 2005.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K; PAULINO, S; WHALEN, K.; DOBO, A.J.; REYNERTSON, K. A.; FORONJY, R. F.; D'ARMIENTO, J.M.; KENNELLY, E. J. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1256–1262, 2012.

FONTANELLA, F.; SPECK, F.P., PIOVEZAN, A.P. Conhecimento, acesso e aceitação das práticas integrativas e complementares em saúde por uma comunidade usuária do Sistema Único de Saúde na cidade de Tubarão – SC. **Arq Catarin Med.**, v.36, p. 69-74, 2007.

FUNEZ, L. A. **Flora de Santa Catarina**. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/piperaceae/piper-mosenii>>. Acesso em: 26/08/2018.

GARCIA, K. C. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam.** 2016. 167f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 1, p. 63-78, 2005.

GOGOSZ, A.M.; BOERGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, p. 405-417, 2012.

GOULART, R. C.; BOLEAN, M.; PAULINO, T. P.; THEDEI-JUNIOR, G.; SOUZA, S.L.S.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, p. 53-60, 2010.

GREBENOVA, D.; KUZELOVÁ, K.; SMETANA, K.; PLUSKALOVÁ, M.; CAJTHAMLOOVÁ, H.; MARINOV, I.; FUCHS, O.; SOUCEK, J.; JAROLÍM, P.; HRKAL, Z. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress- induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **J Photochem Photobiol B: Biology**, v. 69, p. 71-85, 2003

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

HOSSEINZADEH, S.B.; BOERGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.B.; BERGO, C. Effect of ultrasound and infrared drying methods on quantitative and qualitative characteristics of

Satureja bachtiarica essential oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, p.1196-1208, 2017.

HU, M.; HU, C.Q. Identification of the components of 16-membered macrolídeo antibiotics by LC/MS. **Analytica chimica acta**, v. 535, p. 89-99, 2005.

ISERHARD A. R. M.; NEVES, E. T.; BUDÓ, M. de L. D.; BADKE, M. R. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Esc Anna Nery**, v. 13, n. 1, p. 116-122, 2009.

KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. **Basic & Clinical Pharmacology**, 13 ed. Lange Mc-Graw Hill Education, 2015.

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidæ) at the initial stage of development. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, P. 1-10, 2018.

LAMARCA, E. V.; WALDYR, B.; RODRIGUES, D.S.; OLIVEIRA JÚNIOR, C.J. F. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia* spp. em sistemas de policultivos e agroflorestas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n.3, p. 119-130, 2013.

LAPINSKI, T. F. **Fotossensibilizadores naturais em terapia fotodinâmica antimicrobiana: desenvolvimento de crème e gel crème contendo extratos de *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia biomedical) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos -SP, 2008.

LAZARINI, J.G.; SARDI, J.C.O.; FRANCHIN, M.; NANI, B.D.; FREIRES, I.A.; INFANTE, J.; PASCHOAL, J.A.R.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 132-139, 2018.

LAZOVSKI, J.; CARDOSO, A.; PASTERAN, F.; MONSALVO, M.; FRENKEL, J.; CORNISTEIN, W.; CORRAL, G.; NACINOVICH, F. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. **Rev Panam Salud Publica**, v. 41, n.1, p. 1-7, 2017.

LIMA, A. B. **Efeitos Hipolipemiante e Antioxidante de *Eugenia brasiliensis* em Modelo Animal de Hipertrigliceridemia Induzida por Óleo de Coco em Ratos**. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Universidade da Região de Joinville-UNIVILLE, Joinville, 2017.

LIMA, G. S.; LIMA, A. E. A. N.; MACIEL, M. A. **Estudo da atividade Tripanossomicida e Leishmanicida de extrato, frações e terpenos de *Croton cajucara* Benth**. 2014. Tese (Doutorado em Ciência, tecnologia e inovação em agropecuária)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; LUBART, R. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing. **Laser in Surgery and Medicine**, v.42, n.1, p.467-472, 2010.



LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS G. H. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 189-196, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v.1. 2002.

MACHADO, H. E. A.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim centro biologia**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MAGINA, M.D.A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H.H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, p. 376–82, 2010.

MAGINA, M. D. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia***. Tese (Pós-graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis. 2008.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Quim. Nova**, v. 35, p. 1184-1188, 2012.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E.L.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v.63, p.345-350, 2009.

MATIAS, E. F. F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (Velame), (*Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (erva-baleeira)**. 2010. 123f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, 2010.

MATIAS, E.F.F.; BEZERRA, V.B.; BARROS, R.O.; LUCENA, A.L.V.M.; LEITE, V.D.; FEITOSA, J.H.F.; SILVA, M.K.N. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Cordia verbanacea* DC. associado às luzes de LED. **Rev. Interfaces**, v. 5, n.14, p. 07-14, 2017.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras.**, v. 27, p. S4050- S4063, 2009.

MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M.C.M.; CORDEIRO, I.; APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Sci. Agric.**, v. 64, p. 428-432, 2007.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D.A.G; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n.1, p. 61-66, 2006.

NASCIMENTO, K.M. **Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Piper* frente a cepas de *Candida* spp.** 2011. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2011.

NATHAN, C.; CARS, O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. **New England Journal of medicine.**, v. 37, p. 1761-1763, 2014.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NOVARETTI, M. C. Z.; AQUINO, S.; PISCOPO, M. R. Controle de vendas de antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. **Revista Acadêmica São Marcos.** v. 4, n. 2, p. 25-39, 2014.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardiovasc Surg**, v.21, n.4, p. 444-452, 2006.

PARMAR, V. S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGWL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.

PEREIRA, N. L. F.; AQUINO, P.E.A.; JÚNIOR, J.G.A.S.; CRISTO, J.S.M.A.V.; MOURA, F.F.; FERREIRA, N.M.N.; SILVA, M.K.N.; NASCIMENTO, E.M.; CORREIA, F.M.A. CUNHA, F.A.B.; BOLINGON, A.A.; COUTINHO, H.D.M.; RIBEIRO-FILHO, J.; MATIAS, E.F.F.; GUEDES, M.L.F. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, n. 1, p. 144-149, 2017.

PERFEITO, J. P. S. **O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento.** 2012. Dissertação (Pós-graduação em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, 2012.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quím. Nova**, v. 30, n.4, p.988-994, 2007.

PIETROVSKI, E. F.; SCHMITZ, M.L.; KUHNT, M.; ESCHER, C.; HEINRICH, M. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60, p. 479-487, 2008.

PILTCHER, O.B.; KOSUGI, E.M.; SAKANO, E.; MION, O.; TESTA, J.R.G.; ROMANO, F.R.; SANTOS, M.C.J.; DI FRANCESCO, R.C.; MITRE, E.I.; BEZERRA, T.F.P.; ROITHMAN, R.; PADUA, F.G.; VALERA, F.C.P.; NETO, J.F.L.; DÁ, L.C.B.; PIGNATARI, S.S.N.; AVELINO, M.A.G.; CAIXETA, J.A.S.; ANSELMO-LIMA, W.T.; TAMASHIRO, E. How to avoid the inappropriate use of antibiotics in upper respiratory tract infections? A position statement from an expert panel. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 84, p. 265-279, 2018.

POMBO, J.C.P.P.; RIBEIRO, E.R.; PINTO, R.L.; SILVA, B.J.M. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segur. Aliment. Nutr.**, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.

QUEIROZ, J. M. G.; SUZUKI, MCM; MOTTA, A.P.R.; NOGUEIRA, J.M.R.; CARVALHO, E.M. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista fitos**, v.9, p. 73-159, 2015.

RAGÀS, X.; HE, X.; AGUT, M.; ROXO-ROSA, M.; GONSALVES, A.R.; SERRA, A.C.; NONELL, S. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2712-2725, 2013.

RANG, H. P.; RITTER, FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**, 7<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012.

REDDY, S. V.; SRINIVAS, P.V.; PRAVEEN, B.; KISHORE, K. H.; RAJU, B.C.; MURTHY, U.S.; RAO, J.M. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 697-700, 2004.

REVILLA J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Rio de Janeiro: INPA, p. 44, 2002.

RODRIGUES, A. C.; OLIVEIRA, B.D.; SILVA, E.R.; N.T.B. SACRAMENTO; BERTOLDI, M.C.; PINTO, U.M. Anti-quorum sensing activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). **Food Sci. Technol**, v. 36, p. 337-243, 2016.

SALES, V.S.; NASCIMENTO, E.P.; MONTEIRO, A.B.; COSTA, M.H.N.; DELMONDES, G.A.; SOARES, T.R.C.; TINTINO, S.R.; SOBREIRA, F.R.; FIGUEIREDO, D.N.; RODRIGUES, C.K.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; FELIPE, C.F.B.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, V.22, N.1, P. 1-10, 2017.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J.R.S.; SANTOS L.E.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R. Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.241-244, 2008.

SALVAT, A.; SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

SAMPAIO, P. S.; SANCHO, L. G.; LAGO, R. F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Caderno de saúde coletiva**, v.26, p. 15-22, 2018.

SANTOS, J. F. S., ROCHA, J. E., BEZERRA, C. F., NASCIMENTO SILVA, M. K., DE MATOS, Y. M. L. S., FREITAS, T. S.; SANTOS, A.T.L.; CRUZ, R.P.; MACHADO, A.J.T.; ROFRIGUES, T.H.S.; BRITO, E.S.; SALES, D.L.; ALMEIDA, W.O.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. (2018). Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018.

SARTO, M. P. M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n.1, p. 98-102, 2014.

SARTORI, S. F. **Frutas da Mata Atlântica: Grumixama**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012.

SCHOLAR, E. M. Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 66, p.164- 172, 2002.

SIEBERT, D.A.; BASTOS, J.; SPUDEIT, D.A.; MICKE, G.A.; ALBERTON, M.D. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and anti-inflammatory activity of crude hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n.4, p. 459–465, 2017.

SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, n.2, p.363-369, 2010.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SILVESTRE, J.D.F.; PAROUL, N.; CEZYEWSKY, E.; LERIM, L.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; HELEN, T. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Rev. Ceres**, v..57, n.5, 2010.

SOBRINHO, T.J.S.P.; CASTRO, V.T.N.A.; SARAIVA, A.M.; ALMEIDA, D.M.; TAVARES, E.A.; AMORIM, E.L.C. Phenolic content and antioxidant capacity of our *Cnidioscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.1, p.2310-2316, 2011.

SOUZA, M. R.; MAINGREDY, X.; MILTON, B.; DRYELLE, S.P.; JÚNIOR, M. Fitoterápicos no tratamento de transtornos de ansiedade. **Eletronic Journal of Pharmacy**, v. 12, Suplemento, p. 11-12, 2015.

SOUZA, M.V.N. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. **Minireviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p.1019-1017, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Instituto Plantarum: Nova Odessa. 640p, 2005.

SUGUINO, E.; MARTINS, A.N.; MINAMI, K.; NARITA, N.; PERDONÁ, M.J. Efeito da porosidade do substrato casca de Pínus no desenvolvimento de mudas de Grumixameira. **Rev. Bras. Frutic**, v. especial, p. 643-648, 2011.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. São Paulo: Artmed, 2012.

TRONCOSO, C.; PAVEZ, M.; SANTOS, A.; SALAZAR, R.; BARRIENTOS, L. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. **Int. J. Morphol.**, v. 35, n. 4, p. 1214-1223, 2017.

VELANDIA, S.A.; QUINTERO, E.; STASHENKO, E.E.; Ocazonez, R.E. Actividad antiproliferativa de aceites esenciales de plantas cultivadas en Colombia. **Acta biol. Colomb.**, v. 23, p. 89-198, 2018.

VELOSO, J.H. **o gênero *Eugenia*: da química à farmacologia**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em química) – Universidade Estadual Paulista, 2016.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; ANGEW. **Chem.**, Int. Ed. 2006.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n.2-3, p. 97-110, 2009.

WANG, J. Analysis of macrolide antibiotics using liquids chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. **Mass spectrometry Reviews**, v. 28, p. 50- 92, 2009.

WANG, B.; ZHANG, Y.; HUANG, J.; DONG, L.; LI, T.; FU, X. Anti-inflammatory activity and chemical composition of dichloromethane extract from *Piper nigrum* and *P. longum* on permanent focal cerebral ischemia injury in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 369–374, 2017.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade Farmácia e Bioquímica**, v. 1, p. 77-81. 1963.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics**. Geneva: WHO, 2017.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Ver.**, v.57, n. 10, p. 1451-70, 2005.

ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Fungitoxic potential of the essential oil the *Piper hispidinervum* (longpepper) against phytopathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, v.39, n.1, p. 193-198, 2009.

ZENI, A. L. B.; BOSIO, F. O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica- Nova Rússia, SC. **Neotrop Biol Conserv.**, v.6, n.1, p. 55-63, 2011.

## 5 CAPÍTULO I

O capítulo I descreve a composição química, a atividade antibacteriana e o efeito modulador de antibióticos aminoglicosídeos, associados aos efeitos da luz azul de LED, dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e *Piper mosenii* C. DC. (OEPm), utilizando a técnica de microdiluição. Os resultados presentes neste artigo demonstram que o composto  $\alpha$ -muurolol foi majoritário no OEEb, enquanto que o  $\alpha$ -pineno e o Bicyclogermacreno foram encontrados em maior quantidade no OEPm. Os dados obtidos revelam que somente o OEPm apresenta atividade antibacteriana e que nas combinações dos dois óleos, antibióticos e luz azul de LED, houveram interações sinérgicas com intensificação desses efeitos proporcionados pela luz. Este artigo foi submetido para a revista *Food and Chemical Toxicology*, o comprovante de submissão encontra-se em anexo.

### 5.1 LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** Representações estruturais dos compostos majoritários do OEEb e OEPm ...54

**FIGURA 2:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos aminoglicosídeos na presença e na ausência do OEEb frente a *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 10 em associação com a luz azul de LED.....58

**FIGURA 3:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos aminoglicosídeos na presença e na ausência do OEPm frente a *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 10 em associação com a luz azul de LED.....58

### 5.2 LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Compostos químicos identificados na espécie *Eugenia brasiliensis* Lam.....53

**TABELA 2:** Compostos químicos identificados na espécie *Piper mosenii* C. DC.....53

**TABELA 3:** Média geométrica da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C.DC. na ausência e presença da Luz de LED azul.....55

## **EFEITO DA LUZ AZUL DE LED SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE ANTIBIÓTICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia brasiliensis* Lam E *Piper mosenii* C. DC.**

Rakel Olinda Macedo da Silva<sup>1,2</sup>, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro<sup>1,2</sup>, Ana Carolina Justino de Araújo<sup>1</sup>, José Walber Gonçalves Castro<sup>2</sup>, Orlando de Menezes Dantas Junior<sup>2</sup>, Raíra Justino Oliveira Costa<sup>2</sup>, Luciely Leite Pinto<sup>2</sup>, Edinaldo Fagner Ferreira Matias<sup>1,2</sup> Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1,2</sup>

1- Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular- LMBM, Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato, Ceará, Brasil.

2-Centro Universitário Dr. Leão Sampaio – Unileão – Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil

### **RESUMO**

A resistência bacteriana representa um dos principais problemas de saúde pública mundial. Muitos trabalhos têm demonstrado que a utilização em conjunto de antibióticos, produtos naturais e luz pode ser utilizada no combate a esses microrganismos resistentes. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fitoquímica e a atividade antibacteriana e moduladora da luz azul do diodo emissor de luz (LED) associada a antibióticos e aos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e *Piper mosenii* C. DC.(OEPm). Os óleos essenciais das folhas foram obtidos através de hidrodestilação e os componentes químicos foram avaliados por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos foram testadas utilizando o método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O efeito antibacteriano e combinado com aminoglicosídeos associado ao uso do LED azul também foi determinado. O composto  $\alpha$ -muurolol(12,01%) foi majoritário no OEEb, enquanto que o  $\alpha$ -pineno(14,59%) e o biciclogermacreno(12,25%) foram encontrados em maior quantidade no OEPm. OEEb e OEPm apresentaram uma CIM  $\geq$  512 contra as linhagens testadas. Quando avaliada em associação aos óleos essenciais, a luz azul de Led potencializou a ação dos antibióticos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, principalmente frente a cepa bacteriana Gram negativa. Dessa forma, a junção destes óleos essenciais com a luz azul de LED revela a presença de compostos químicos fotossensibilizadores nas espécies em estudo, que permitiram a interação da luz com as células bacterianas e os fármacos.

**Palavras-chave:** *Eugenia brasiliensis* Lam. LED. Modulação. *Piper mosenii* C. DC. Resistência.

### **1 INTRODUÇÃO**

A resistência bacteriana se apresenta como um fenômeno ocasionado por diversos mecanismos, seja através da evolução ou da adaptação (SAMPAIO; SANCHO; LAGO,

2018). São consequências relacionadas à resistência um aumento tanto na morbidade quanto na mortalidade de pacientes infectados, assim como um aumento nos custos de internação, sendo a resistência a drogas um dos principais problemas de saúde pública mundial (NATHAN; CARS, 2014; PILTCHER et al., 2018).

A organização mundial de saúde (OMS) publicou em fevereiro de 2017 um documento demonstrando as principais bactérias que devem ser estudadas na pesquisa de novos antibióticos, por apresentarem escassas opções de tratamento. Entre essas, espécies Gram negativas de Enterobactérias resistentes a carbapenênicos e cefalosporinas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, bem como espécies Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) e vancomicina são destacadas (WHO, 2017).

Tendo em vista essa problemática, os produtos naturais como os óleos essenciais estão sendo amplamente estudados por apresentarem resultados promissores no tratamento de diversas enfermidades, pois apresentam em sua constituição metabólitos secundários com importantes atividades biológicas (HOSSEINZADEH et al., 2017; SOUZA et al., 2015; SOBRINHO et al., 2011). Muitos trabalhos têm demonstrado eficácia na utilização conjunta de antibióticos e produtos naturais como os óleos essenciais através da demonstração de um efeito sinérgico, principalmente contra linhagens multirresistentes (COUTINHO et al., 2012).

A planta *Eugenia brasiliensis* Lam (Myrtaceae) é uma espécie florestal nativa conhecida popularmente como “grumixama” (LORENZI, 2002). Esta apresenta várias aplicabilidades, como alimento ou devido às suas propriedades medicinais (BENFATTI et al., 2010; SUGUINO et al., 2011; MAGINA et al., 2012). Dentre essas propriedades, podem ser citadas as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antidepressiva e antioxidante (MAGINA et al., 2010; COLLA et al., 2012; SIEBERT et al., 2017; LAZARINI et al., 2018).

A espécie *Piper mosenii* C. DC. não apresenta nome popular ou utilização como planta medicinal relatadas na literatura, sendo raros os artigos encontrados com a utilização desta espécie. No entanto, várias espécies pertencentes ao gênero *Piper* possuem importância econômica sendo também utilizadas como plantas medicinais, apresentando propriedades antimicrobianas e antiproliferativas (GOGOSZ et al., 2012; BERNUCI et al., 2016; VELANDIA et al., 2018).

A terapia luminosa por diodo emissor de luz (LED) também representa uma forma de tratamento usada contra infecções (LIPOVISKY et al., 2010). Esta é uma ótima alternativa para cicatrização de feridas, reparação tecidual e tratamento de outras patologias de pele, sem causar efeitos colaterais ao paciente (DOURADO et al., 2011).



Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a constituição química e o potencial antibacteriano e modulador dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC. associados a luz azul de LED frente a cepas padrões e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

## 2 METODOLOGIA

As amostras de óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC., assim como a metodologia de coleta do material, extração dos óleos e determinação da composição química foram cedidas pela equipe do professor Luiz Everson, da Universidade Federal do Paraná, e fazem parte do projeto Biodiversidade química.

### 2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As folhas frescas de *Eugenia brasiliensis* Lam foram coletadas em Atalanta – Santa Catarina, Brasil com coordenadas: 25° 29.830' S e 49° 00.919' W e uma altitude de 640 metros. Uma exsicata da espécie foi deposita no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein da Universidade Regional de Blumenau sob o número: FURB32094. As folhas frescas de *Piper mosenii* C. DC. Foram coletadas na Reserva Biológica Bom Jesus no município de Guaraqueçaba - Paraná, Brasil com coordenadas: S 25° 13.939' e W 48° 34.821' e uma altitude de 13 metros. Uma exsicata da espécie foi deposita no Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM) em Curitiba sob o número: MBM396409 (SISGEN N° A37FBDC).

A extração do óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e de *Piper mosenii* C. DC.(OEPm) foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho tipo Clevenger, onde 100g das folhas frescas e 50g das folhas secas, respectivamente, foram trituradas e colocadas em um balão de vidro juntamente com 1,0L de água destilada, permanecendo em ebulição por 2h e 30 minutos para extração do OEEb e 4,5 horas para extração do OEPm (WASICKY, 1963). As folhas de *P. mosenii* foram secadas com secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40° C por 24 horas. Após a extração. Para determinação do rendimento de óleo essencial em base seca, foi aferido a massa total de óleo essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano na proporção de 1 % e 1,0 µL da solução foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N. O injetor foi mantido a 250 °C. A separação dos constituintes foi obtida em coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e utilizando hélio como gás carreador (1,0 mL min<sup>-1</sup>). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C a uma taxa de 3°C min<sup>-1</sup>. O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras s<sup>-1</sup> e faixa de massas de 40 a 450 u. A linha de transferência foi mantida a 260° C, a fonte de íons a 230° C e o analisador (quadrupolo) a 150° C.

Para a quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280°C. Foram empregadas as mesmas coluna e condições analíticas descritas acima, exceto pelo gás carreador usado, que foi o hidrogênio, a uma vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotescas (WILEY, 1994; NIST, 2016) e também por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C<sub>7</sub>-C<sub>26</sub>) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

## 2.3 ANTIBIÓTICOS, MEIOS DE CULTURA E MICRORGANISMOS

Os antibióticos líquidos gentamicina e amicacina foram obtidos de LaborClin, Brasil. Os meios de cultura Agar infusão de coração (HIA) e *Brain Heart Infusion* (BHI) foram adquiridos de HIMEDIA.

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* 10.

## 2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram pesadas 10 mg de cada óleo a ser testado e diluídos em 0,5 mL de DMSO. Em seguida, essa solução foi diluída em 9,265 mL de água destilada, perfazendo um total de 9,765 mL de solução com concentração de 1024 µg/mL para cada substância. Essa solução foi utilizada para os testes de CIM e modulação. Os antibióticos utilizados no teste também foram preparados com concentração inicial de 1024 µg/mL.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR CONTATO DIRETO

As culturas de bactérias foram semeadas em meio HIA e colocadas na estufa a 37°C para crescimento por 24 horas. Após esse período, foram coletadas amostras de cada cultura microbiana e diluídas, em triplicata. Após esse procedimento, foi testado a turbidez da solução com tubo 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em meio BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

Para avaliar a atividade antibacteriana foram adicionados 100 µL da solução final dos inóculos em cada poço da placa de microdiluição, e em seguida foi feita a microdiluição seriada com a solução de 100 µL de cada óleo, por coluna, variando nas concentrações de 512 µg/mL no primeiro poço a 0,5 µg/mL no último poço. As microdiluições foram realizadas em triplicata. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a  $35 \pm 2$  °C. A determinação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a adição de 20 µL de resazurina em cada poço e observação ocular após 1 hora (NCCLS, 2003).

Para verificar a modulação do efeito antibacteriano foram utilizados os antibióticos amicacina e gentamicina frente às cepas multirresistentes. Os antibióticos foram diluídos em um volume de 100 µL seriadamente nos poços contendo o meio de cultura BHI a 10% e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o produto natural na concentração subinibitória (CIM/8). O controle positivo do teste foi realizado com o meio de cultura contendo o inóculo (COUTINHO et al., 2008). As placas foram incubadas por 24 horas  $35 \pm 2$  °C. Após a incubação foi utilizado a resazurina sódica para evidenciar a atividade moduladora.

## 2.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA COM EXPOSIÇÃO À LUZ DE LED AZUL

O aparelho utilizado durante o procedimento experimental com LED foi o *Light Emithing Diodes- LED*, da marca NEW Estética®. Foi utilizada a luz azul, com um comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho de 415nm.

Para a realização destes testes, inicialmente foram utilizadas as mesmas metodologias referentes ao teste de avaliação da atividade antibacteriana e moduladora por contato direto. As placas foram submetidas à luz de LED azul durante vinte minutos e posteriormente foram incubadas a 37 °C, durante 24h. Os testes foram realizados em triplicata e para determinação da CIM foi utilizada a resazurina sódica (PEREIRA et al., 2017).

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0* e analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando a média geométrica das triplicatas como dado central e o desvio padrão da média. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde  $p < 0,05$  é considerado significativo).

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

A extração do óleo essencial das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC. apresentou rendimento de 0,27% e 0,49%, respectivamente. No OEEb foram evidenciados 20 compostos químicos e no OEPm foram encontrados 18 compostos, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Compostos químicos identificados no óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam

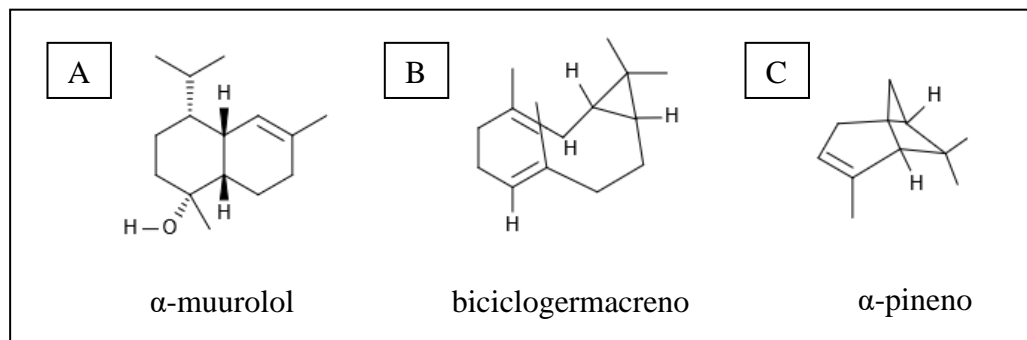
IR Calculado	Composição	%
935	triciclono	7.27
980	sabineno	5.39
1030	limoneno	8.96
1034	1,8-cineol	4.84
1103	linalol	1.54
1196	$\alpha$ -terpineol	1.53
1425	E-cariofileno	2.69
1503	macrocarpeno	2.30
1521	$\gamma$ -cadineno	1.22
1530	$\delta$ -cadineno	5.26
1576	longipinanol	1.01
1587	espatulenol	6.16
1593	2- $\alpha$ -ol- tuujopsan	6.11
1603	cubeban-11-ol	4.40
1613	5-epi-7-epi- $\alpha$ -eudesmol	2.12
1624	1,10-di-epi-cubenol	1.23
1638	1-epi-cubenol	4.35
1651	$\alpha$ -muurolol (=Torreyol)	12.01
1657	valerianol	3.60
1665	selin-11-em-4- $\alpha$ -ol	7.10

**Tabela 2:** Compostos químicos identificados no óleo essencial de *Piper mosenii* C. DC.

IR Calculado	Composição	%
935	$\alpha$ -pineno	14,59
980	$\beta$ -pineno	2,72
1445	aromadendreno	2,12
1460	$\alpha$ -humuleno	3,85
1468	allo-aromadendreno	3,74
1483	D germacreno	1,08
1487	$\gamma$ - Muuroleno	2,77
1493	$\beta$ -selineno	1,92
1504	biciclogermacreno	12,25
1531	$\delta$ -cadineno	4,74
1587	fokienol	8,43
1592	globulol	6,15
1613	Sesquithuriferol	1,5
1619	epi-cedrol	1,89
1652	$\alpha$ -cadinol	2,02
1665	neo-intermedeol	1,62
1670	intermedeol	1,66
1695	acetato de cariofileno	4,73

Na avaliação da composição química, o composto  $\alpha$ -muurolol foi majoritário no OEEb, enquanto que o  $\alpha$ -pineno e o biciclogermacreno foram encontrados em maior quantidade no OEPm ( Figura 1).

**Figura 1:** Representações estruturais dos compostos majoritários dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C.DC.



A- Composto majoritário do OEEb ; B, C- Compostos majoritários do OEPm

Em estudos que relataram a composição do óleo essencial das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam, também foi descrito a presença do espatulenol, bem como outros componentes como  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, t-cadinol,  $\alpha$  e  $\beta$ -selineno (APEL et al., 2004; FISCHER et al., 2005). Moreno et al. (2007) descreveu como um dos componentes majoritários deste óleo essencial o 1,8-cineol, composto também encontrado em menor quantidade no presente estudo.

No estudo de Fidyt et al. (2016), utilizando óleo essencial de espécies do gênero *Piper*, o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e pineno ( $\alpha$  e  $\beta$ ) foram identificados como constituintes principais, concordando com a presente pesquisa, onde o  $\alpha$ -pineno foi descrito como componente majoritário. No entanto, Bernuci et al. (2016) descreveram pela primeira vez a composição do óleo essencial da espécie *Piper mosenii* C. DC., tendo como compostos majoritários óxido de cariofileno e  $\alpha$ -humuleno e em menor quantidade, outros compostos como  $\beta$ -pineno, p-cimeno,  $\alpha$ -thujene, (E)-cariofileno, bicyclgermacreno,  $\gamma$ -cadineno, trans-calameneno, aloaromadendreno, globulol, Viridiflorol e  $\alpha$ -cadinol.

Algumas diferenças entre a composição e a concentração de componentes dos óleos essenciais da mesma planta em diferentes estudos podem estar relacionadas a fatores ecológicos e relacionados ao meio, como o clima, o relevo, temperatura e o tipo de solo, bem como a parte da planta utilizada (ANDRADE et al., 2012). De acordo com Radünz et al. (2012) o acúmulo de princípios ativos também pode variar de acordo com o período do ano, devido a fatores genéticos e fisiológicos da espécie, além disso, a idade e o processo de secagem das folhas também pode interferir no rendimento de alguns constituintes.

### 3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR CONTATO DIRETO

Os resultados da avaliação antibacteriana dos óleos essenciais estão demonstrados na Tabela 3, onde o OEPm apresentou melhor atividade, com uma CIM de 512 para as cepas de *Staphylococcus aureus* testadas. A presença da luz de LED azul foi indiferente nesse teste, pois não causou alteração das CIM avaliadas.

**Tabela 3:** Média geométrica da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C.DC. na ausência e presença da Luz de LED azul.

Cepas bacterianas	OEEb		OEPm	
	Luz ambiente	LED Azul	Luz ambiente	LED Azul
<b>SA 25923</b>	$\geq 1024$	$\geq 1024$	512	512
<b>SA 10</b>	$\geq 1024$	$\geq 1024$	512	512
<b>EC 25922</b>	$\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 1024$
<b>EC 06</b>	$\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 1024$

O óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam não apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, com CIM  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ . Este resultado discorda com o estudo de Magina et al. (2009), em que o óleo essencial das folhas desta espécie apresentou atividade moderada frente à cepa de *Escherichia coli* (CIM igual a 624,9  $\mu\text{g/mL}$ ) e melhor inibição quando testado frente à *Staphylococcus aureus* (CIM igual a 156,2  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando também a metodologia de microdiluição.

Estas divergências podem estar relacionadas a diferenças na composição química do produto utilizado, já que Magina et al. (2009) identificaram como principais compostos o espatulenol (12,6%) e s-cadinol (8,7%), enquanto que no óleo essencial do presente estudo o composto majoritário foi o  $\alpha$ -muurolol (12,01%), não havendo na literatura relatos sobre sua ação antibacteriana.

Foi observada atividade antibacteriana frente à cepa padrão e multirresistente de *Staphylococcus aureus* quando utilizado o óleo essencial de *Piper mosenii* C.DC. Um estudo de avaliação da atividade antimicrobiana, utilizando o método de disco difusão, demonstrou que as espécies de *Piper* apresentam potencial antibacteriano, nessa pesquisa o extrato

etanólico bruto e as frações hexânica e  $\text{CHCl}_3$  das folhas de *Piper mollicomum* mostraram atividade frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, assim como foi observado com a espécie utilizada no presente estudo (ALVES et al., 2016).

Em outra pesquisa, Dorman e Deans (2000), avaliando a bioatividade do  $\alpha$ -pineno, composto químico majoritário no óleo essencial de *P. mosenii* C.DC., observaram formação de halo de inibição frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella pullorum*, *Klebsiella pneumoniae* entre outras espécies bacterianas. Em estudo que utilizou metodologia de microdiluição para determinação da CIM, o  $\alpha$ -pineno também apresentou atividade frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, com CIM igual a 128  $\mu\text{g/mL}$  (SIENIAWSKA et al., 2018).

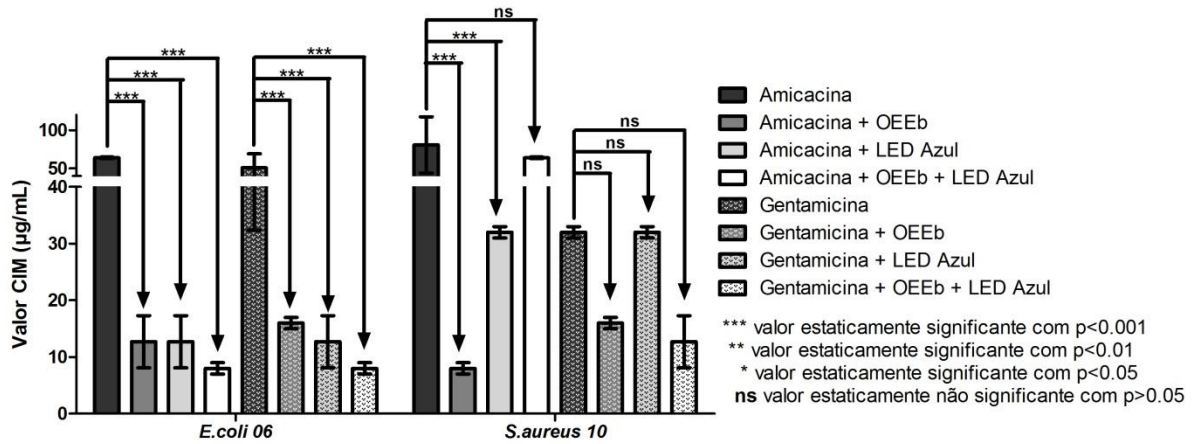
Na pesquisa de Silva et al. (2012) o enantiômero positivo do  $\alpha$ -pineno apresentou ação frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) com uma CIM de 4,150  $\mu\text{g/mL}$ , este também foi efetivo contra os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, o que demonstra um efeito antimicrobiano relacionado a essa substância química.

### 3.3 EFEITO DA LUZ AZUL DE LED SOBRE A ATIVIDADE MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS

Nos testes de modulação do OEEb com aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina em associação a luz de LED azul (Figura 2) foi evidenciado sinergismo com todas as combinações frente à cepa multirresistente de *Escherichia coli*, com a luz de LED azul potencializando ainda mais estes resultados. Frente à cepa multirresistente de *Staphylococcus aureus* foi observado sinergismo quando associado o produto natural com o antibiótico amicacina ou a luz de LED azul com este mesmo antibiótico, neste caso a junção do OEEb com a luz azul e os antibióticos não apresentou ação significativa.



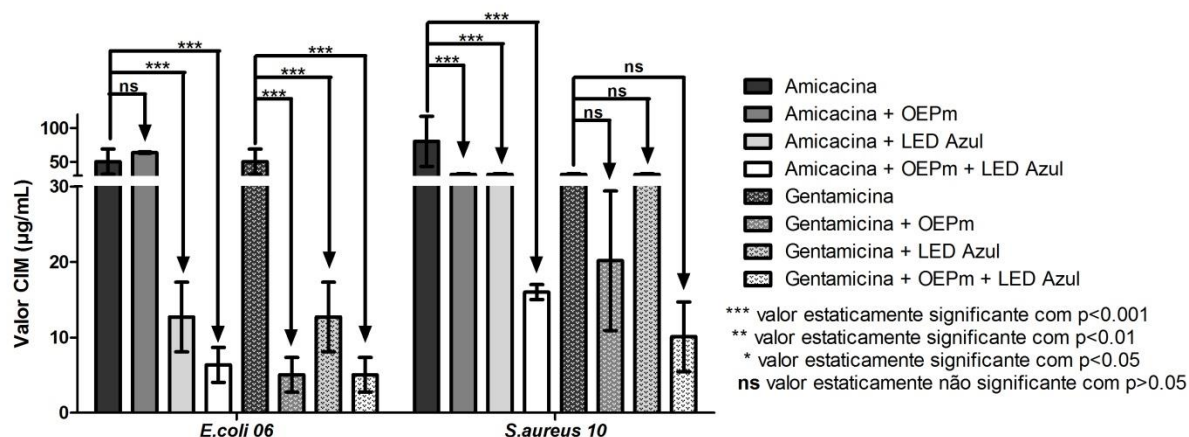
**Figura 2:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos aminoglicosídeos na presença e na ausência do OEEb frente a *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 10 em associação com a luz azul de LED.



Na avaliação da atividade moduladora do OEPm em associação aos antibióticos aminoglicosídeos e a luz azul de LED (Figura 3) frente a *E. coli*, o óleo essencial não foi capaz de modular a ação do fármaco amicacina mostrando indiferença, no entanto, quando associado a luz azul interações sinérgicas foram observadas. Quando avaliada a CIM antibiótico gentamicina, todas as combinações apresentaram sinergismo frente a este microrganismo.

Nos testes com o OEPm + antibióticos+ LED azul frente a *S. aureus* todas as combinações diminuíram a CIM do fármaco amicacina, no entanto houve indiferença quando essas combinações foram testadas junto ao antibiótico gentamicina.

**Figura 3:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos aminoglicosídeos na presença e na ausência do OEPm frente a *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 10 em associação com a luz azul de LED



Os resultados evidenciam uma importante ação moduladora da luz azul de LED, que potencializou de forma significativa a ação dos antibióticos aminoglicosídeos e de forma mais intensa quando associada aos óleos essenciais das espécies de plantas estudadas, principalmente frente a *Escherichia coli*. Estes óleos essenciais podem modificar a ação de antimicrobianos frente a bactérias Gram negativas através de alteração da membrana plasmática bacteriana, facilitando a entrada dessas drogas (COUTINHO et al., 2009).

Os resultados observados no presente estudo corroboram com os dados obtidos por Pereira et al. (2017), que ao avaliar a atividade moduladora através do contato gasoso, demonstrou atividade sinérgica da luz azul quando associada ao óleo essencial de *Eugenia jambolana* e antibióticos frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estes autores ressaltaram a importância de novos estudos relacionando óleos essenciais com as luzes do diodo emissor de luz para descoberta de novas terapias eficazes contra bactérias resistentes.

Em seu estudo, Matias et al. (2017), utilizando também combinação entre antibióticos, óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. e luzes azul de LED verificou que esta associação pode modificar a resistência de bactérias Gram negativas. Neste estudo foi observado efeito sinérgico entre os antibióticos Ciprofloxacina e Norfloxacina, luz azul de LED e óleo frente a *E. coli* e *S. aureus* utilizando metodologia de contato gasoso. No entanto, quando testado os antibióticos gentamicina e amicacina em associação a luz azul e o óleo, a diminuição da CIM só foi observada frente à *S. aureus*. Estes resultados diferem em parte do que foi observado no

presente estudo e estas divergências podem ser explicadas pela metodologia utilizada ou constituição química dos óleos essenciais analisados.

De acordo com Caffarel-Salvador et al. (2015) o uso da terapia fotodinâmica é uma nova forma de terapia antimicrobiana, esta que já é utilizada para tratamento de lesões de pele cancerosas tem sido avaliada quanto a eficiência para o tratamento de infecções. Este é um método de baixo custo, que proporciona um reequilíbrio biofísico e bioquímico no tratamento de doenças, além de não ser invasivo (BUENO; CRISTOFOLINI, 2014).

A fototerapia pode atuar causando a ativação de compostos químicos, como foi relatado anteriormente no estudo de Brito et al. (2012) em que compostos presentes na pele do anfíbio *Rhinella jimi* não apresentaram ação antimicrobiana, no entanto, após associação com a luz ultravioleta estes foram ativados inibindo as cepas bacterianas testadas.

A luz de LED azul pode atuar eliminando bactérias Gram positivas e negativas, ação que pode ocorrer através da indução do estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2017). Este efeito acontece quando a luz é associada a compostos químicos encontrados nas plantas medicinais, que atuam como fotossensibilizadores, os quais serão excitados resultando na formação de espécies reativas de oxigênio intracelulares, que causam oxidação de constituintes essenciais das células bacterianas com consequente morte destas (COUTINHO et al., 2009; RÀGAZ et al., 2013).

Este fato corrobora com a ação da luz azul de LED observada no presente estudo, já que os óleos essenciais e a luz tiveram sua ação melhorada quando associados, com maior redução da CIM dos antibióticos testados, demonstrando que nestes óleos estão presentes substâncias fotossensibilizadoras.

A associação de produtos naturais com antibióticos aminoglicosídeos tem efeito sinérgico reduzindo a CIM e a dose necessária para seu uso na terapia de infecções, o que minimiza os efeitos colaterais dessa classe farmacológica (FIGUEIREDO, 2013). A luz de LED pode atuar potencializando mais ainda este efeito, se tornando um promissor método para o combate à resistência bacteriana.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que os óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC. apresentaram ação moduladora da atividade antibiótica principalmente frente à cepa Gram negativa. Uma ação promissora da luz azul de Led foi evidenciada em conjunto com os óleos essenciais testados, melhorando a eficácia de

antibióticos aminoglicosídeos frente a bactérias multirresistentes. Diante disto, torna-se importante a realização de outros estudos relacionados à essas espécies, bem como a exploração do potencial das luzes de LED em conjunto com produtos naturais, afim de elucidar seus efeitos diante dos microrganismos resistentes.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.

ALVES, H.S.; ROCHA, W.R.V.; FERNANDES, A.F.C.; NUNES, L.E.; PINTO, D.S.; COSTA, J.I.V.; CHAVES, M.C.O.; CATÃO, R.M.R. Actividad antimicrobiana de productos obtenidos a partir de especies de *Piper* (Piperaceae). **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 21, 2016. Disponível em: <<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/342/168>>. Acesso em: 28/08/2018.

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 399-408, 2012.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M. Essential oils from *Eugenia* species. Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p.135-138, 2004.

BENFATTI, C.S.; CORDOVA, S.M.D.; GUEDES, A.; MAGINA, M.D.A.; CORDOVA, C.M.M.D. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, p.33-39, 2010.

BERNUCI, K.; IWANAGA, C.C.; FERNANDEZ-ANDRADE, C.M.M.; LORENZETTI, F.B.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. D. S.; GONÇALVES, J.E.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; SCODRO, R.B.L.; CARDOSO, R.F.; BALDIN, V.P.; CORTEZ, D.A.G. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of *Piper* Species. **Molecules**, v.21, 2016.

BRITO, S.V.; FERREIRA, F.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; COSTA, J.G.; ALMEIDA, W.O.; COUTINHO, H.D. Phototoxic and modulatory effects of natural products from the skin of *Rhinella* BUENO, J.; CRISTOFOLINI, G.M.A.F. Led terapia na faixa do vermelho ao infravermelho: uma nova abordagem sob a visão quântica para a saúde. **Revista Saúde Quântica**, v. 3, n. 3, p. 102-110, 2014.

CAFFAREL-SALVADOR, E.; KEARNEY, M.C.; MAIRS, R.; GALLO, L.; STEWART, S.A.; BRADY, A.J.; Donnelly, R.F. Methylene Blue-Loaded Dissolving Microneedles: Potential use in Photodynamic antimicrobial chemotherapy of infected wounds. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 397-412, 2015.

COLLA, A.R.S.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.; COLLA, G.; MAGINA, M.D.; BRIGHENTE, I.M.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 720–731, 2012.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, supl. p. 670-675, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; FALCÃO-SILVA, V.; Lima, E. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**. v. 41, p. 67-72, 2012.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **J Photochem Photobiol B: Biology**. v. 96, p. 63-65, 2009.

DOURADO, K.B.V.; CARNEVALI-JUNIOR, L.C.; PAULO, R.J.F.; GOMES, A.C. LEDTERAPIA, uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual. **Ensaio e Ciência: ciências agrárias, biológicas e da saúde**, v. 15, n.6, p. 231-248, 2011.

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.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZĄDAŁA, L.; SZUMNY, A.  $\beta$ -Caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Med**, v. 5, p. 3007-3017, 2016.

FIGUEIREDO, F.G.; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F.F.; TORRES, C.M.G.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P.; SILVA, J.M.F.L.; SANTOS, F.A.V.; MEDEIROS, C.R.; OLIVEIRA, G.M.M.; COLARES, A.V.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; SILVA, J.C.F.; KERNTOPF, M.R.; FIGUEIREDO, P.R.L.; MATIAS, E.F.F. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, 2013.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.499-500, 2005.

GOGOSZ, A.M.; BOERGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, p. 405-417, 2012.

HOSSEINZADEH, S.B.; BOERGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.B.; BERGO, C. Effect of ultrasound and infrared drying methods on quantitative and qualitative characteristics of *Satureja bachtiarica* essential oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, p.1196-1208, 2017.

LAZARINI, J.G.; SARDEI, J.C.O.; FRANCHIN, M.; NANI, B.D.; FREIRES, I.A.; INFANTE, J.; PASCHOAL, J.A.R.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 132-139, 2018.

LEITE, A.M.; LIMA, E.D.O.; SOUZA, E.L.D.; DINIZ, M.D.F.F.M.; TRAJANO, V.N.; MEDEIROS, I.A.D. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n.1, p. 121-126, 2007.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; LUBART, R. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing. **Laser in Surgery and Medicine**, v.42, n.1, p.467-472, 2010.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v.1. 2002.

MAGINA, M.D.A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H.H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, p. 376–82, 2010.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Quim. Nova**, v. 35, p. 1184-1188, 2012.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E.L.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v.63, p.345-350, 2009.

MATIAS, E.F.F.; BEZERRA, V.B.; BARROS, R.O.; LUCENA, A.L.V.M.; LEITE, V.D.; FEITOSA, J.H.F.; SILVA, M.K.N. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. associado às luzes de LED. **Rev. Interfaces**, v. 5, n.14, p. 07-14, 2017.

MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M.C.M.; CORDEIRO, I.; APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Sci. Agric.**, v. 64, p. 428-432, 2007.

NATHAN, C.; CARS, O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. **New England Journal of medicine.**, v. 37, p. 1761-3.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PEREIRA, N. L. F.; AQUINO, P.E.A.; JÚNIOR, J.G.A.S.; CRISTO, J.S.M.A.V.; MOURA, F.F.; FERREIRA, N.M.N.; SILVA, M.K.N.; NASCIMENTO, E.M.; CORREIA, F.M.A. CUNHA, F.A.B.; BOLINGON, A.A.; COUTINHO, H.D.M.; RIBEIRO-FILHO, J.;

MATIAS, E.F.F.; GUEDES, M.L.F. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, n. 1, p. 144-149, 2017.

PILTCHER, O.B.; KOSUGI, E.M.; SAKANO, E.; MION, O.; TESTA, J.R.G.; ROMANO, F.R.; SANTOS, M.C.J.; DI FRANCESCO, R.C.; MITRE, E.I.; BEZERRA, T.F.P.; ROITHMAN, R.; PADUA, F.G.; VALERA, F.C.P.; NETO, J.F.L.; DÁ, L.C.B.; PIGNATARI, S.S.N.; AVELINO, M.A.G.; CAIXETA, J.A.S.; ANSELMO-LIMA, W.T.; TAMASHIRO, E. How to avoid the inappropriate use of antibiotics in upper respiratory tract infections? A position statement from an expert panel. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 84, p. 265-279, 2018.

RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.; ROCHA, R.P.; BERBERT, P.A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, n.3, p.453-457, 2012.

RAGÀS, X.; HE, X.; AGUT, M.; ROXO-ROSA, M.; GONSALVES, A.R.; SERRA, A.C.; NONELL, S. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2712-2725, 2013.

SAMPAIO, P.S.; SANCHO, L.G.; LAGO, R.F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Caderno de saúde coletiva**, v.26, p. 15-22, 2018

SIEBERT, D.A.; BASTOS, J.; SPUDEIT, D.A.; MICKE, G.A.; ALBERTON, M.D. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and anti-inflammatory activity of crude hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n.4, p. 459-465, 2017.

SIENIAWSKA, E.; SAWICKI, R.; SWATKO-OSSOR, M.; NAPIORKOWSKA, A.; PRZEKORA, A.; GINALSKA, G.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E. The Effect of Combining Natural Terpenes and Antituberculous Agents against Reference and Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Strains. **Molecules**, v. 23, p. 1-14, 2018.

SILVA, A.C.R.; LOPES, P.M.; AZEVEDO, M.M.B.; COSTA, D.C.M.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305- 6316, 2012.

SOBRINHO, T.J.S.P.; CASTRO, V.T.N.A.; SARAIVA, A.M.; ALMEIDA, D.M.; TAVARES, E.A.; AMORIM, E.L.C. Phenolic content and antioxidant capacity of our *Cnidioscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.1, p.2310-2316, 2011.

SOUZA, M. R.; MAINGREY, X.; MILTON, B.; DRYELLE, S.P.; JÚNIOR, M. Fitoterápicos no tratamento de transtornos de ansiedade. **Eletronic Journal of Pharmacy**, v. 12, Suplemento, p. 11-12, 2015.

SUGUINO, E.; MARTINS, A.N.; MINAMI, K.; NARITA, N.; PERDONÁ, M.J. Efeito da porosidade do substrato casca de Pínus no desenvolvimento de mudas de Grumixameira. **Rev. Bras. Frutic**, v. especial, p. 643-648, 2011.

VELANDIA, S.A.; QUINTERO, E.; STASHENKO, E.E.; Ocazonez, R.E. Actividad antiproliferativa de aceites esenciales de plantas cultivadas en Colombia. **Acta biol. Colomb.**, v. 23, p. 89-198, 2018.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade Farmácia e Bioquímica**, v. 1, p. 77 - 81. 1963.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics**. Geneva: WHO, 2017.



## 6 CAPÍTULO II

O capítulo II descreve a atividade moduladora dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e *Piper mosenii* C. DC. (OEPm) em associação com antibióticos de diferentes classes farmacológicas frente a bactérias resistentes, utilizando a técnica de microdiluição. Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima indicam que o OEEb apresentou interações sinérgicas frente às cepas Gram positiva e Gram negativa, enquanto que o OEPm melhorou a ação de antibióticos somente frente a cepa Gram negativa. Este artigo está em tradução para posterior submissão.

### 6.1 LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** Representações estruturais dos compostos majoritários do OEEb e OEPm ....71

**FIGURA 2:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Eritromicina na presença e na ausência do OEEb frente a *S. aureus* 10.....72

**FIGURA 3:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Eritromocina na presença e na ausência do OEEb frente a *E. coli* 06.....72

**FIGURA 4:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Eritromocina na presença e na ausência do OEPm frente a *S. aureus* 10.....73

**FIGURA 5:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Eritromocina na presença e na ausência do OEPm frente a *E. coli* 06.....73

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE MODULADORA SOBRE ANTIBIÓTICOS  
GENTAMICINA, ERITROMICINA E NORFLOXACINA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS  
DE *Eugenia brasiliensis* Lam E *Piper mosenii* C. DC.**

Rakel Olinda Macedo da Silva<sup>1,2</sup>, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro<sup>1,2</sup>, Ana Carolina Justino de Araújo<sup>1</sup>, José Walber Gonçalves Castro<sup>2</sup>, Orlando de Menezes Dantas Junior<sup>2</sup>, Raíra Justino Oliveira Costa<sup>2</sup>, Luciely Leite Pinto<sup>2</sup>, Edinando Fagner Ferreira Matias<sup>1,2</sup> Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1,2</sup>

1- Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular- LMBM, Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato, Ceará, Brasil.

2-Centro Universitário Dr. Leão Sampaio – Unileão – Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil

## RESUMO

A utilização inadequada de antibióticos pode levar a sérios problemas, como a indução à resistência bacteriana e as pesquisas utilizando óleos essenciais extraídos de plantas medicinais vem se tornando uma eficiente forma de combater este problema, pois estes óleos possuem diversas propriedades biológicas. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil químico e a atividade moduladora de antibióticos pelos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e *Piper mosenii* C. DC.(OEPm). Os óleos essenciais das folhas foram obtidos através de hidrodestilação e os componentes químicos foram avaliados por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A avaliação da atividade moduladora dos antibióticos norfloxacina(quinolona), gentamicina(aminoglicosídeo) e eritromicina(macrolídeo) foi realizada utilizando o método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O principal composto encontrado no OEEb foi o  $\alpha$ -muurolol(12,01%), enquanto que o  $\alpha$ -pineno(14,59%) e o biciclogermacreno(12,25%) foram majoritários no OEPm. No teste de modulação utilizando OEEb, foi possível evidenciar sinergismo quando junto a Norfloxacina e eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* respectivamente, enquanto que OEPm apresentou um sinergismo quando associado à gentamicina e eritromicina contra *E. coli*. A partir dos resultados observados foi possível evidenciar que as três classes de fármacos testadas podem ter sua atividade melhorada na presença dos óleos essenciais, tornando-se assim importante a realização de novos estudos relacionados a estas espécies e seus fitoconstituintes, contribuindo no combate a resistência bacteriana.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. Modulação. Resistência. *Staphylococcus aureus*

## 1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são medicamentos que revolucionaram o tratamento de infecções bacterianas, apresentando grande impacto na saúde, pois reduziram em todo o mundo as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a essas infecções (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). No entanto, a utilização inadequada desses antibióticos pode levar a sérios problemas, como a

indução à resistência bacteriana, que se apresenta como um fenômeno ocasionado por diversos mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos através da evolução e adaptação genética (SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018).

Esta pode ser natural, ou seja, intrínseca ao microrganismo que naturalmente resiste a determinado antimicrobiano, ou adquirida, ocasionada pela aquisição de mecanismos, como alterações na permeabilidade, impedindo que o antibiótico atinja o sítio de ligação da bactéria; efluxo rápido (bomba de efluxo), ocorrendo através de proteínas que atuam como bombas que expõem o medicamento; e alterações no sítio de ligação, por meio de modificações genéticas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Este fenômeno não se restringe mais ao ambiente hospitalar, pois atualmente são comumente isoladas de pacientes com infecções comunitárias bacterianas resistentes. Além disso, o surgimento e aprovação de novas drogas não ocorrem na mesma velocidade que o desenvolvimento dos mecanismos bacterianos de resistência (LAZOVSKI, 2017; TRONCOSO, 2017).

As pesquisas utilizando óleos essenciais vem se tornando uma eficiente forma de combater este problema, pois vários estudos têm demonstrado suas propriedades antioxidantes, atividade antibacteriana frente a cepas Gram positivas e negativas, antifúngica e antiparasitária, representando um potencial na produção de fármacos eficazes para o tratamento de infecções (ANDRADE et al., 2012; SARTEO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

A planta *Eugenia brasiliensis* Lam é uma espécie encontrada no Brasil, desde o Norte da Bahia até Santa Catarina, conhecida popularmente como grumixama, está amplamente cultivada devido aos seus frutos que são saborosos e consumidos pelo homem (ARÉVALO et al., 2014; LORENZI, 2002). A infusão das folhas desta espécie é uma das principais formas da sua utilização como planta medicinal, podendo ser empregada no tratamento de reumatismo e artrite; possuindo também ação antidiarreica e diurética (REVILLA, 2002).

Não são encontrados estudos relatando a importância medicinal de *Piper mosenii* C.DC. No entanto, várias espécies pertencentes ao gênero *Piper* possuem importância econômica sendo também utilizadas como plantas medicinais, como *Piper crassinervium* H.B. & K. (jaborandi) e *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), sendo encontrados em espécies deste gênero compostos químicos como o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e  $\beta$ -pineno (FIDYT et al., 2016; GOGOSZ et al., 2012).

Com o considerável aumento de cepas bacterianas multirresistentes aos antibióticos existentes no mercado, a busca por novas substâncias a partir dessas plantas medicinais, capazes de inibir e ou destruir estes microrganismos potencialmente fatais, torna-se

indispensável na tentativa de minimizar a mortalidade, bem como as possíveis complicações decorrentes destas infecções (PINHEIRO; MENEGUELLI, 2016).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar o perfil químico e a atividade moduladora de antibióticos pelos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e *Piper mosenii* C. DC. (OEPm) frente a cepas multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

## 2 METODOLOGIA

As amostras de óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC., assim como a metodologia de coleta do material, extração dos óleos e determinação da composição química foram cedidas pela equipe do professor Luiz Everson, da Universidade Federal do Paraná, e fazem parte do projeto Biodiversidade química.

### 2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As folhas frescas de *Eugenia brasiliensis* Lam foram coletadas em dezembro de 2015 em Atalanta – Santa Catarina, Brasil com coordenadas: 25° 29.830' S e 49° 00.919' W e uma altitude de 640 metros. Uma exsicata da espécie foi deposita no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein da Universidade Regional de Blumenau sob o número: FURB32094. As folhas frescas de *Piper mosenii* C. DC. Foram coletadas em agosto de 2015 na Reserva Biológica Bom Jesus no município de Guaraqueçaba - Paraná, Brasil com coordenadas: S 25° 13.939' e W 48° 34.821' e uma altitude de 13 metros. Uma exsicata da espécie foi deposita no Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM) em Curitiba sob o número: MBM396409 (SISGEN Nº A37FBDC).

A extração do óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam (OEEb) e de *Piper mosenii* C. DC.(OEPm) foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho tipo Clevenger, onde 100g das folhas frescas e 50g das folhas secas, respectivamente, foram trituradas e colocadas em um balão de vidro juntamente com 1,0L de água destilada, permanecendo em ebulição por 2h e 30 minutos para extração do OEEb e 4,5 horas para extração do OEPm (WASICKY, 1963). As folhas de *P. mosenii* foram secadas com secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40° C por 24 horas. Para determinação do rendimento de óleo essencial em base seca, foi aferido a massa total de óleo

essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano na proporção de 1 % e 1,0  $\mu\text{L}$  da solução foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N. O injetor foi mantido a 250 °C. A separação dos constituintes foi obtida em coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e utilizando hélio como gás carreador (1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C a uma taxa de 3°C  $\text{min}^{-1}$ . O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras  $\text{s}^{-1}$  e faixa de massas de 40 a 450 u. A linha de transferência foi mantida a 260° C, a fonte de íons a 230° C e o analisador (quadrupolo) a 150° C.

Para a quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280°C. Foram empregadas as mesmas coluna e condições analíticas descritas acima, exceto pelo gás carreador usado, que foi o hidrogênio, a uma vazão de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ . A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotescas (WILEY, 1994; NIST, 2016) e também por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos ( $\text{C}_7\text{-C}_{26}$ ) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

## 2.3 ANTIBIÓTICOS, MEIOS DE CULTURA E MICRORGANISMOS

Os antibióticos líquidos norfloxacin, gentamicina e eritromicina foram obtidos de LaborClin, Brasil. Os meios de cultura Agar infusão de coração (HIA) e *Brain Heart Infusion* (BHI) foram adquiridos de HIMEDIA.

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* 10.

#### 2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram pesadas 10 mg de cada óleo a ser testado e diluídos em 0,5 mL de DMSO. Em seguida, essa solução foi diluída 9,265 mL de água, perfazendo um total de 9,765 mL de solução com concentração de 1024 µg/mL para cada substância. Essa solução foi utilizada para os testes de modulação. Os antibióticos utilizados no teste também foram preparados na concentração inicial de 1024 µg/mL.

#### 2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR CONTATO DIRETO

As culturas de bactérias foram semeadas em Placas de Petri contendo HIA e colocadas na estufa a 37°C para crescimento por 24 horas. Após esse período, foram coletadas amostras de cada cultura microbiana e diluído em tubos de ensaio identificados, em triplicata. Após esse procedimento, foi testado a turbidez da solução com um controle de McFarland.

Para verificar a modulação do efeito antibacteriano foram utilizados antibióticos de diferentes classes (norfloxacina, gentamicina e eritromicina) frente às cepas testadas, através do método proposto por Coutinho et al. (2008). Os antibióticos foram diluídos em um volume de 100 µL seriadamente nos poços contendo o meio de cultura BHI a 10% e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o produto natural na concentração subinibitória (CIM/8). O controle positivo do teste foi realizado com o meio de cultura contendo o inóculo. As placas foram incubadas por 24 horas  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após a incubação foi utilizado a resazurina sódica para evidenciar a atividade moduladora.

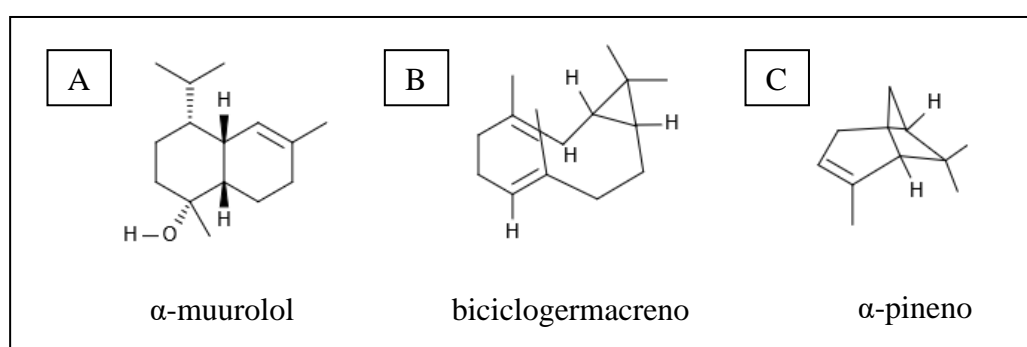
#### 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0* e analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando a média geométrica das triplicatas como dado central e o desvio padrão da média. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde  $p < 0,05$  é considerado significativo).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da avaliação dos componentes químicos, no OEEb foi identificado como principal composto o  $\alpha$ -muurolol(12,01%) e no OEPm foram identificados como substâncias majoritárias o  $\alpha$ -pineno(14,59%) e o biciclogermacreno(12,25%) (Figura 1), tendo como compostos majoritários aqueles que apresentaram porcentagem superior a 10%.

**Figura 1:** Representações estruturais dos compostos majoritários dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C.DC.



A- Composto majoritário do OEEb ; B, C- Compostos majoritários do OEPm

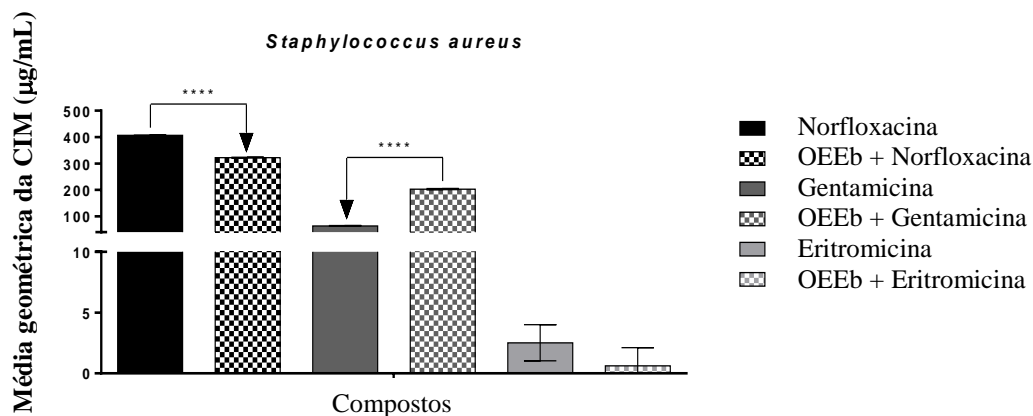
Em pesquisa de Siebert et al. (2015) também foram descritos como principais componentes do óleo essencial das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam os sesquiterpenos, como o espatulenol e o T-cadinol, bem como o monoterpene  $\alpha$ -pineno. Enquanto que Pietrovski et al. (2008), utilizando extratos das folhas de *Eugenia brasiliensis*, descreveram em seu estudo a presença de flavonoides como a quercetina, rutina, galangina e miricetina, e outros compostos fenólicos como catequina, galocatequina e ácido gálico.

No estudo de Fidy et al. (2016), o  $\alpha$ -pineno foi identificado entre os constituintes principais dos óleos essenciais de espécies do gênero *Piper*, corroborando com a presente pesquisa, onde esta substância se apresentou como majoritária no OEPm. Krinski; Foerste; Deschamps (2018) descreveram em seu estudo a presença de outros constituintes majoritários como  $\beta$ -pineno, limoneno, (E)-cariofileno e óxido de cariofileno no óleo essencial das folhas secas de *Piper mosenii* C. DC.

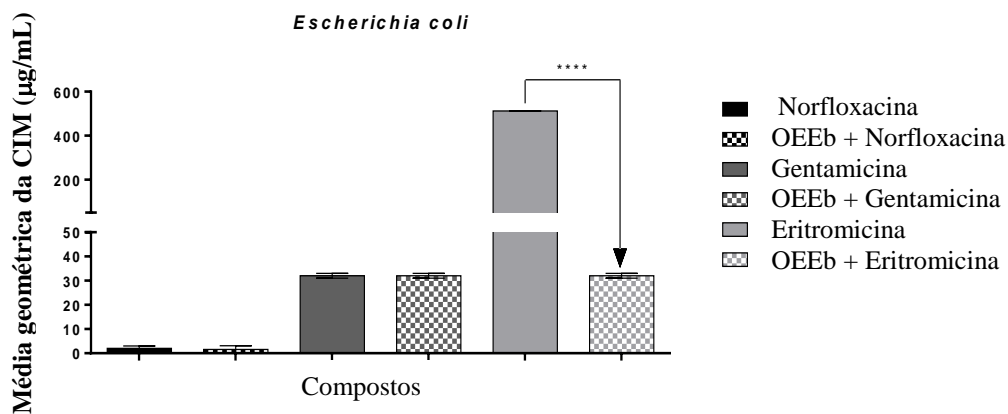
Em seu estudo, Ribeiro, Bonilla e Lucena (2018) demonstraram que podem ocorrer variações na composição química dos óleos essenciais da mesma espécie, em relação ao tipo de constituinte encontrado e sua quantidade, que podem sofrer interferências decorrentes do horário da coleta, estação do ano e ciclo circadiano.

Na associação do óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam com os antibióticos de diferentes classes farmacológicas (Figuras 2 e 3) foi possível evidenciar sinergismo quando utilizado junto a Norfloxacina frente a *S. aureus* 10 e junto a eritromicina contra *E. coli* 06.

**Figura 2:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacina, Gentamicina e Eritromicina na presença e na ausência do OEEb frente a *S. aureus* 10.



**Figura 3:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacina, Gentamicina e Eritromocina na presença e na ausência do OEEb frente a *E. coli* 06.



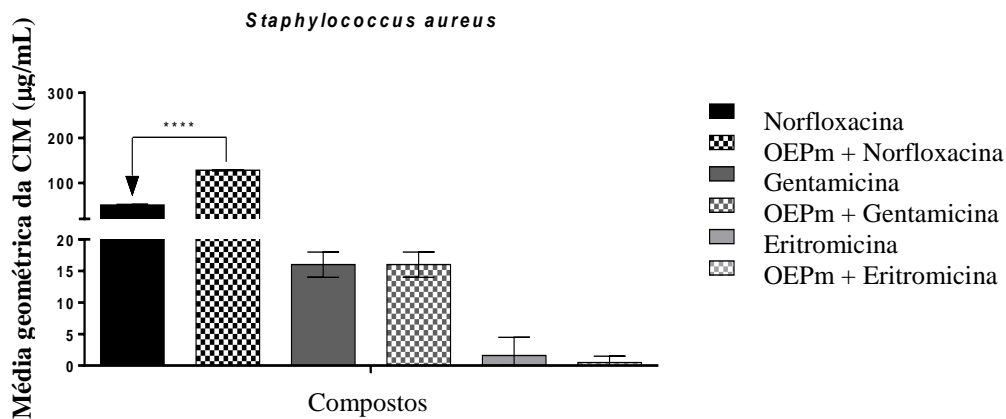
Em seu estudo, Sales et al., (2014) relatou que a associação dos óleos essenciais extraídos das plantas podem apresentar resultados promissores quando associados a fármacos antimicrobianos frente a cepas resistentes Gram positivas e negativas, assim como ocorreu no presente estudo, em que o produto utilizado apresentou uma melhor eficácia quando testado junto à norfloxacina frente a cepa de *S. aureus* e quando combinado com antibiótico eritromicina apresentou melhor ação frente a cepa de *E. coli*.



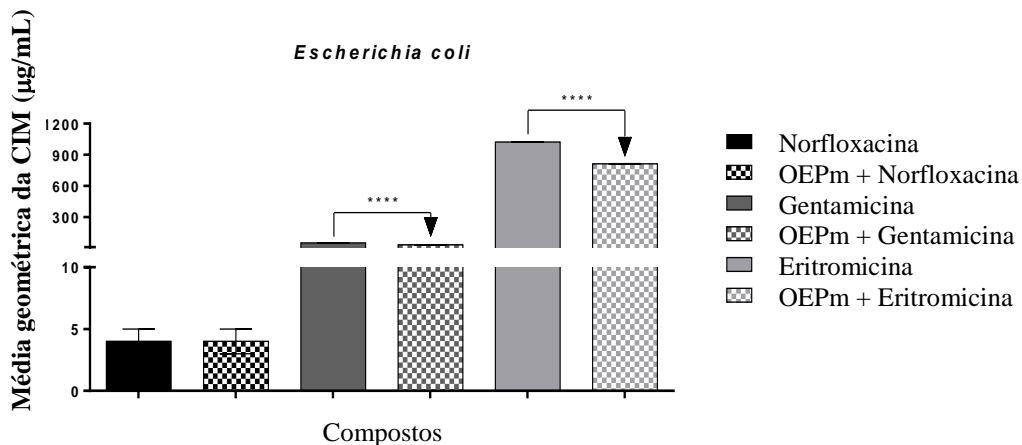
Não há nenhum estudo associando as folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam aos fármacos antimicrobianos. Entretanto, de acordo com Simonetti et al. (2016), espécies do gênero *Eugenia* apresentam substâncias bioativas em seus extratos e óleos essenciais com ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas em diferentes graus de atividade, corroborando com a presente pesquisa.

A partir dos resultados da análise moduladora do óleo essencial de *Piper mosenii* C.DC. utilizando antibióticos (Figuras 4 e 5) foram observadas interações sinérgicas junto aos fármacos gentamicina e eritromicina frente a *Escherichia coli* 06.

**Figura 4:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacina, Gentamicina e Eritromocina na presença e na ausência do OEPm frente a *S. aureus* 10.



**Figura 5:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos Norfloxacina, Gentamicina e Eritromocina na presença e na ausência do OEPm frente a *E. coli* 06.



A espécie *Piper mosenii* C.DC. apresentou um melhor resultado quando testado frente a *Escherichia coli*, reduzindo a CIM de dois antibióticos comumente utilizados na clínica.

Apesar de estudos relatarem uma grande resistência da parede Gram negativa, o que dificulta a entrada e acúmulo de óleos essenciais na célula bacteriana (BARBOSA et al., 2015), pesquisas utilizando plantas medicinais evidenciam uma importante ação moduladora da resistência contra *E. coli* quando associados produtos naturais e antibióticos, como pode ser visto em Ferreira et al. (2016) e Sales et al. (2017).

Esta atividade modificadora de antibióticos do OEPm pode estar relacionada a presença do composto majoritário  $\alpha$ -pineno. Em estudo de Ramdani et al. (2013), o óleo de *Juniperus phoenicea*, que também possui o  $\alpha$ -pineno como componente majoritário, apresentou atividade quando testado frente a bactéria *Escherichia coli*. Leite et al., 2007 também evidenciaram um intenso potencial antibacteriano deste fitoconstituente, ressaltando a importância da sua aplicação na terapia antimicrobiana.

Os resultados referentes ao óleo essencial de *Piper mosenii* C.DC. relatados no presente estudo são pioneiros, pois esta é a primeira pesquisa a apresentar atividades biológicas desta espécie, que é pertencente a um importante gênero rico em plantas medicinais.

De acordo com Coutinho et al. (2009) produtos naturais podem modificar a ação de antimicrobianos através de alteração da membrana plasmática bacteriana ou inibição de bombas de efluxo, revertendo a resistência. Este fato explica as interações sinérgicas demonstradas nesse estudo, com redução da concentração inibitória mínima dos antibióticos frente à bactéria Gram positiva e Gram negativa, enquanto que algumas interações antagônicas podem ser atribuídas a quelação mútua (GRANOWITZ; BROWN, 2008).

#### **4 CONCLUSÃO**

As três classes de fármacos testadas, aminoglicosídeos, macrolídeos e fluoroquinolonas apresentam atividade melhorada na presença dos óleos essenciais, sendo a eritromicina o antibiótico mais influenciado, pois sua CIM foi diminuída pelo OEEb e OEPm frente à cepa de *Escherichia coli*. Assim, torna-se importante a realização de estudos mais aprofundados a cerca dessas espécies e de seus constituintes químicos de forma isolada, contribuindo no combate a resistência bacteriana.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.
- ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 399-408, 2012.
- ARÉVALO, R. P.; SERVIGNINI, L.P.; SILVA, L.A.; MALDONADO, C.A.B.; ARTHUR, V.; AREVALO-PINEDO, A. Concentração de Minerais Presentes em Frutos da Grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam). **Cadernos de Agroecologia**, v.9, p. 1-9, 2014.
- BARBOSA, L.N.; PROBST, I.S.; ANDRADE, B.F.M.T.; ALVES, F.C.B.; ALBANO, M.; SOUZA, M.D.L.R.; DOYAMA, J.T.; RALL, V.L.M.; JÚNIOR, A.F. In vitro Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. **Journal of oleo Science**, v. 64, p. 289-298, 2015.
- COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, v. 7, p. 45-57, 2017.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **J Photochem Photobiol B: Biology**. v. 96, p. 63-65, 2009.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, supl. p. 670-675, 2008.
- FERREIRA, J.V.A.; LIMA, L.F.; FIGUEREDO, F.G.; MATIAS, E.F.F.; SOUZA, E.S.; ANDRADE, J.C.; TINTINO, S.R.; LEITE, N.F.; ALBUQUERQUE, R.S.; BRAGA, M.F.B.M.; CUNHA, F.A.B.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 71-82, 2016.
- FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZAŁA, L.; SZUMNY, A.  $\beta$ -Caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Med**, v. 5, p. 3007-3017, 2016.
- GOGOSZ, A.M.; BOERGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, p. 405-417, 2012.
- GRANOWITZ, E.V., BROWN, R.B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Crit Care Clin**. v. 24, n. 2, p. 421-442, 2008.
- LAZOVSKI, J.; CARDOSO, A.; PASTERAN, F.; MONSALVO, M.; FRENKEL, J.; CORNISTEIN, W.; CORRAL, G.; NACINOVICH, F. Estrategia de control de la resistencia

bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. **Rev Panam Salud Publica**, v. 41, n.1, p. 1-7, 2017.

LEITE, A.M.; LIMA, E.D.O.; SOUZA, E.L.D.; DINIZ, M.D.F.F.M.; TRAJANO, V.N.; MEDEIROS, I.A.D. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n.1, p. 121-126, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v.1. 2002.

PINHEIRO, J. L.; MENEGUELLI, A.Z. *Staphylococcus lugdunensis* e seu potencial para antibioticoterapia. **Rev. Enfermagem e Saúde Coletiva**. v. 1, n. 2, p. 61-73, 2016.

RAMDANI, M.; LOGRADA, T.; SILINI, H.; ZERAIB, A.; CHALARD, P.; FIGUEREDO, G.; BOUCHALAA, M.; ZERRAR, S. Antibacterial Activity of Essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, n. 11, p. 22-28, 2013.

REVILLA J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Rio de Janeiro: INPA, p. 44, 2002.

RIBEIRO, S.M.; BONILLA, O.H.; LUCENA, E.M.P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia**, v. 73, n.1, p. 31-38, 2018.

SALES, G.W.P.; BATISTA, A.H.M.; ROCHA, L.Q.; NOGUEIRA, N.A.P. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 35, n. 4, p.709-715, 2014.

SALES, V.S.; NASCIMENTO, E.P.; MONTEIRO, A.B.; COSTA, M.H.N.; DELMONDES, G.A.; SOARES, T.R.C.; TINTINO, S.R.; SOBREIRA, F.R.; FIGUEIREDO, D.N.; RODRIGUES, C.K.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; FELIPE, C.F.B.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, V.22, N.1, P. 1-10, 2017.

SAMPAIO, P.S.; SANCHO, L.G.; LAGO, R.F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Caderno de saúde coletiva**, v.26, p. 15-22, 2018.

SARTO, M.P.M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n.1, p. 98-102, 2014

SIMONETTI, E.; ETHUR, M.E.; CASTRO, L.C.; KAUFFMANN, C.; GIACOMIN, A.C.; LEDUR, A.; AROSSI, K.; PACHECO, L.A.; GOETTERT, M.I.; FALEIRO, D.; FREITAS, E.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.1, p.9-18, 2016.

SIEBERT, D.A.; BASTOS, J.; SPUDEIT, D.A.; MICKE, G.A.; Alberton, M.D.  
Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and anti-inflammatory activity of crude hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n.4, p. 459–465, 2017.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. São Paulo: Artmed, 2012.

TRONCOSO, C.; PAVEZ, M.; SANTOS, A.; SALAZAR, R.; BARRIENTOS, L.  
Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. **Int. J. Morphol**, v. 35, n. 4, p. 1214-1223, 2017.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade Farmácia e Bioquímica**, v. 1, p. 77 - 81. 1963.

## 7 CONCLUSÕES

- Verificou-se o predomínio de metabólitos secundários da classe dos terpenos em ambos os produtos avaliados. O óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* Lam apresentou 20 compostos químicos, tendo como substância majoritária o  $\alpha$ -muurolol, enquanto que no óleo essencial de *Piper mosenii* C.DC. foram encontrados 18 compostos, com  $\alpha$ -pineno e o Bicyclogermacreno em maior quantidade.
- Foi observado um potencial antibacteriano do OEPm frente a *Staphylococcus aureus* e esta atividade pode estar relacionada ao composto majoritário  $\alpha$ -pineno, que já tem seu potencial antimicrobiano demonstrado em outros estudos. Este é o primeiro relato de atividade biológica de *Piper mosenii* C.DC.
- O OEEb melhorou a atividade da Norfloxacin frente a *S. aureus* e o OEPm reduziu a CIM da gentamicina frente a *E. coli*, enquanto que a eritromicina foi o antibiótico mais influenciado, pois sua CIM foi diminuída pelos dois óleos frente à cepa de *Escherichia coli*, resultado importante já que as bactérias Gram negativas possuem uma parede rica em lipídeos o que as tornam mais resistentes aos fármacos antimicrobianos. Estes são dados pioneiros, pois não são encontrados na literatura relatos de atividade moduladora destas espécies, desta forma, torna-se importante a realização de estudos mais aprofundados a cerca dessas plantas e de seus constituintes químicos de forma isolada, contribuindo no combate a resistência bacteriana.
- Quando avaliada a interferência da luz azul de LED na ação moduladora dos óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* Lam e *Piper mosenii* C. DC. em associação aos fármacos aminoglicosídeos foi evidenciado uma ação promissora da luz em conjunto com estes óleos essenciais, potencializando a ação dos antibióticos frente a bactérias multirresistentes, pois esta foi capaz de reduzir a CIM na maioria das combinações testadas, principalmente frente a cepa Gram negativa. Estes resultados revelam que os óleos essenciais podem possuir compostos fotossensibilizadores que permitiram a interação da luz com as células bacterianas e com os fármacos.

## ANEXO

### COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Ms. Ref. No.: FCT-D-19-00342

Title: Antibacterial and antibiotic-modulating effects of the essential oils obtained from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper mosenii* C. DC. in association with blue led light and aminoglycosides

Food and Chemical Toxicology

Dear Dr Coutinho,

Your submission entitled "Antibacterial and antibiotic-modulating effects of the essential oils obtained from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper mosenii* C. DC. in association with blue led light and aminoglycosides" will be handled by Guest Editor Niko S Radulovic, Ph.D..

The review process for this journal takes 4-5 weeks on average so please be patient. You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/fct/>.

Your username is: [hdouglas@zipmail.com.br](mailto:hdouglas@zipmail.com.br)

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/fct/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/fct/automail_query.asp).

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Food and Chemical Toxicology