

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

Marcos Vinícius Soares Silva

BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. DA AMAZÔNIA LEGAL COM PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA: Contribuição para o desenvolvimento de novos medicamentos.

São Luís

2020

MARCOS VINÍCIUS SOARES SILVA

BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. DA AMAZÔNIA LEGAL COM PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA: Contribuição para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise Fernandes Coutinho

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Azevedo Feitosa Ferro

São Luís

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva, Marcos Vinicius Soares.

BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia guianensis* Aubl. DC. DA AMAZÔNIA LEGAL COM PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA : Contribuição para o desenvolvimento de novos medicamentos / Marcos Vinicius Soares Silva. - 2020.
66 f.

Coorientador(a): Thiago Azevedo Feitosa Ferro.

Orientador(a): Denise Fernandes Coutinho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

1. Antibiótico. 2. Cariófileno. 3. Pedra-ume-caá. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Tenebrio molitor*. I. Coutinho, Denise Fernandes. II. Ferro, Thiago Azevedo Feitosa. III. Título.

MARCOS VINÍCIUS SOARES SILVA

BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. DA AMAZÔNIA LEGAL COM PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA: Contribuição para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em 13 / 08 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Crisálida Machado Vilanova
Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Denise Fernandes Coutinho - Orientadora
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Flavia Maria Mendonça do Amaral
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª Maria Cristiane Aranha Brito
Doutora em Biotecnologia
Faculdade Uninassau

Dedico esse trabalho a Deus, que sempre iluminou o meu caminho. A fé que tenho no senhor me ajudou a vencer as dificuldades.

Aos meus pais Cosmo Lopes (*in memoriam*) e Cristina Soares por sempre incentivar e ofertar condições para o desenvolvimento acadêmico/profissional.

À toda a minha família pelo suporte oferecido sempre que necessário.

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Denise F. Coutinho, pela paciência e orientação na execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro e prof. Dr. José Guilherme S. Maia, pelas contribuições desde o planejamento e parcerias para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Thiago Azevedo F. Ferro, pelas contribuições valiosas na área da microbiologia.

Ao Prof. Pablo Figueiredo e mestrando Yan Fernandes pelas contribuições na identificação dos compostos do óleo essencial.

Aos Acadêmicos Fernando Pessoa e Wanessa Martins pelas contribuições nos teste de microbiologia. Não podendo esquecer meus colegas de profissão Janaina, William e Luís.

Ao prof. Dr. Saulo José F. Mendes, pela contribuição importante na análise *in silico*.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Myrcia guianensis (Aubl.) DC, espécie pertencente à família Myrtaceae, tem distribuição geográfica por todo o Brasil, sendo uma planta endêmica de áreas tropicais e com potencial para o desenvolvimento de produtos de interesse econômico. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de bioprospecção da espécie *Myrcia guianensis* determinando a composição química do óleo essencial das folhas e ainda avaliando o seu potencial para atividade antibacteriana e toxicidade. A coleta foi realizada no Parque Nacional da Chapada das Mesas, Amazônia Legal, no mês de março de 2018 e a extração do óleo essencial ocorreu por hidrodestilação. A identificação dos componentes químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A análise *in silico* do potencial de atividade antimicrobiana e toxicidade foi realizada com os componentes majoritários do óleo essencial por meio de softwares como PASS, Osiris, PROTOX e SwissADME. A avaliação *in vitro* do óleo essencial ocorreu frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 042), *Klebsiella pneumoniae* (isolado clínico), e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (isolado clínico cepa 01 e 02) para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), atividade antibiofilme do óleo essencial, viabilidade e atividade metabólica bacteriana. Para fins de avaliação de toxicidade foram realizados o modelo de infecção *in vivo*, induzida por *Staphylococcus aureus*, em larvas de *Tenebrio molitor*, além disso houve a performance da avaliação da carga bacteriana na hemolinfa das larvas *Tenebrio molitor* após 24 horas comparando o óleo essencial com o ciprofloxacina. O óleo essencial das folhas de *Myrcia guianensis* apresentou um bom rendimento, 1,34%, sendo os componentes majoritários identificados: β -cariofileno (35,22%), terpinoleno (13,76%) e β -bisaboleno (6,13%). A avaliação por meio dos softwares apresentou bom potencial antimicrobiano e baixa toxicidade dos constituintes majoritários. Já na avaliação *in vitro* os resultados foram promissores frente cepas Gram-positivas testadas, em especial *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e isolados clínicos, enquanto apresentou pouco ou nenhum efeito frente cepas Gram-negativas testadas, exceto pelo potencial antibiofilme frente *Escherichia coli* (ATCC 042). Com relação a toxicidade tanto na análise *in silico* como *in vivo* não se observou efeito tóxico, além de confirmar o potencial antibacteriano com a redução drástica da carga bacteriana na avaliação da hemolinfa das larvas *Tenebrio molitor*. Portanto, o óleo essencial se apresenta com resultados promissores frente *Staphylococcus aureus*, representando uma boa alternativa para potencial produtos de interesse farmacêutico.

Palavras-chave: Pedra-ume-caá; óleo essencial; Antibiótico; Myrtaceae; Cariofileno; *Tenebrio molitor*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Myrcia guianensis (Aubl.) DC, a species belonging to the Myrtaceae family, has a geographic distribution throughout Brazil, being an endemic plant in tropical areas and with potential for the development of products of interest. This work aimed to carry out a bioprospecting study of the species *Myrcia guianensis* determining the chemical composition from its leaves essential oil and, still, evaluating its potential for antibacterial activity and toxicity. The collection was carried out in the Chapada das Mesas National Park, Legal Amazon, in March 2018 and the extraction of essential oil occurred by hydrodistillation process. The chemical components identification was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The *in silico* analysis of the potential antimicrobial activity and toxicity was carried out with the major components of the essential oil performing software such as PASS, Osiris, PROTOX and SwissADME. The *in vitro* evaluation of the essential oil occurred against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 042), *Klebsiella pneumoniae* (clinical isolate), and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)(clinical isolate strain 01 and 02) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), antibiofilm activity of essential oil, viability and metabolic activity bacterial. In order to assess toxicity, an *in vivo* infection model induced by *Staphylococcus aureus* in *Tenebrio molitor* larvae was performed. Beyond that, there was a performance evaluation of bacterial load in the hemolymph from *Tenebrio molitor* larvae after 24 hours comparing the essential oil and ciprofloxacin. The *Myrcia guianensis* leaves essential oil showed a good yield, 1.34%, with the major components identified: (E)-caryophyllene (35.22%), terpinolene (13.76%) and β -bisabolene (6.13%). The evaluation through the software showed good antimicrobial potential and low toxicity of the major compounds. In the *in vitro* evaluation, the results were promising against tested Gram-positive strains, especially *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and clinical isolates MRSA, while showing little or no effect against tested Gram-negative strains, except for the potential antibiofilm against *Escherichia coli* (ATCC 042). Regarding toxicity in both *in silico* and *in vivo* analysis, no toxic effect was observed, in addition to confirming the antibacterial potential with the drastic reduction in bacterial load in the evaluation of the hemolymph of the *Tenebrio molitor* larvae. Therefore, the essential oil presents promising results against *Staphylococcus aureus*, representing a good alternative for potential product of pharmaceutical interest.

Keywords: Pedra-ume-caá; essential oil; antibiotic; Myrtaceae; Caryophyllene; *Tenebrio molitor*; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBB	Barreira Hematoencefálica (<i>blood brain barrier</i>)
CDC	Centro de Controle de Doenças e Prevenção (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CFU	Unidade Formadora de Colônias
CG-EM (GC-MS)	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM (MIC)	Concentração Inibitória Mínima
CM	Centímetros
DDD	Doses Diárias Definidas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL	Semelhança com drogas (<i>drug-likeness</i>)
DS	Nota da droga (<i>drug-score</i>)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinal
FFNSC	<i>Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds GCMS library</i>
GI	Gastrointestinal
GLASS	Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana
LD₅₀	Dose Letal Mediana
iLogP	Coefficiente de Partição água-óleo: Índice de Lipofilicidade
Log K_p	Índice de permeação da pele
Log S	Solubilidade
MAR	Índice de Resistência a Múltiplos Antibióticos
MG	Miligrama
ML	Mililitro
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MH	Müller-Hinton
MW	Peso Molecular (<i>molecular weight</i>)
nALH	Número de Aceitador de Ligações de Hidrogênio
nDLH	Número de Doador de Ligações de Hidrogênio

Nist	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS (WHO)	Organização Mundial da Saúde
PASS	Previsão de espectros de atividade para substâncias (<i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i>)
PBS	Tampão fosfato-salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDR	<i>Pandrug resistant</i>
TPSA	Área de Superfície Polar Total
UNICEUMA	Universidade CEUMA
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênicas
UTI	Unidade de tratamento intensivo
UV	Ultravioleta
XDR	Extensivamente Resistente a Medicamentos

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

Figura 1: Espécie vegetal: *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. 26

Artigo

Figura 1. Cromatografia do óleo essencial das folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. 35

Figura 2. Efeito do óleo essencial de folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. no crescimento bacteriano. A viabilidade de cepas bacterianas foi utilizada como indicador de crescimento bacteriano 38

Figura 3. Efeito do óleo essencial de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. na atividade metabólica de bactérias. A atividade metabólica de cepas bacterianas foi quantificada pelos coeficientes de oxidação e redução de reagentes PrestoBlue® 39

Figura 4. Efeito do óleo essencial de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. na erradicação de biofilme bacteriano frente a diferentes cepas bacterianas 39

Figura 5. Efeito do óleo essencial de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC na sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As larvas *Tenebrio molitor* receberam solução salina 0,9 mL/100 mg (A) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (B) e foram tratadas com óleo essencial de folhas de *Myrcia guianensis* (20 mg / 100 mg de larvas), ciprofloxacina (1 mg / 100 mg de larvas) ou veículo (solução salina 0,9 mL / 100 mg) e foi avaliado por 3 dias após a infecção. n = 10 / grupo para experimentos de sobrevivência 40

Figura 6. Efeito do óleo essencial de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC na carga bacteriana da hemolinfa em comparação com a ciprofloxacina. As larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) receberam óleo essencial de folhas de *Myrcia guianensis* (20mg / 100mg) e foram avaliadas um dia após a infecção (n = 5 / grupo) para quantificação da carga bacteriana. Os dados para carga bacteriana são representados como média \pm DP. * p <0,05, comparado com o controle (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classe de toxicidade de acordo com o valor da LD₅₀ (mg/kg) 31
- Tabela 2.** Composição química do óleo essencial das folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. 35
- Tabela 3.** Avaliação do potencial de atividades biológicas do (E-)cariofileno, terpinoleno, β-bisaboleno e ciprofloxacina 36
- Tabela 4.** Estimativa da biodisponibilidade oral do (E-)cariofileno, terpinoleno e β-bisaboleno em comparação com ciprofloxacina por teste *in silico* 37
- Tabela 5.** Estimativa de absorção e índice *Drug-likeness* do (E-)cariofileno, terpinoleno e β-bisaboleno em comparação com ciprofloxacina por teste *in silico* 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Atividade e resistência antimicrobiana	18
3.2	Espécies vegetais como fontes de novos fármacos	21
3.3	Óleo essencial	22
3.4	<i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.	24
4	RESULTADO	26
4.1	Artigo	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O uso de um antimicrobiano visa primordialmente tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os organismos patogênicos e, se possível, preservando a microbiota normal (MELO; DUARTE; QUEIROZ, 2012). Entretanto, devido ao uso inadequado de medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana e animal bem como na produção de alimentos e, ainda com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções acabaram por agravar a situação da resistência bacteriana aos antimicrobianos existentes, sendo cada vez mais evidente a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com essa atividade (OMS, 2012; SCHIMITH et al., 2018).

Devido à resistência bacteriana que vem ocorrendo no decorrer das décadas, desde a utilização das penicilinas, as opções terapêuticas de processos infecciosos vêm se tornando cada vez menor (CUNICO et al., 2004; ALÓS, 2015). Membros das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, bem como Streptococcaceae são exemplos de organismos resistentes a alguns antibióticos, sendo a melhora ou criação de agentes com atividade antimicrobiana possíveis opções para limitar o processo de resistência bacteriana (PORTO, 2014; MOREIRA et al., 2019; TAVARES, 2019).

O fenômeno da resistência aos antimicrobianos refere-se à capacidade de um microrganismo sobreviver à ação de uma droga antimicrobiana, uma vez que esta foi efetiva no tratamento de infecções. Pobres práticas no controle de infecções, condições sanitárias inadequadas e inapropriada manipulação de alimentos estimula o aumento da resistência aos antimicrobianos (OMS, 2014; LEVIN-REISMAN et al., 2017; CDC, 2020). Devido a essa resistência, algumas doenças que já assolaram a humanidade ressurgiram mais agressivas (CARNEIRO, 2017).

Os dados divulgados pela Fiocruz (2017) sobre vigilância global de resistência antimicrobiana revelam que este problema não é mais uma previsão para o futuro e está acontecendo ao redor do mundo, colocando em risco a habilidade de tratar infecções comuns em comunidades e hospitais. Destacando que morrem cerca de 700 mil pessoas no mundo devido infecções bacterianas e a previsão é que morra uma pessoa a cada 3 segundo, em 2050.

A OMS (2014) ressalta a importância da vigilância sobre resistência bacteriana e destaca que em um futuro próximo poderão ocorrer mortes por feridas que antes eram facilmente debeladas com o uso de antibióticos disponíveis. O problema é enfatizado no

Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) e determina ações para evitar a celeridade deste processo, que pode impactar a saúde da população em escala mundial.

Considerando essa problemática da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado, fazem-se necessárias mais pesquisas sobre o desenvolvimento e avaliação de novos produtos antimicrobianos e as plantas medicinais se destacam nesse cenário visto a diversidade da flora no Brasil, associada à rica cultura de utilização de plantas para curar problemas infecciosos pela população. Os produtos naturais vêm se mostrando eficazes do ponto de vista da atividade antimicrobiana (ARESI, 2011; SILVA et al., 2015b; SPERANDIO et al., 2019).

Bios prospecção é uma estratégia que apresenta várias definições dependendo da área do conhecimento que a conceitue. Entretanto, de maneira geral é uma estratégia que busca por compostos orgânicos em plantas, microrganismos e animais que sejam úteis para a humanidade (LIMA; SOUZA SALDANHA; SANT' ANNA CAVALCANTE, 2020).

Em se tratando de plantas, destaca-se os produtos derivados das plantas como os óleos essenciais que apresentam diversas aplicações em campos como alimentação, cosméticos e farmacológicos. Esses produtos se caracterizam por serem biodegradáveis, normalmente de baixa toxicidade frente a mamíferos, que podem desempenhar proteção de culturas agrícolas, com a vantagem de não se acumularem no ambiente e terem um largo espectro de ação diferentemente dos produtos sintéticos (FIGUEIREDO; BARROSO; PEDRO, 2007).

As atividades farmacológicas relacionadas à presença de metabólitos secundários das plantas vêm sendo amplamente estudadas, mas faz-se necessário o aprofundamento dos estudos de validação, visto a grande variedade de produção desses compostos associada à biodiversidade da flora (MARTINELLI et al., 2017; SILVA et al., 2017; SIMÕES et al., 2017). Como exemplo de metabólitos secundários que apresentam função antimicrobianas tem-se: alcaloides, derivados de heptano e acetogeninas (SANCHA, 2015). Além disso, compostos presentes nos óleos essenciais também apresentam atividade antimicrobiana destacando monoterpenos, como citronelal (BEZERRA et al., 2019), timol, cavacrol (LIMA et al., 2017a) e 1,8-cineol (SILVA, 2020a), e sesquiterpenos, como β -cariofileno (MACHADO et al., 2018), β -sesquifelandreno e α -curcumeno (PANDINI et al., 2017).

Dentre as famílias aromáticas, Myrtaceae representa uma das mais importantes, sendo composta por 132 gêneros e 5.671 espécies, com maior distribuição na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical (GOVAERTS et al., 2008). Essa família corresponde a 1,32% do total de Angiospermas conhecidas, sendo no Brasil bem representada, destacando os gêneros *Eucalyptus*, *Malaleuca*, *Eugenia*, *Syzygium*, *Psidium* e *Myrcia* (JUDD et al., 2007; FAUCHES et al., 2016).

A espécie *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., conhecida popularmente como pedra-ume-caá, goiabinha ou guamirim, possui algumas indicações terapêuticas como diarreias, infecções uterinas, hemorragias e é encontrada na Amazônia Legal, especificamente no Maranhão (MORAIS; DA CONCEICAO; NASCIMENTO, 2014; CASCAES et al., 2015). A utilização de partes da planta na comunidade sinaliza para a importância da investigação científica, a fim de avaliar seus efeitos nas terapias, além de validar seu uso como planta medicinal.

Considerando a necessidade de novos produtos antimicrobianos e o destaque do potencial da espécie vegetal na pesquisa por novas opções terapêuticas, o presente trabalho tem como objetivo realizar a bios prospecção do óleo essencial das folhas de da espécie *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., avaliando potencial antibacteriano e toxicidade, por apresentar um potencial de geração de novos produtos biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo de bioprospecção de uma espécie vegetal da Amazônia legal através da determinação da composição química e investigação da atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC..

2.2 Objetivos específicos

- a. Identificar os componentes do óleo essencial obtido das folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.;
- b. Realizar análise *in silico* dos componentes majoritários do óleo essencial;
- c. Determinar ação antibacteriana do óleo essencial avaliado neste estudo;
- d. Avaliar toxicidade do produto estudado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Atividade e resistência antimicrobiana

De acordo com a OMS (2018), os antimicrobianos são medicamentos que seletivamente destroem ou inibem o crescimento de microrganismos susceptíveis. Enquanto a resistência aos antimicrobianos é definida como a habilidade de um microrganismo crescer ou sobreviver na presença de um antimicrobiano na concentração que geralmente seria o suficiente para inibir ou matar o ser vivo da mesma espécie.

A resistência antimicrobiana é um processo natural que ocorre geralmente por mudança no material genético do microrganismo e esse fenômeno foi registrado pela primeira vez na década de 1940. Entretanto, o uso irracional de antimicrobianos, em pessoas e animais, tem acelerado o processo. Além disso, controle de infecções ineficientes, condições sanitárias inadequadas e manuseamento de comida inapropriado estimulam o aumento da resistência antimicrobiana. Novos mecanismos de resistência estão emergindo e se espalhando pelo mundo ameaçando a habilidade humana de tratar infecções comuns. Com isso, procedimentos como: transplante de órgãos, quimioterapia e grandes cirurgias se tornam de alto risco. Além disso, o fenômeno da resistência eleva os custos médicos/hospitalares e impacta em hospitalizações por mais tempo e aumento da mortalidade (MOTA, 2014; LOUREIRO et al., 2016).

Há uma demanda mundial para mudança de como são prescritos e usados os antibióticos. Sendo necessário, além disso, a mudança de comportamento em relação à resistência antimicrobiana para enfrentar essa ameaça. Como exemplo dessas mudanças comportamentais, citam-se aumento da vacinação como forma de evitar contaminação em massa ou endêmica, lavagem das mãos constante e adequada e uma boa higiene de alimentos (OMS, 2018).

A resistência antimicrobiana é perceptível em todos os países do mundo. Devido a globalização e diminuição das distâncias com deslocamentos constante de pessoas, animais e mercadorias a resistência antimicrobiana pode se difundir além das fronteiras dos países. Para *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)(2018), a luta frente a esta ameaça é uma prioridade na saúde pública e requer colaboração de todos os setores para detecção, prevenção em resposta a este problema. Este fenômeno dificulta o controle de doenças infecciosas, favorece o aumento de morbimortalidade, diminuiu a eficácia terapêutica, traz riscos com relação à segurança do paciente e entre pacientes, além de

elevar os custos no cuidado em saúde, sendo, portanto, considerado um problema de saúde pública (RODRIGUES et al., 2018).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em se tratando de resistência bacteriana, os microrganismos mais frequentes em infecções hospitalares no Brasil entre os anos de 2012 a 2015 foram *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, cabe ressaltar que *Staphylococcus aureus*, se apresenta em 60% dos casos isolados como resistentes a oxacilina (MRSA) (MOTA, 2014; ALVES, 2018).

Staphylococcus aureus é um microrganismo comensal que coloniza o nariz de cerca de 30% das pessoas, entretanto pode causar uma série de doenças, sendo algumas até fatais. Estas doenças podem variar de infecções de pele a sepse, pneumonia, endocardite, osteomielite e fasciíte necrosante. Sua eficiente patogenicidade pode ser atribuída devido a uma série de fatores de virulência que esta cepa apresenta (JENUL; HORSWILL, 2019; SURESH; BISWAS; BISWAS, 2019).

Todas as pessoas estão suscetíveis a esta infecção, embora certos grupos de pessoas estejam em maior risco, incluindo pessoas com condições crônicas como diabetes, câncer, doença vascular, eczema, doença pulmonar e pessoas que injetam drogas. O risco de infecção por estafilococos mais grave é maior em hospitais, especialmente, para pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs), pacientes submetidos a certos tipos de cirurgias e pacientes com dispositivos médicos inseridos em seus corpos, além de pacientes imunocomprometidos (CDC, 2011).

Escherichia coli, pertence à família Enterobacteriaceae, é uma bactéria comumente encontrada no intestino de humanos e animais de sangue quente. A maioria das cepas de *Escherichia coli* é inofensiva. No entanto, devido sua importância para saúde pública é uma das espécies mais pesquisadas no mundo. Algumas cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC), estão entre os principais agentes de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (MOTA, 2014; DRUMOND et al., 2018), mas também destacam-se como cepas patogênicas como *Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC), que são as mais prevalentes em infecções no trato urinário (SHAH et al., 2019), e *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC), que são responsáveis por causar meningites e sepses (XAVIER, 2020). *Escherichia coli* apresenta resistência à um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de infecções urinárias, como fluorquinolona. Em muitos países ao redor do mundo o tratamento já é ineficaz em mais da metade dos pacientes (FASUGBA et al., 2015).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose e anaeróbico facultativo que pode ser encontrado em vegetais, solo e água. O biofilme bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* aumenta sua patogenicidade sendo frequentemente associada com infecções nosocomiais (BARBOSA; COMINALI, 2017). Dentre os agravos destas infecções destacam-se a seps, pneumonia e infecções após cirurgias que podem ser fatais. As infecções hospitalares por *Pseudomonas* estão se tornando mais difíceis de tratar devido ao aumento da resistência a antibióticos (CDC, 2013).

Klebsiella pneumoniae é caracterizada como um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro da família Enterobacteriaceae capaz de causar infecções graves, especialmente, em pacientes imunocomprometidos sendo uma das principais causas de infecções hospitalares, como pneumonia, infecções da corrente sanguínea e infecções em recém-nascidos e pacientes em unidades de terapia intensiva (GOMES; CASALINI, 2018). Apesar de *Klebsiella pneumoniae* se apresentar como uma infecção primária, a maioria dos casos são em pacientes que já apresentam algum agravo. As cepas de *Klebsiella pneumoniae* vem apresentando altos níveis de resistência aos antibióticos chegando a 61,4% para multirresistente (MDR), 22% para extensivamente resistente a medicamentos (XDR) e 1,8% para pan-resistente a medicamentos (PDR) (VALENZUELA-VALDERRAMA; GONZÁLEZ; PALAVECINO, 2019).

É importante ressaltar que o biofilme surge como um mecanismo de resistência aos antibióticos importante dentre diversas cepas bacterianas e estima-se que 60% das infecções nosocomiais estão relacionadas ao biofilme (SILVA, et al., 2020b). O termo biofilme descreve a forma de vida microbiana séssil, caracterizada pela adesão de microrganismos a alguma superfície e com a produção de substâncias poliméricas extracelulares (DALLA COSTA et al., 2016). Este processo é possível devido ao *Quórum sensing* (QS), um mecanismo de comunicação intra e interespecífica microbiana, através de sinalização celular química, que permite aos microrganismos a identificação e o controle da expressão gênica com base na densidade populacional dentro de um biofilme, o que promove a adaptação ao meio (SILVA, et al., 2020b).

Diante do exposto nota-se a importância da validação completa do uso terapêutico para garantir a segurança e eficácia na utilização das plantas para fins medicinais (BRITO et al., 2016).

3.2 Espécies vegetais como fontes de novos fármacos

A pesquisa com plantas medicinais foi intensificada na década de 90 com grande avanço nesta área devido as comprovações científicas da efetividade de compostos de interesse terapêutico. A maioria da população mundial, cerca de 80%, se utiliza da medicina tradicional para atender as necessidades básicas de saúde, sendo comum nessa terapia a utilização de plantas medicinais e seus extratos e princípios ativos para tratamento (COSTA-LOTUFO et al., 2010; ZAGO & MOURA, 2018).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, classificado como megadiverso, com potencial para exploração comercial, podendo fornecer matérias-primas de interesse para indústrias farmacêuticas, alimentícia e de cosméticos. Essa demanda impulsiona as investigações científicas e a busca por produtos naturais de interesse (JOHARCHI; AMIRI, 2012; TURRI, 2018).

Na biota do Brasil, estima-se 170 a 210 mil espécies, ou seja, 13% da riqueza mundial. Deste total, 32 mil destacam-se como Angiospermas que apresenta em destaque as famílias Fabaceae, Orchidaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Melastomataceae, Bromeliaceae, Poaceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae e Malvaceae, que, juntas, agregam quase metade da riqueza do conjunto das Angiospermas (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

O estado do Maranhão, pertencente a Amazônia Legal, assim como o Brasil também apresenta grande diversidade biológica, especialmente distribuída nos biomas Cerrado (64% do Estado), Amazônia (35%) e Caatinga (1%) que compõem um mosaico de paisagens. Apesar dessa área extensa de vegetação, ainda é pouco explorada e/ou conhecida (ARAUJO et al., 2016). Além da importância biológica, esses biomas apresentam uma grande importância social, pois comunidades dependem desses recursos para sobrevivência (BRASIL, 2014; ARAUJO et al., 2016).

Apesar da megadiversidade presente no Brasil, apenas 25% dos medicamentos fitoterápicos registrados são provenientes de espécies vegetais presentes na América do Sul, aproveitando de maneira ineficiente toda a matéria-prima que se encontra à disposição (CARVALHO et al., 2008; RODRIGUES, 2016). De modo geral, utilizadas de forma racional essas plantas medicinais podem trazer muitos benefícios à saúde devido a pluralidade de usos terapêuticos em função da complexidade de seus componentes químicos. A utilização desta terapia com uso de plantas medicinais vem aumentando nas últimas décadas, onde cerca de 40% da população utiliza regularmente plantas medicinais e preparações fitoterápicas sob o rótulo de seguros. Entretanto, na maioria das vezes, não

há comprovação de propriedades farmacológicas e toxicológicas, sendo seu uso estritamente empírico (ARÁUJO et al., 2014).

Vale ressaltar, que o uso terapêutico deve ser alicerçado por estudos científicos para garantir a eficácia e, principalmente, a baixa ou ausência de toxicidade. Esses estudos iniciam com as investigações etnobotânica, que garante o conhecimento das plantas utilizadas pelas comunidades tradicionais, além de seus preparos e indicações, sendo considerado um critério para seleção de plantas a serem estudadas para fins de comparação de suas atividades (SILVA et al., 2018).

Dessa forma, destaca-se a importância da validação completa do uso terapêutico para garantir a segurança na utilização das plantas e considerando-as como medicinais. Apesar dessa ampla utilização de plantas no tratamento de doenças, ressalta-se mais uma vez ser de suma importância que a espécie sejam validadas cientificamente para garantir a eficácia e segurança no tratamento, além da confirmação de sua qualidade. Assim, são essenciais investigações etnobotânicas, farmacognósticas, fitoquímicas, farmacológicas, toxicológicas e farmacotécnicas para a determinação da atividade e eficácia farmacológica de novos compostos, além da identificação de marcadores analíticos utilizados em testes de qualidade para a confirmação da integridade dessas drogas vegetais (BRITO et al., 2016; SIMÕES et al., 2017).

As plantas apresentam um complexo metabolismo, sendo formada por metabolitos primários e secundários. Estes são os principais responsáveis por suas ações biológicas, sendo biossintetizados a partir de 4 rotas: acetato malonil, acetato mevalonato, metil-eritrol fosfato (MEP) e via chiquimato (SIMÕES et al., 2017).

As principais classes de metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica são alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, terpenos, antraquinonas, fenilpropanoides, glicosídeos ardiotônicos dentre outros. Como produtos derivados das espécies vegetais se destacam os óleos essenciais que são compostos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides e se destacam por apresentarem importantes ações biológicas (SIMÕES et al., 2017)

3.3 Óleo essencial

Os óleos essenciais são produtos provenientes de diversas partes da planta que possuem composição química complexa e variável garantindo vantagens adaptativas aos vegetais em relação ao meio que estão inseridos. A composição química pode variar entre as espécies e partes de um mesmo vegetal e/ou de acordo com sazonalidade, local de

cultivo, condições de coleta, estabilização e estocagem entre outros fatores (MIRANDA et al., 2016).

No reino vegetal, várias plantas se destacam por apresentarem biossíntese para formação de componentes de óleo essenciais, que se caracterizam por serem voláteis, justificando sua denominação também como óleos voláteis. Seu aroma, normalmente, agradável permite sua utilização na culinária, como temperos, e por indústrias. As família dentre as Angiospermas que caracterizam por apresentar espécies aromáticas, ou seja, que produzem componentes de óleos essenciais são: Lauraceae, Myrtaceae, Umbelliferae, e Labiatae. Os compostos aromáticos estão presentes nas plantas, isto é, na raiz, madeira, casca, folhagem, flor, fruta, semente, etc. (PANDEY et al., 2020)

Os óleos essenciais estão localizados nas plantas, partes aéreas ou raiz, podem ser liberados, naturalmente ou de forma intencional, no processo de extração do óleo, produzindo a liberação de uma nuvem aromática ao seu redor (MORETTO; BUENO; MORAIS, 2015). Existem vários métodos de extração para os óleos essenciais, no entanto do ponto de vista comercial e para fins científicos destaca-se o método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger, que permite a extração do óleo que se separa da camada aquosa que normalmente é denominada águas aromáticas, e também apresenta interesse comercial (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2017).

Além da seleção da técnica de extração, outro fator a se avaliar é o tempo de destilação, pois pode interferir no rendimento e composição do óleo essencial, bem como na atividade biológica, sendo preconizado 2 horas o tempo padrão. Dentre as metodologias utilizadas para identificar os compostos, destaca-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), necessitando ainda, por vezes, a utilização de técnicas complementares (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2017).

De acordo com Pereira Junior (2018), as substâncias químicas que compõem os óleos essenciais são classificadas em derivados de fenilpropanoides e derivados terpenoides, predominantemente monoterpenos e sesquiterpenos. Os fenilpropanoides são derivados da via chiquimato e se caracterizam por apresentar esqueleto C_6C_3 e os todos os terpenoides são gerados a partir da condensação de unidades de isopreno que podem ser originados a partir de duas rotas: acetato mevalonato ou metil-eritritol fosfato, também denominada xilulose 5-fosfato (SIMÕES et al., 2017).

Dos mais de 3000 óleos essenciais produzidos por plantas, apenas cerca de 300 são importantes do ponto de vista comercial. A produção mundial de óleo essencial por ano é de cerca de 40.000-60.000 t com um valor de mercado de cerca de \$700 milhões de

dólares. No Brasil, a produção iniciou na segunda década do século XX, baseado na exploração de espécies nativas como pau-rosa, que origina um óleo de valor para indústria de perfumaria, para atender o mercado internacional. Além do interesse para obtenção de compostos aromáticos para a produção de perfumes e cosméticos, os óleos essenciais também estão sendo estudados devido atividades biológicas podendo serem empregados como insumos para a indústria farmacêutica (TAKEARA et al., 2017).

3.4 *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.

No Brasil, a família Myrtaceae apresenta 23 gêneros e cerca de 1000 espécies, sendo *Myrcia* um dos gêneros de maior distribuição (SOBRAL et al., 2015). No Maranhão, parte integrante da Amazônia Legal, são registrados para essa família cerca de 64 espécies (MORAIS; DA CONCEICAO; NASCIMENTO, 2014). O gênero *Myrcia*, destacando a espécie *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. apresenta domínio fitogeográficos na Amazônica, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e, amplamente distribuída em todas as regiões brasileiras (SOBRAL et al., 2015, FLORA DO BRASIL, 2020). Rosário (2012) menciona que apesar de *Myrcia guianensis* ter sido originalmente descrita a partir do material procedente da Guiana Francesa, os biomas Amazônia e, principalmente, Mata Atlântica constituem os centros de distribuição da espécie.

As espécies do gênero *Myrcia*, família Myrtaceae, destacam-se como fonte de óleos essenciais, composta por basicamente monoterpenos e sesquiterpenos, predominantemente. Como compostos não-voláteis destacam-se, deste gênero, os flavonoides, taninos, derivados da acetofenona e triterpenos. Estudos demonstram que os óleos extraídos de espécies do gênero *Myrcia* demonstraram atividades anti-inflamatória, antinociceptiva (DOS SANTOS et al., 2014; SILVA, 2019), antifúngica (SAMPAIO et al., 2020), antioxidante (CALAO, 2014), antimicrobiana (ALARCÓN et al., 2009; VAN DEN BERG, 2010; TENORIO et al., 2011; SILVA; UETANABARO; LUCCHESI, 2013), anticâncer (STEFANELLO et al., 2011) e larvicida (LIMA et al., 2011), enquanto os extratos demonstram ação hipoglicemiante (VAREDA et al., 2014), anti-hemorragica (SOUSA et al., 2013), antioxidante (SALVADOR et al., 2011) e efeito hepatoprotetor (ALCÂNTARA; BORGES; PAULA, 2012), além de potencial alelopático, os extratos também apresentam atividade anticâncer (FOUCHE et al., 2008). Compostos isolados desses óleos essenciais, por exemplo, o cariofileno, também apresentam atividades biológicas como antimicrobianos e anti-inflamatórios (CARVALHO et al., 2018; XAVIER, 2019).

Myrcia guianensis (Aubl.) DC. apresenta 141 sinonímias científicas (PEREIRA JUNIOR, 2018). Conhecida popularmente como pedra-ume-caá, goiabinha ou guamirim, *Myrcia guianensis* apresenta porte arbustivo com até 8 metros de altura, inflorescência em panículas, apresentando-se quase sempre irregular, terminal e muitas vezes alterada, e os grupos de flores, se houver mais de um, tendem a ser agregados e as folhas individuais sésseis ou com pedicelo curto, podendo apresentar flores amarelo-claras ou alvo e aromáticas; estames alvos e vistosos e o fruto avermelhado quando imaturo e quando maduro preto ou vermelho-escuro (Figura 1) (CASCAES et al., 2015; SILVA et al., 2015a).

A espécie *Myrcia guianensis* possui algumas indicações terapêuticas podendo ser cultivada para fins comerciais (MORAIS; DA CONCEICAO; NASCIMENTO, 2014; CASCAES et al., 2015). A utilização de partes da planta na comunidade sinaliza para a importância da investigação científica, a fim de avaliar seus efeitos nas terapias, além de validar seu uso como planta medicinal. Dentre as atividades biológicas, estudos revelam que o óleo essencial da espécie *Myrcia guianensis* apresentou-se como larvicida moderado frente *Aedes aegypti* (FONTES et al., 2011), enquanto os extratos apresentaram-se como fortes inibidores de α -glucosidase e PTP1B, indicando possível efeito antidiabético (LIMA et al., 2018), efeito anti-hemorragico (SOUSA et al., 2013), capacidade antioxidante (BERNARDES et al., 2018), além de boa atividade frente leucemia e propriedade antibacteriana frente bactéria Gram-positiva (DOS SANTOS et al., 2018).

Estudos sobre espécies de plantas provenientes da Amazônia Legal demonstraram grande potencial de uso, em especial com propriedades antibacterianas, sendo importante buscar a validação da espécie *Myrcia guianensis* devido ao potencial tanto de espécies proveniente deste bioma no qual esta espécie se desenvolve, como também por esta espécie apresentar indicativo em pesquisas anteriores de potencial propriedade antibacteriana (LIMA et al., 2017b; DOS SANTOS et al., 2018).

Figura 1: Espécie vegetal *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.



Fonte: Paulo Shwirkowski (Flora SBS)

4 RESULTADO

4.1 Artigo

**BIOPROSPECTION OF THE ESSENTIAL OIL FROM THE LEAVES OF
Myrcia guianensis (Aubl.) DC. FROM LEGAL AMAZON: Evaluation of chemical
compounds, antibacterial and toxicity property.**

Marcos Vinicius Soares Silva¹, Jorge Fernando Viegas Pessoa⁴, Odair dos Santos Monteiro², Pablo Luis Baia Figueiredo³, Flavia Maria Mendonça do Amaral¹, José Guilherme Soares Maia⁵, Saulo José Figueiredo Mendes⁴, Thiago Azevedo Feitosa Ferro⁴, Denise Fernandes Coutinho¹

¹Graduate Program in Health and Environment, Federal University of Maranhão, São Luís 65085-580, MA, Brazil; viniciussoares@ufpa.br;

²Department of Chemistry, Federal University of Maranhão, São Luís 65085-580, MA, Brazil;

³University Ceuma, São Luís 65075-120, MA, Brazil

⁴State University of Pará, Belém 66087-310, PA, Brazil

⁵Federal University of Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil

Abstract:

Myrcia guianensis (Aubl.) DC, a species belonging to the Myrtaceae family, is an endemic plant in tropical areas used by communities in Legal Amazon to treat diarrhea, uterine infections or snake venom. Although about its medicinal use, there is no description in the literature of biological activities and determination of components of the essential oil of this species from Cerrado biome. The present study undertook a chemical, biological and toxicity analysis of the essential oil (EO) of the leaves of *Myrcia guianensis* harvested from Legal Amazon. The EO was obtained by hydrodistillation process and analyzed through GC-MS. The yield calculation resulted in 1.34% and the major compounds were (E-) caryophyllene (37.43%), terpinolene (14.82%), β -bisabolene (6.07%), highlighting that the OE showed a mixture of mono and sesquiterpenes hydrocarbon and oxygenated. The evaluation of the major compounds on PASS, Osiris, PROTOX and SwissADME, showed great potential of antimicrobial activity and low toxicity. The essential oil was evaluated front American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolated bacteria, Gram-positive and Gram-negative, and presented a MIC of 2mg/mL front *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and MRSA decreasing effectively viability and metabolism. Biofilm eradication was observed front *Escherichia coli* (ATCC 042). The essential oil of the leaves of *Myrcia guianensis* has low toxicity front *Tenebrio molitor* larvae and promoted a great reduction on hemolymph bacterial load of *Tenebrio molitor* larvae. It was concluded that essential oil of the leaves of *Myrcia guianensis* has bioprospecting potential for the development of antimicrobial products.

Key-words: Pedra-ume-caá; essential oil; antibiotic; Myrtaceae; Caryophyllene; *Tenebrio molitor*; *Staphylococcus aureus*.

1. Introduction

Antimicrobial are one of the most successful class of medicine in chemotherapy history (Aminov, 2010). According to WHO report on surveillance of antibiotic consumption (2018), the antibiotic consumption has been increasing in many countries over the past two decades, proving that the overall consumption of antibiotics ranged from 4.4 to 64.4 Defined Daily Doses (DDD) per 1000 inhabitants per day. This increase on antibiotic consumption strengthens the bacterial resistance phenomenon. Beyond that, inadequate sanitary conditions and inappropriate manipulation of food may aggravate the problem (WHO, 2014; Levin-Reisman et al., 2017; CDC, 2020). Those bacteria have increased the number of mortality and morbidity what implies the need for new implementation on chemotherapy. To increase the chance of survival, bacteria use the mechanisms of antibiotic resistance such as changing the antibacterial agent's uptake and biofilm formation (WHO, 2016; Frieri et al., 2017).

The medicinal plant has been used since ancient time and in the last decades has been growing the interest in validate their medicinal properties, especially for assure the safety and efficiency. According to World Health Organization (WHO), 80% of people in developing countries use the medicinal herbs on the primary health care (Macedo, 2016). Brazil has one of the greatest biodiversity, highlighting its vegetal species (Cerqueira et al., 2020). This country accumulated 22% of the world total plants, which around 10% of them are used in the traditional medicine. Although its biodiversity, less than 15% has been evaluated by some scientific study aiming to validate their therapeutic usage and, only, 25% of the registered herbal medicine are from South America plants (Rodrigues, 2016; Cardoso et al., 2018).

In this scenario, the medicinal herbs rise as the good opportunity to create new medicines or as a source of new molecules (Porto, 2014). The Myrtaceae is an important family well distributed over Brazil, endemic on tropical areas (Govaerts et al., 2008). The aromatic plants of this family are represented for species like *Psidium guajava* L. (Silva et al., 2015), *Eugenia uniflora* L. (Araújo et al., 2019) and *Syzygium guineense* (Willd.) *Guineense* (Okhale et al., 2018).

The *Myrcia* genus oil is well represented for monoterpenes and sesquiterpenes compounds, predominantly. Scientific research has showed the essential oil from *Myrcia* genus presented good results on anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant, antimicrobial and antifungal activities while the extracts demonstrate hypoglycemic, anti-

hemorrhagic and antioxidant action (Cascaes et al., 2015; Silva, 2019; Sampaio et al., 2020).

Myrcia guianensis (Aubl.) DC., may be cultivated for commercial purpose and it is found in Legal Amazon, which represents 59% of Brazilian territory and concentrates most of Brazil's biodiversity unexplored (Morais et al., 2014; Oliveira et al., 2019; Leal et al., 2020). The popular use of parts of the plant indicates the importance of a scientific investigation aiming to evaluate the effects on therapy, beyond validation of this use as medicinal herb. The aim of this study is to determine the chemical compounds and investigate a potential antibacterial and toxicity from bioprospecting *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.' leaves essential oil collected from south of Maranhão state (Legal Amazon), northwest Brazil.

2. Methodology

2.1 Vegetal material

The plant was collected in March 2018 in the Chapada das Mesas National Park, located in Cerrado area, included in Legal Amazon, from Maranhão state, Brazil. This work is part of a project to inventory aromatic flora in Cerrado area in Maranhão state. A plant voucher specimen was sent to the Herbarium called Museum Emílio Goeldi in Pará state and identified as *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. in May 2018 under registration MG230167.

2.2 Essential Oil Extraction

Myrcia guianensis aerial parts were air-dried (40 °C), ground by knife mill (DeLeo, Model Modelo EDB-5), and subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus (Tecnal, Model TE-2765) for three hours (Brazil, 2019). The essential oils were centrifuged (4000 rpm/30 min) (Kasvi, Model K14-1215), dehydrated with anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄), packed in amber glass ampoules and kept refrigerated (5–10°C) (Coutinho et al., 2007).

2.3 Yield Calculation

The yield was calculated for the oil volume ratio, measured from the oil volume obtained in the extraction system, divided by the moisture free base. The oil yield obtained from each sample was then calculated by the formula described below.

$$\% R = \left[\frac{V}{MFB} \right] \times 100$$

R% = Yield Calculation

V = Volume

MFB = moisture freebase: BLU = [mass – (mass – % moisture)]

2.4 Determination of chemical composition of essential oil

The chemical composition of the essential oil of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. leaves was analyzed by Mass Spectrometry (GC-MS) coupled gas chromatography with 1mL injection (AOC-20i Auto injector) in ultra-equipped Shimadzu QP 2010 system. Rtx-5MS (Restek, USA) silica capillary column of 30m length x 0.25mm inner diameter coated with 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane (0.25µm film thickness) GC oven was programmed from 60°C to 240°C (10min) at 3°C / min, injector temperatures (Split 1:20), transfer line and ionization chamber were 250, 250, 200 ° C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a speed of 1mL / min.

Mass spectra were obtained by electron impact at 70 eV with automatic scans in the mass range 35 to 400 m / z at 0.30 scans / s.

Component identification was based on time and linear retention index (C₈-C₂₀ n-alkane series), interpretation and comparison of mass spectra obtained with Adams (2006), Nist (2011) and FFNSC 2 libraries

2.5 Evaluation of the antibacterial activity of *Myrcia guianensis* leaves' essential oil: *in silico* analysis

2.5.1 Prediction of biological activities

To evaluate the biological potential of the major compounds from the *Myrcia guianensis* leaves' essential oil, the Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) Online program was used. This computational tool calculates the probability of a given organic molecule to present a biological activity by comparing the molecule structure to a database composed of other organic molecules with defined biological activities (Ferreira et al., 2019; Khurana et al., 2011). Thus, the PASS online program gives the probability of a compound of being active (Pa) or inactive (Pi) on a biological target. For comparison, the biological activity of ciprofloxacin was analyzed too.

2.5.2 Prediction of oral bioavailability

The SwissADME program was used to predict the theoretical oral bioavailability of the major compounds from the *Myrcia guianensis* leaves' essential oil (Daina et al., 2017). For comparison, ciprofloxacin oral bioavailability was also assessed. Information on the following properties were obtained: total polar surface area (TPSA), partition coefficient (iLogP), molecular weight, number of hydrogen acceptors (nALH) and number of hydrogen donors (nDLH) of the compound. Then, an analysis based on the "Rule of Five" was performed as previously described (Lipinski et al., 2001; Ferreira et al., 2019). By definition, to present a good estimated oral bioavailability, a molecule

needs to meet the requirements for at least 3 of the analyzed parameters: i) total polar surface area (TPSA) $<140 \text{ \AA}^2$, ii) $\text{LogP} \leq 5$, iii) molecular weight <500 daltons, iv) number of acceptor hydrogen bonds (nALH) ≤ 10 , and v) number of donor hydrogen bonds (nDLH) ≤ 5 . If a compound violates two or more rules, it may not be orally active.

2.5.3 Estimation of pharmacokinetic characteristics and toxic effects

For analysis of the possible toxic effects and the theoretical pharmacokinetic parameters (absorption, distribution, metabolism and excretion) of the major compounds from the *Myrcia guianensis* leaves' essential oil, the Osiris (Ferreira et al., 2019) and SwissADME programs were used. These parameters and the toxicity were predicted by comparison of the major compounds from the *Myrcia guianensis* leaves' essential oil chemical structure with a database containing commercially available drugs and commercially available compounds. Toxic effects were classified as mutagenic, tumorigenic, irritant and effects on the reproductive system (Ferreira et al., 2019).

LD_{50} values in milligram per kilogram (mg/kg) were estimated by using the PROTOX program (Drwal et al., 2014) and those results were used to classify the major compounds of the essential oil and ciprofloxacin toxicity (Table 1). Estimations on the compounds gastrointestinal absorption, permeability through the blood brain barrier brain barrier and skin permeation (K_p) by the SwissADME program (Daina et al., 2017) .

Additionally, the probability of the three compounds to becoming a commercial drug ("drug-score") was calculated on the Osiris program by combining the values obtained for iLogP, drug-likeness, solubility, molar mass and toxicity in to a single value. A drug-score value of 0.1 to 1.0 was taken as an index of suitability for commercialization (Ferreira et al., 2019).

Table 1. Toxicity Class according to LD_{50} value (mg/kg)

Class	Classificação
Class I	Fatal if swallowed $\text{LD}_{50} \leq 5$
Class II	Fatal if swallowed $5 < \text{LD}_{50} \leq 50$
Class III	Harmful if swallowed $50 < \text{LD}_{50} \leq 300$
Class IV	Harmful if swallowed $300 < \text{LD}_{50} \leq 2000$
Class V	Toxic if swallowed $2000 < \text{LD}_{50} \leq 5000$
Class VI	Non toxic $\text{LD}_{50} > 5000$

2.6 Evaluation of the antibacterial activity of *Myrcia guianensis* leaves' essential oil: *in vitro* analysis

2.6.1 Bacterial Strains

The bacterial samples came from the CEUMA University Microbiology Laboratory (UNICEUMA). For the tests were used standard microorganisms (ATCC) and clinical isolates. Bacterial samples are *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 042), *Klebsiella pneumoniae* (clinical isolate), MRSA (clinical isolate 1), and MRSA (clinical isolate 2). Susceptibility to antimicrobials was determined in an automated VITEKR 2 system (BioMérieux Clinical Diagnostics, USA) and data interpretation was performed as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). The multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated using the formula $MAR = x/y$, where “x” was the number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance; and “y” was the total number of antibiotics tested. The antibiotic evaluated front clinical bacteria (MRSA strain 1 e MRSA strain 2) were ciprofloxacin, cotrimazole, gentamycin, oxacilin, rifampicin, teicoplanin, tetracycline, vancomycin, linezolid, cefpima, ceftriaxone, clindamicine and erythromycin. The MRSA strain 1 (clinical isolated) Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index was 0,76 and it was resistant front oxacillin, cefpima, ceftriaxone while the MRSA strain 2 (clinical isolated) Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index 0,38 and it was resistant front ciprofloxacin, oxacilin, rifampicin, tetracycline, cefpima, ceftriaxone, clindamicine, erythromycin.

2.6.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The antimicrobial activity of the essential oil of the dried leaves of *Myrcia guianensis* was determined by the microdilution method (CLSI, 2019). Briefly, each bacterial strain was plated with Müller-Hinton Agar at 37 ° C for 24h and suspended in saline ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU / mL), adjusted by 0.5 McFarland turbidity and then diluted 1: 10 for inoculation in wells. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), 10 μ L of the bacterial suspension obtained from each strain described in item 4.6.1 was inoculated into the wells of the ELISA plates containing Müller-Hinton broth and different concentrations in the ratio 2 of the essential oil. *Myrcia guianensis* (2-0.6 mg / mL). Each well had a final volume of 100 μ L. Bacterial strains were inoculated in MH broth as a positive control, while Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a negative control. The plates were incubated in a bacteriological oven at 37°C for 24 hours and the

procedure was done in triplicate. MIC was the lowest concentration of essential oil of *Myrcia guianensis* in which there was no bacterial growth.

2.6.3 Determination of viability and bacterial metabolic rate

The 96-well microplate microdilution technique modified was used Ferro et al. (2016). Vehicle (2% DMSO solution in saline) was added to the essential oil of *Myrcia guianensis* leaves, serially diluted at different concentrations (0.0625-2 mg / mL) in Muller Hinton broth. After dilution, the bacterial suspension obtained from each strain described in item 4.6.1 was inoculated after adjusting to 10^8 cells / mL (optical density at 600 nm equal to 0.6). The assay was performed in triplicate. The microplates were incubated at 37 ± 1 ° C for 24 h and bacterial growth / viability was observed after incubation for 90 min at 37 ° C with 10 μ L PrestoBlue® according to the manufacturer's instructions. In addition, the effect of the oil on the bacterial metabolic rate was calculated through the oxidation and reduction coefficients of PrestoBlue®, according to the manufacturer's instructions.

PrestoBlue® is a dark blue fluorescent indicator (resazurin) that is converted to a red fluorescent compound (resofurin) by metabolically active cells.

2.6.4 Evaluation of *in vitro* biofilm eradication

The effect of *Myrcia guianensis* essential oil on the eradication of biofilm by the bacteria described in item 4.6.1 was quantified according to the methodology previously described (Ferro et al., 2016). To this end, 10 μ l bacterial suspension (prepared as described above) was added per well in a 96-well microplate containing different concentrations of *Myrcia guianensis* essential oil (2-0.6 mg / mL) and 100 μ L Müeller Hinton broth. Vehicle-treated bacteria and medium without bacteria were used as positive and negative control respectively. Samples were incubated at 37 ° C and after 24h, the wells were washed three times with phosphate-saline buffer (PBS). Then, the 5% violet crystal biofilm was stained for 10 min and then immediately solubilized with methanol (200 μ l / well, 100%). The reading was then performed at 550 and 630nm on ELISA reader and used as an indication of biofilm eradication.

2.7 *In vivo* model of infection induced by *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in *Tenebrio molitor* larvae

The antimicrobial actions of essential oil of *Myrcia guianensis* were evaluated in an *in vivo* model of infection induced by *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in *Tenebrio molitor* larvae. Briefly, *Tenebrio molitor* larvae were randomly distributed in three experimental groups ($n = 10$ /group), and were then infected by injection of 100 μ L

of bacterial suspension (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538; 1.8×10^9 CFU/mL in Saline 0,9 %). After 2h, the larvae received the essential oil of *Myrcia guianensis* dose (20 μ L/mL), vehicle (Saline 0,9 % 100 μ L) and antibiotic ciprofloxacin (0,15 μ L/mL). Mortality rate was observed over 3 days post-infection.

In order to assess the bacterial load in the hemolymph, in a separate set of experiments, the larvae were infected with *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) as described above and then received either essential oil of *Myrcia guianensis* (20 μ L/mL; $n = 5$) or vehicle (Saline 0,9%; $n = 5$) or ciprofloxacin (0,15 μ L/mL; ; $n = 5$). Larvae were incubated at 37°C for up to one day. Five larvae of each group were culled and analyzed for bacterial load. Briefly, at each group, the larvae were cut through in acephalocaudal direction with a scalpel blade and squeezed to remove the hemolymph. Serial dilutions (10x) of the hemolymph of each larvae were made in Saline and 10 μ L of each dilution were incubated in Müller Hinton agar and cultured for 24h at 37°C. After this period, the plates were analyzed for CFU counting. The results are expressed as CFU/mL.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows.

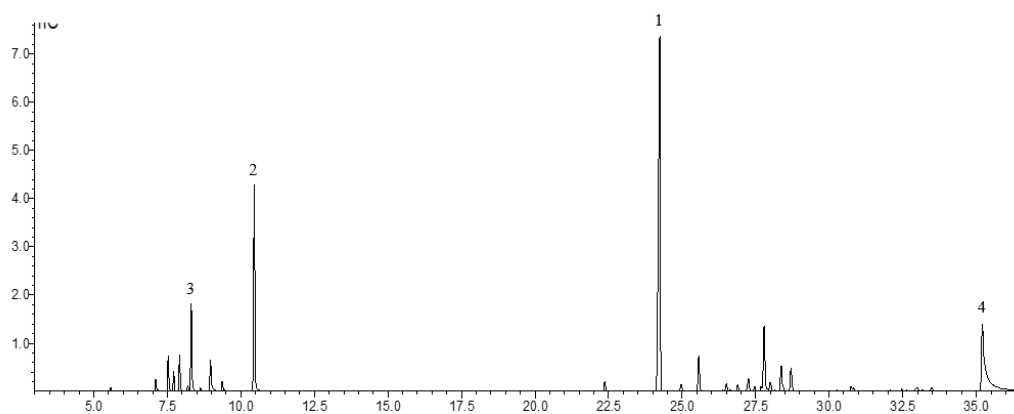
3. Result

3.1 Yield Calculation

The resulted obtained in this extraction process was calculated in percentage resulting on a yield of 1.34%.

3.2 Determination of chemical composition of essential oil

GC-MS analysis of the essential oil from the leaves of *Myrcia guianensis* separated 34 compounds from what were identified 31, corresponding to 88,84% of the total. Only 4 components represent almost 70% of the total compounds from GC-MS analysis (Figure 1). These are the major identified components: (E)-caryophyllene (37.43%), terpinolene (14.82%), β -bisabolene (6,07%) (Table 2). The third one was a compound without identification a probably isomer of methoxyolivetol (NIST) with Molecular Weight of 194 g/mol and molecular formula of $C_{12}H_{18}O_2$ (Annex I).

Figure 1. Essential Oil Chromatogram of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. leaves.

Source: Author

Table 2: Chemical composition of the essential oil of the leaves of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.

TR ^a	Name	%	IRC ^b	IRL ^c
5.575	α -Pinene	0,17	934	932
7.100	Myrcene	0,76	992	988
7.530	α -Phellandrene	2,2	1006	1002
7.715	δ -3-Carene	1,23	1012	1008
7.915	α -Terpinene	2,26	1017	1014
8.200	p-Cymene	0,4	1025	1020
8.320	Limonene	5,78	1029	1024
8.630	(Z)- β -Ocimene	0,22	1038	1032
8.965	(E)- β -Ocimene	2,31	1047	1044
9.365	γ -Terpinene	0,73	1059	1054
10.460	Terpinolene	14,82	1090	1086
22.370	α -Copaene	0,74	1376	1374
24.240	(E)-Caryophyllene	37,43	1422	1417
24.970	α -Guaiene	0,52	1440	1437
25.570	α -Humulene	2,97	1454	1452
26.505	γ -Muuroolene	0,6	1478	1478

^aChromatographic column retention time^bRetention Index Calculated.^cLiterature Retention Index

*No identification: isomer of methoxyolivetol (NIST);

MW:194; MF: C₁₂H₁₈O₂

Source: Author; Analyzed by Pablo L. B. Figueiredo

TR ^a	Name	%	IRC ^b	IRL ^c
26.655	Germacrene D	0,09	1481	1484
26.895	β -Selinene	0,53	1487	1489
27.250	Viridiflorene	1,2	1496	1496
27.470	α -Muuroolene	0,38	1501	1500
27.680	α -Bulnesene	0,34	1507	1509
27.790	β -Bisabolene	6,07	1510	1510
28.005	γ -Cadinene	0,88	1515	1513
28.375	δ -Cadinene	2,49	1525	1522
28.700	(E)- γ -Bisabolene	2,14	1533	1529
30.275	Caryolan-8-ol	0,07	1574	1571
30.750	Caryophyllene oxide	0,39	1586	1582
30.830	Viridiflorol	0,27	1588	1592
32.470	1-epi-Cubenol	0,11	1632	1627
32.995	Cubenol	0,41	1646	1645
33.480	Allohimachalol	0,33	1659	1661
35.200	NI*	11,04	1706	
IDENTIFIED TOTAL		88,84		

3.3 In silico analysis of (E)-Caryophyllene, Terpinolene and β -Bisabolene

3.3.1 Identified biological activities from major compounds of *Myrcia guianensis* essential oil

Analysis of the probable biological activities of (E)-caryophyllene, terpinolene, β -bisabolene were evaluated.

During the computational evaluation were found that the compounds presents many activities, which means potential activity higher than 30% of chance of happening ($P_a \geq 0.3$), being high probability of activity occurring over 70% ($P_a > 0.7$). A close look was taken about the prediction of antimicrobial activities of the compounds and for comparison was evaluated the ciprofloxacin (Table 3).

Table 3. Evaluation* of the biological activity potential of (E-)caryophyllene, terpinolene, β -bisabolene and ciprofloxacin.

COMPOUND	(E-)CARYOPHYLLENE
Total of predictable activities ($P_a > 0.3$)	600
High probability of activity occurring ($P_a > 0.7$)	45
Activities related to antimicrobial activity	i) antifungal ($P_a = 0.582$ and $P_i = 0.020$), ii) Antiprotozoal (Leishmania) ($P_a = 0.470$ and $P_i = 0.029$), iii) Antibacterial ($P_a = 0.437$ and $P_i = 0.023$), iv) Membrane permeability enhancer ($P_a = 0.398$ and $P_i = 0.059$), v) DNA ligase (ATP) inhibitor ($P_a = 0.335$ and $P_i = 0.033$).
COMPOUND	TERPINOLENE
Total of predictable activities ($P_a > 0.3$):	1797
High probability of activity occurring ($P_a > 0.7$):	123
Activities related to antimicrobial activity	i) Saccharopepsin inhibitor ($P_a = 0.733$ and $P_i = 0.036$), ii) Thioredoxin inhibitor ($P_a = 0.680$ and $P_i = 0.014$), iii) Tpr proteinase (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) inhibitor ($P_a = 0.616$ and $P_i = 0.011$).
COMPOUND	β -BISABOLENE
Total of predictable activities ($P_a > 0.3$):	213
High probability of activity occurring ($P_a > 0.7$):	18
Activities related to antimicrobial activity	i) Antifungal ($P_a = 0.585$ and $P_i = 0.020$), ii) Antiprotozoal (Leishmania) ($P_a = 0.428$ and $P_i = 0.039$), iii) Antibacterial ($P_a = 0.413$ and $P_i = 0.027$), iv) Membrane permeability enhancer ($P_a = 0.446$ and $P_i = 0.035$).
COMPOUND	CIPROFLOXACIN
Total of predictable activities ($P_a > 0.3$)	47
High probability of activity occurring ($P_a > 0.7$)	4
Activities related to antimicrobial activity	i) Ophthalmic antibacterial ($P_a = 0.940$ and $P_i = 0.000$), ii) Anti-infective ($P_a = 0.823$ and $P_i = 0.005$), iii) DNA synthesis inhibitor ($P_a = 0.786$ and $P_i = 0.004$), iv) Topoisomerase II inhibitor ($P_a = 0.759$ and $P_i = 0.003$), v) Antimycobacterial ($P_a = 0.638$ and $P_i = 0.008$), vi) Antibacterial ($P_a = 0.589$ and $P_i = 0.009$), vii) Quinolone-like antibiotic ($P_a = 0.572$ and $P_i = 0.001$), viii) Anti-cytomegalovirus ($P_a = 0.448$ and $P_i = 0.004$), ix) Anti-tuberculosic ($P_a = 0.452$ and $P_i = 0.019$), x) DNA gyrase inhibitor ($P_a = 0.488$ and $P_i = 0.001$), xi) Antibiotic ($P_a = 0.358$ and $P_i = 0.010$), and xii) Anti-adenovirus ($P_a = 0.304$ and $P_i = 0.086$).

*Evaluation realized in Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)

3.3.2 Estimated oral bioavailability

For predicting the oral bioavailability of (E-)caryophyllene, terpinolene and β -bisabolene, their values of TPSA, iLogP, molecular weight, nALH and nDLH were analyzed (Table 4).

Table 4. Estimation of oral bioavailability of (E-)caryophyllene, terpinolene and β -bisabolene in comparison with ciprofloxacin by *in silico* test.

	(E-)Caryophyllene	Terpinolene	β -Bisabolene	Ciprofloxacin	Rule of five
iLogP	3.29	2.71	3.67	2.24	<5
MW	204.35 g/mol	136.23 g/mol	204.35 g/mol	331.34	≤ 500 g/mol
TPSA	0.00 Å ²	0.00 Å ²	0.00 Å ²	74.57 Å ²	<140 Å ²
nDLH	0	0	0	2	≤ 5
nALH	0	0	0	5	≤ 10

iLogP : partition coefficient water: oil – lipophilicity index; MW : molecular weight; TPSA : total polar surface area; nALH : number of acceptor hydrogen bonds; nDLH number of donor hydrogen bonds

3.3.3 Predicted pharmacokinetic characteristics and toxic effects

This evaluation was performed in (E-)caryophyllene, terpinolene and β -bisabolene in comparison with ciprofloxacin.

This analysis brings information on the estimation of gastrointestinal absorption, permeability through the blood brain barrier and skin permeation (log K_p (cm)/s). The results may be seen on table 5.

Table 5. Estimated absorption and Drug-likeness of (E-)caryophyllene, terpinolene and β -bisabolene in comparison with ciprofloxacin by *in silico* test

	(E-)Caryophyllene	Terpinolene	β -Bisabolene	Ciprofloxacin	
Predicted absorption	GI absorption*	Low	Low	Low	High
	BBB permeability**	No	Yes	No	No
	Log K_p***	-4.44 cm/s	-3.96 cm/s	-2.98 cm/s	-9.09 cm/s
Drug-likeness	Log S⁺	-3.66	-2.34	-3.51	-3.32
	DL⁺⁺	-6.48	-3.02	-6.41	2.07
	DS⁺⁺⁺	0.31	0.46	0.31	0.55

*GI: gastrointestinal absorption; **BBB: blood brain barrier; ***Log K_p: skin permeation index; ⁺Log S: solubility; ⁺⁺DL: drug-likeness, ⁺⁺⁺DS: drug-score.

None of the compounds, (E-)caryophyllene, terpinolene and β -bisabolene, had potential toxic effects on this evaluation. All the three compounds exhibited a toxicity score of 5, with the LD₅₀ of all compounds range between 4390mg/kg - 5000mg/kg. On the other hand, ciprofloxacin was found to have predicted mutagenic effects, with no tumorigenic actions and no effects on the liver or reproductive system. The toxicity class of ciprofloxacin was 4 with LD₅₀ value of 2000mg/kg.

3.4 Evaluation of antibacterial activity of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. essential oil.

3.4.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

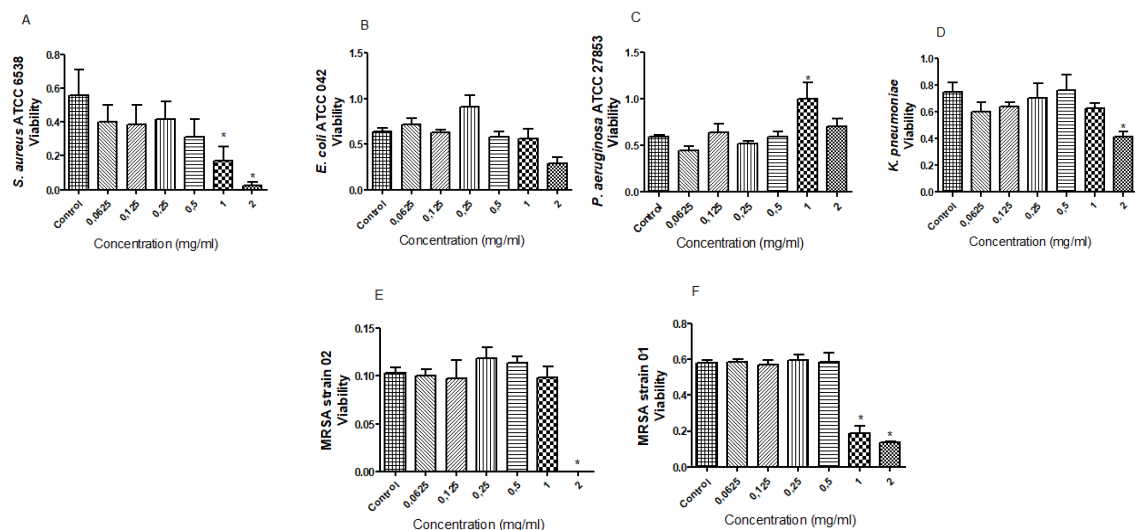
The experiment to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the essential oil of *Myrcia guianensis* leaves obtained better results against Gram-positive bacteria, whereas front Gram-negative bacteria had little or no effect.

Noteworthy was the result against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA strain 1) and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA strain 2), which presented a minimum inhibitory concentration of 2mg/mL, while in the results front others bacteria had no significant differences were observed.

3.4.2 Determination of viability and bacterial metabolic rate

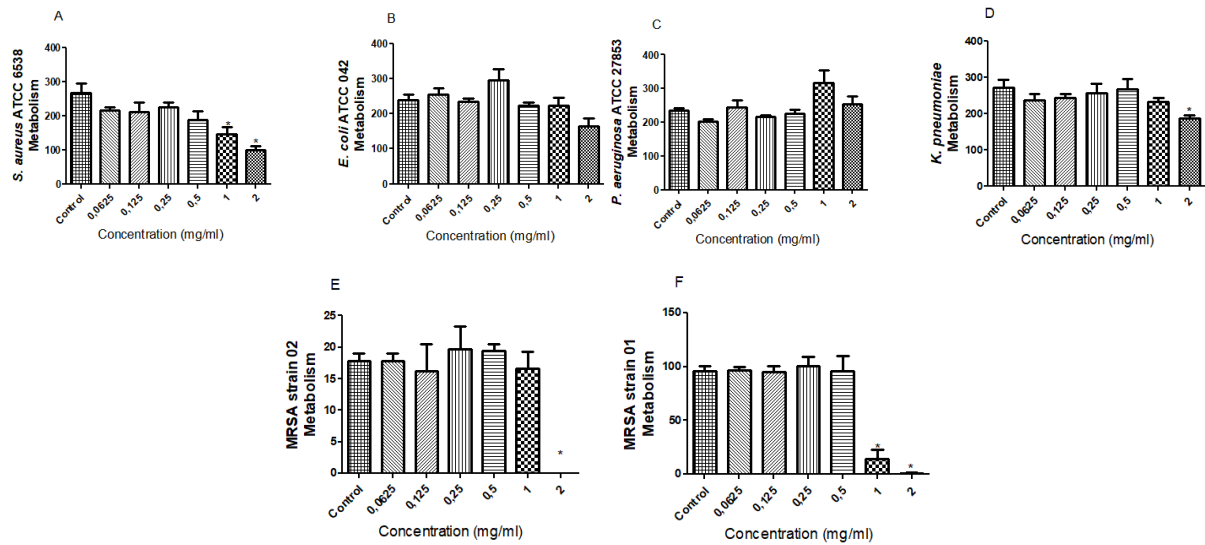
The essential oil of *Myrcia guianensis* leaves decreases the viability and metabolic activity of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) at highest concentration tested (2mg/mL) and, statistically, it was also noted effects at 1 mg/mL (Figure 2A and 3A). A poor oil activity was observed against *K. pneumoniae* at a concentration of 2mg/mL while was observed no effect against *Escherichia coli* (ATCC 042) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) at any concentration tested (Figure 2B, 2C, 2D and 3B, 3C, 3D). It was seen that the best result came from Gram-positive bacteria, especially against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Thus, were tested some clinical isolated of 2 strains of MRSA, which showed that viability and metabolic were decreased by highest concentration tested (2mg/mL) (Figures 2E, 2F and 3E, 3F).

Figure 2. Effect of essential oil of leaves of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. on bacterial growth. The viability of bacteria strains was used as an indicator of bacterial growth.



Data represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

Figure 3. Effect of essential oil of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. on the metabolic activity of bacteria. The metabolic activity of bacteria strains was quantified by PrestoBlue® reagent oxidation and reduction coefficients.

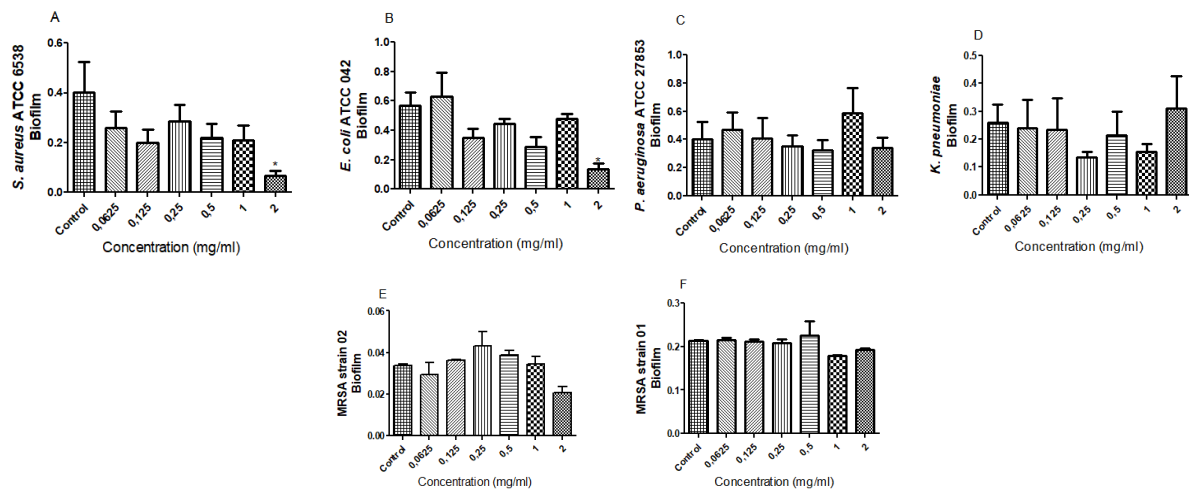


Data represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

3.4.3 Evaluation of *in vitro* biofilm eradication

Antibiofilm activity of the essential oil of *Myrcia guianensis* leaves was observed at the highest concentration tested (2mg/mL) against *Escherichia coli* (ATCC 042) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). However, these effects were not observed in the others strains evaluated in this test (Figure 4).

Figure 4. Effect of essential oil of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. on bacterial biofilm eradication front different bacteria strains.



Data is represented by the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

3.5 *Myrcia guianensis* leaves essential oil Reduces Bacterial Load in the Hemolymph

Myrcia guianensis' leaves essential oil (20mg/100mg of larvae) effects were compared to those of ciprofloxacin (1 mg/mg of larvae) and vehicle-treated larvae infected with *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) or saline solution 0.9%. The essential oil analyzed and saline (vehicle) did not induce any toxicity on larvae differently from ciprofloxacin (Figure 5).

On those groups that received saline solution 0.9% and treatment, the essential oil and ciprofloxacin had the same result 70% of survival while the control treated with saline solution had 90% of survival. On the others groups, the essential oil analyzed had better results as the control with saline solution (80% of survival) than a ciprofloxacin group (40% of survival) after treatment. The Essential oil from *Myrcia guianensis*' leaves also reduced bacterial load in the hemolymph of *Tenebrio molitor* as the ciprofloxacin did when compared with the control (Figure 6).

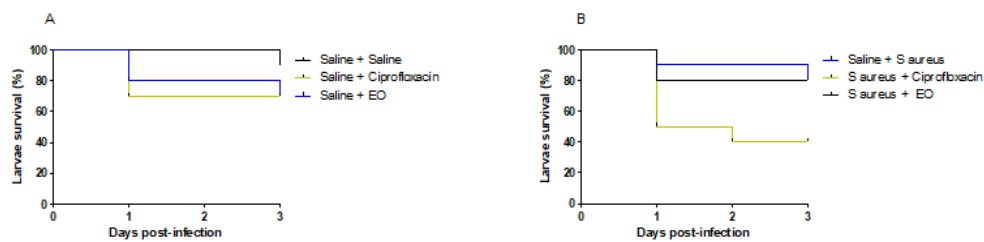


Figure 5. Effect of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC' leaves essential oil on survival of *Tenebrio molitor* larvae infected with *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). *Tenebrio molitor* larvae received saline solution 0.9% (A) or *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (B) and they were treated with *Myrcia guianensis*' leaves essential oil (20 mg/100 mg of larvae), Ciprofloxacin (1 mg/100mg of larvae) or vehicle (Saline 0,9 mL/100 mg), The evaluation occurred for 3-days post-infection. $n = 10$ /group for survival experiments.

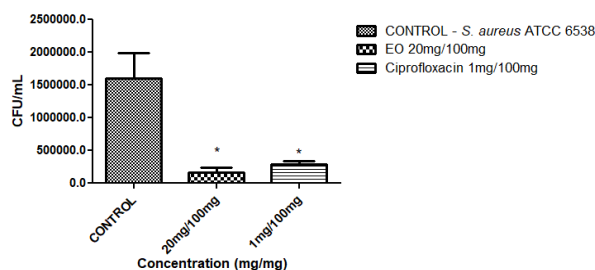


Figure 6. Effect of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC' leaves essential oil on hemolymph bacterial load comparing with ciprofloxacin. The *Tenebrio molitor* larvae infected with *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) received *Myrcia guianensis*' leaves essential oil (20mg/100mg) and were evaluated one day post-infection ($n=5$ /group) for bacterial load quantification. Data for bacterial load is represented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, compared with control (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538).

4. Discussion

The yield calculation had a promising result of 1.34% when compared, for example, by Souza Filho et al. (2006) results that were 0.11% from the same species, but located in Pará state, Brazil and comparing with the species *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC, 0,5%, that was collected from the same Cerrado region (Rosa et al., 2016). It is noteworthy that the yield can be influenced by several factors such as weather conditions, time of collection, age of the plant, care in the preparation of vegetable raw material, and other factors as the time extraction process (Figueiredo et al., 2017; Maia et al., 2015).

On the determination of the essential oil chemical composition, it is noted in table 2, that among the identified compounds are basically monoterpenes and sesquiterpenes with a slight predominance of sesquiterpenes as occurs with other plants from the same genus (Cascaes et al., 2015; Silva et al., 2016).

The major compounds of the *Myrcia guianensis*'s leaves essential oil were evaluated by *in silico* analysis for identification of potential biological activities. The PASS program has been used for prediction of biological activity based on structural formula of a compound. It makes a qualitative evaluation as active or inactive based on structure-activity of compounds with known biological activity and it has been used for many researchers recently (Dmitriev et al., 2019; Ferreira et al., 2019; Sarkar et al., 2020). The results of this evaluation may be observed in table 3, where is possible to see that all major compounds have potential activity in microbiological field.

The ciprofloxacin effectiveness in microbiological activity is well known and the results from the online program showed that as well, as above-mentioned. The major organic compounds of essential oil of *Myrcia guianensis* showed prominent theoretical microbial activity what makes implication about the effectiveness the isolate compounds and suggest that possibly the essential oil is effective too. Since this showed potential for antimicrobial activity, it was realized further investigation.

The estimated oral bioavailability is an important parameter on a development of bioactive molecules as therapeutic agents (Veber et al., 2002). For evaluation of new compounds is applied the “rule of 5”, as shown in table 3. However, it is important to remind that there are orally active therapeutic classes outside the ‘rule of 5’. The exceptions are antibiotics, antifungals, vitamins and cardiac glycosides (Lipinski et al., 2001).

Table 4 demonstrates that the three natural compounds fit the criteria to present good estimated oral bioavailability because all three compounds attended the “rule of five” meting

all five criteria. Ciprofloxacin presented a TPSA of 74.57, iLogP of 2.24, molecular weight of 331.34, nDLH of 2.0 and nALH of 5.0 which shows, as the compounds evaluated, a good predicting of oral bioavailability, assuring the test. Therefore, it implies that each compound separately, as the ciprofloxacin, had good results on estimation oral bioavailability what could lead for future oral use for isolated compound or the essential oil.

Evaluating the toxic effects all the three compounds exhibited a toxicity score of class V, indicating they are classified as harmful if swallowed $2000\text{mg/kg} < LD_{50} \leq 5000\text{mg/kg}$, which means small toxicity even when compared with ciprofloxacin, drug commercially available that presented as a result a value to be classified as class IV, harmful if swallowed $300\text{mg/kg} < LD_{50} \leq 2000\text{mg/kg}$. All natural compounds evaluated presented no mutagenic, tumorigenic, irritant effects either hepatotoxicity or effects on reproduction. Although, ciprofloxacin presented between the aspects evaluated high mutagenic effects. These toxic effects classification was expected since these essential oils from plant usually have none or small toxicity front mammal, thus getting towards the security use (Figueiredo et al., 2007).

(E-)Caryophyllene, terpinolene and β -bisabolene were evaluated for gastrointestinal absorption and presented low absorption and did not had potential on permeability of BBB, except for Terpinolene that represents an important natural substance which may be explored in terms of Central Nervous System acting drug (Table 5). As it was expected, ciprofloxacin had high potential on gastrointestinal absorption.

The skin permeability (K_p) defines the rate of a chemical penetrating across the stratum corneum. It is a linear model that relates molecular weight and lipophilicity of compounds, thus the more negative Log K_p , the less permeant on the skin will be the molecule. The exposure of the skin to naturally derived chemical is an issue due the lack of sufficient data from biological tests *in vivo* and *in vitro*. The *in silico* analysis is an alternative that is in development over the past decades (Chen et al., 2018; Guimarães, 2019). The better estimated Log K_p values were of -2.98 and -3.96 cm/s for β -bisabolene and terpinolene, respectively (Table 5). The ciprofloxacin had the lower number on Log K_p representing the lower skin permeability between the evaluated compounds.

The drug-likeness estimates how close is the prediction of a structured already knew on market. This evaluation on natural products has been growing over the time and it has good results already. It is noteworthy the importance of plants as source for modern drug design/discovery (Tian et al., 2015). The Log S value is related with the solubility of the compound evaluated and the lowest result is preferred (Rocha et al., 2019). In this evaluation Terpinolene had the best result on drug-likeness (Log S, DS and DL) being the compound with

closest result from Ciprofloxacin's (Table 5). Besides its potential, it is necessary *in vitro* and *in vivo* analyze with each compound and the essential oil as well. Once, they may present different result based on synergism or another mechanism (Azizan et al., 2017).

(E-)Caryophyllene is the major components of the essential oil of *Myrcia guianensis* leaves. This compound is an important sesquiterpene and it is present in several essential oils from plants like *Copaifera langsdorffii* (Ames-Sibin et al., 2018), *Myrcia sylvatica* (G. Mey) D.C. (Rosa et al., 2016), *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Oliveira, 2016) e *Syzygium aromaticum* (Barros Gomes et al., 2018). (E-)Caryophyllene has been demonstrating several important pharmacological activities including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, cardioprotective, hepatoprotective, gastroprotective, nephroprotective and antimicrobial (Machado et al., 2018). (E-)Caryophyllene also exhibits activity similar to local anesthesia, which could protect the nervous system from oxidative stress and inflammation (Gertsch et al., 2008; Tchekalarova et al., 2018).

(E-)Caryophyllene showed more pronounced antibacterial properties against Gram-positive bacteria than when compared with Gram-negative bacteria (Dahham et al., 2015) and presented good results as an inhibitory effect on factors related to *S. mutans* biofilm formation (Yoo & Jwa, 2018). Results on inhibition of *Streptococcus* sp. by (E-)caryophyllene are highlighted because those bacteria described as the most important in the initial adhesion of dental plaque in humans. *In vitro* studies have shown natural products that are present as the main (E-)caryophyllene compound with significant antimicrobial activity, suggesting that the substance possibly participated in this activity (Pieri et al., 2016).

The terpinolene was another chemical constituent of essential oil, that was between the major compounds found in this GC analysis and it is present in many plant species that have pharmacological activities, such as analgesic and anti-inflammatory (Macedo et al., 2016). Terpinolene is one of the most monoterpenes used as a food supplement or odorant in cosmetics and pharmaceutical industry. Besides that, cell proliferation and viability significantly decreased after terpinolene exposure (Agus et al., 2018). Essential oil that had terpinolene as one of the major compounds also showed antimutagenic activity (Lima et al., 2016), natural antioxidant potential (Coccimiglio et al., 2016).

The essential oil of *Myrcia guianensis* leaves presented great amount of β -bisabolene in GC analysis. The *Copaifera multijuga* oil, which also, presented as major compound (E-)caryophyllene and β -bisabolene, has an interesting anti-inflammatory effect and important effect on the CNS (Kobayashi et al., 2011). β -bisabolene, worked as an anti-cancer agent from the essential oil of opoponax that exhibits specific cytotoxicity to both human and murine

mammary tumour cells *in vitro* and *in vivo* (Yeo et al., 2016). The essential oil from *Daucus carota sativa* seeds presented 80% of β -bisabolene and showed a great antimicrobial activity (Imamu et al., 2007) as well as the high antifungal activity presented by *Clausena lansium* essential oil with β -bisabolene being one of the major compounds (He et al., 2019).

Importantly, environmental changes could have a different impact on populations of *Myrcia guianensis*, and these changes are responsible for changes in yield and chemical composition of essential oils. Examples of these environmental factors include rainfall, seasonality, altitude, atmospheric composition, temperature, UV radiation, age, pathogen attack, water, macronutrients and micronutrients (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Martins et al., 2006).

The results seen in figures 2 and 3 show that the best results of *Myrcia guianensis* oil were in Gram-positive bacteria, specifically front *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and clinical isolated MRSA. No other work on *Myrcia guianensis* was verified with this evaluation. This result also corroborates the results above-mentioned as (E-)Caryophyllene play. Other studies with other species of the genus *Myrcia*, such as *Myrcia oblangata* DC., showed inhibition of the activity of Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis*), while it was recorded with no activity front Gram-negative bacteria tested (Santana et al., 2018).

The work of Cerqueira et al. (2007) corroborates the results found in this study, since evaluating the species *Myrcia myrtifolia* DC. from Salvador, Bahia presented better results against *Staphylococcus aureus* and MRSA. Some *Myrcia* species presented good antimicrobial activity being showed better results front *Staphylococcus aureus* in which some species (*Myrcia citrifolia*, *Myrcia minutiflora*, *Myrcia paivae* and *Myrcia magnoliifolia*) presented moderate to high antibacterial activity and others (*Myrcia fallax*, *Myrcia sylvatica*, *Myrcia paivae* and *C. spruceana*) showed moderate actions (Pereira Junior, 2018).

The essential oil exhibited potential bactericidal effects against the tested pathogenic bacteria, even the clinical isolated. Although, the mode of action is still not fully understood. Moreover, the antibacterial activity may also be influenced by the susceptibility of the bacterial cells, especially *Staphylococcus aureus*, towards the chemical composition of the essential oil. It is noteworthy that others compound may also contribute the antibacterial properties by synergism and/or additive effects due to a single and/or several different mechanism(s) of action of one or several compounds. Mode of actions of the antibacterial activity may differ considerably depending on their interactive functions (Azizan et al., 2017).

Essential oils are also known for inhibit and eradicate of biofilm against bacteria decreasing this virulence factor and the chance of bacterial survival (B.-S. Kim et al., 2015; E.-S. Kim et al., 2015; Rossi et al., 2018). It is possible to observe in figure 4 the statistically significant result of biofilm eradication front *Escherichia coli* (ATCC 042) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). However, as above-mentioned there were no observation on Biofilm from *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) probably because of the decrease of bacteria population. On the other hand, the population of *Escherichia coli* (ATCC 042) did not suffer interference because of the essential oil while there was an eradication of biofilm in the highest concentration tested what corroborates for a potential action on biofilm.

The ability to form biofilms is an important feature in bacteria, and may be linked to their resistance to antimicrobial agents, the ability to generate infection and may be influenced by some virulence factors. Those biofilms are highly resistant to strategies such as mechanical removal, chemical removal and the use of antimicrobials / sanitizers. In this way, new methods have been developed to prevent and remove biofilms such as enzymatic treatments, natural peptides, bacteriophages and natural plant products (Silva et al., 2018b)

The results of the essential oil from plants of genus *Myrcia*, as *Myrcia ovata*, was effective agent against *E. faecalis* biofilm (Cândido et al., 2010). However, it also was observed essential oil of *Orthosiphon stamineus* Benth and *Ficus deltoidea*, which had as a major compound (E-)caryophyllene, were found no antibiofilm effect, which may happen because of synergism or effect of others compounds of the essential oil together (Azizan et al., 2017).

As *Myrcia guianensis*' leaves essential oil exhibited stronger actions on *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), it was performed an *in vivo* infection assay using *Tenebrio molitor* larvae. This larvae has been used as experimental model on many activity evaluation as antimicrobial, insecticide and cytotoxicity (Rezende, 2018). The groups that received saline solution were expected to have higher survival rates than the groups infected with bacteria. However, the results on ciprofloxacin groups may be explained by the current understanding that says the bacterial cells may reach persistence by diverse pathways even from the antibiotic what can increase virulence in some cases (H.-Y. Chen et al., 2011; Kubistova et al., 2018).

Revealing a larva survival rate of 80%, the *Myrcia guianensis* essential oil and the vehicle-treated of considered being of low toxicity what is a similar results find by Firmo (2018) (Figure 5). It is important highlight that, there were no difference statically about the survival test between any of the groups compered.

On the other hand, by analyzing the bacterial load, it was noted that the *Myrcia guianensis*' leaves essential oil significantly reduces the number of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in *Tenebrio molitor* hemolymph samples in comparison with control, as indicated by CFU counting (Figure 6). It is noteworthy that the bacterial load had slight better results when comparing with ciprofloxacin, which had great results comparing with the control as well. This effect was noted from 24h post-infection. The average of CFU in bacterial load quantification in control group was 100 while in Ciprofloxacin group was 18 (SD = 5) and in essential oil group was 10 (SD = 9). It is important to note that to estimate pathogen load is vital to determinate how the infection is especially within immune cells (Brasil, 2019).

Overall, the *Myrcia guianensis*' leaves essential oil had a promising results especially front *Staphylococcus aureus*. The association of essential oil with antibiotics it is also an opportunity of improvement what may create different mechanism of action, thus providing new choices in overcoming the unsolved crisis of bacterial resistance (Azizan et al., 2017).

5. Conclusion

This paper brings relevant information about *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. present in Legal Amazon in Brazil. The results showed that the essential oil from *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. leaves is a promising bactericidal agent, based on the characteristics of the constituents identified, together with the absence of toxicity identified in the tests performed, thus promoting the bioprospecting potential of the species, as well as identifying it as a promising agent for the development of herbal medicines.

Author Contributions: Conceptualization: José Guilherme Soares Maia, Thiago Azevedo Feitosa Ferro and Denise Fernandes Coutinho; Methodology: Thiago Azevedo Feitosa Ferro, Odair dos Santos Monteiro, Saulo José Figueiredo Mendes, Marcos Vinicius Soares Silva. Writing: Marcos Vinicius Soares Silva, Saulo José Figueiredo Mendes. Project administration: Marcos Vinicius Soares Silva and Denise Fernandes Coutinho.

Funding: This research was financed by CAPES, CNPq and FAPEMA

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Agus, H. H., Sarp, C., & Cemiloglu, M. (2018). Oxidative stress and mitochondrial impairment mediated apoptotic cell death induced by terpinolene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicology Research*, 7(5), 848–858. <https://doi.org/10.1039/C8TX00100F>
- Ames-Sibin, A. P., Barizão, C. L., Castro-Ghizoni, C. V., Silva, F. M. S., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Bersani-Amado, C. A., Marçal-Natali, M. R., Bracht, A., & Comar, J. F. (2018). β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10262–10277. <https://doi.org/10.1002/jcb.27369>
- Aminov, R. I. (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Araújo, F. F., Neri-Numa, I. A., de Paulo Farias, D., da Cunha, G. R. M. C., & Pastore, G. M. (2019). Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. *Food Research International*, 121, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.018>
- Azizan, N., Mohd Said, S., Zainal Abidin, Z., & Jantan, I. (2017). Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Orthosiphon stamineus* Benth and *Ficus deltoidea* Jack against Pathogenic Oral Bacteria. *Molecules*, 22(12), 2135. <https://doi.org/10.3390/molecules22122135>
- Barros Gomes, P. R., Mouchrek Filho, V. E., Ferreira Rabêlo, W., Albuquerque do Nascimento, A., Costa Louzeiro, H., da Silva Lyra, W., & Alves Fontenele, M. (2018). Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 47(1), 37–52. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n1.70657>
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2019). *Farmacopeia Brasileira* (6th ed., Vol. 01). Available on <<http://portal.anvisa.gov.br>>.
- Cândido, C. S., Portella, C. S. A., Laranjeira, B. J., Silva, S. S. da, Arriaga, A. M. C., Santiago, G. M. P., Gomes, G. A., Almeida, P. C., & Carvalho, C. B. M. (2010). Effects of *Myrcia ovata* Cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 621–627. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300012>
- Cardoso, V. D., Santos, G. R. dos, Mourão, D. de S. C., Haesbaert, F. M., Ferreira, T. P. de S., Osorio, P. R. A., Souza, R. R. de, Costa, P. F., Ferreira, E. C. R., & Aguiar, R. W. de

- S. (2018). Ethnobotanic Study of Use of Medicinal Plants Utilized in the Quilombola Community of Chapada da Natividade, Tocantins, Brazil. *Journal of Diseases*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.18488/journal.99.2018.51.1.9>
- Cascaes, M., Guilhon, G., Andrade, E., Zoghbi, M., & Santos, L. (2015). Constituents and Pharmacological Activities of Myrcia (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23881–23904. <https://doi.org/10.3390/ijms161023881>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). *Antibiotic/ Antimicrobial Resistance*. Retrieved June 13, 2020, from <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>
- Cerqueira, M. D. de, Souza-Neta, L. C., Passos, M. das G. V. M., Lima, E. de O., Roque, N. F., Martins, D., Guedes, M. L. S., & Cruz, F. G. (2007). Seasonal variation and antimicrobial activity of Myrcia myrtifolia essential oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(5), 998–1003. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000500018>
- Cerqueira, T. M. G., de Carvalho Correia, A. C., dos Santos, R. V., Lemos, R. P. L., da Silva, S. A. S., & Barreto, E. (2020). The Use of Medicinal Plants in Maceió, Northeastern Brazil: An Ethnobotanical Survey. *Medicines*, 7(2), 7. <https://doi.org/10.3390/medicines7020007>
- Chen, C.P., Chen, C.C., Huang, C.W., & Chang, Y.C. (2018). Evaluating Molecular Properties Involved in Transport of Small Molecules in Stratum Corneum: A Quantitative Structure-Activity Relationship for Skin Permeability. *Molecules*, 23(4), 911. <https://doi.org/10.3390/molecules23040911>
- Chen, H.-Y., Chen, C.-C., Fang, C.-S., Hsieh, Y.-T., Lin, M.-H., & Shu, J.-C. (2011). Vancomycin Activates σ B in Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Resulting in the Enhancement of Cytotoxicity. *PLoS ONE*, 6(9), e24472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024472>
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (29 th ed). CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coccimiglio, J., Alipour, M., Jiang, Z.H., Gottardo, C., & Suntres, Z. (2016). Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/1404505>

- Coutinho, D. F., Dias, C. S., Barbosa-Filho, J. M., Agra, M. F., Martins, R. M., Silva, T. M. S., da-Cunha, E. V. L., Silva, M. S., & Craveiro, A. A. (2007). Composition and Molluscicidal Activity of the Essential Oil from the Stem Bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. *Journal of Essential Oil Research*, *19*(5), 482–484.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699958>
- Dahham, S., Tabana, Y., Iqbal, M., Ahamed, M., Ezzat, M., Majid, A., & Majid, A. (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, *20*(7), 11808–11829. <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, *7*(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dmitriev, A. V., Filimonov, D. A., Rudik, A. V., Pogodin, P. V., Karasev, D. A., Lagunin, A. A., & Poroikov, V. V. (2019). Drug-drug interaction prediction using PASS. *SAR and QSAR in Environmental Research*, *30*(9), 655–664.
<https://doi.org/10.1080/1062936X.2019.1653966>
- Drwal, M. N., Banerjee, P., Dunkel, M., Wettig, M. R., & Preissner, R. (2014). ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W53–W58. <https://doi.org/10.1093/nar/gku401>
- Ferreira, S. B., Dantas, T. B., de Figuerêdo Silva, D., Ferreira, P. B., de Melo, T. R., & de Oliveira Lima, E. (2019). In Silico and In Vitro Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *18*(25), 2186–2196. <https://doi.org/10.2174/1568026619666181130141818>
- Ferro, T. A. F., Araújo, J. M. M., dos Santos Pinto, B. L., dos Santos, J. S., Souza, E. B., da Silva, B. L. R., Colares, V. L. P., Novais, T. M. G., Filho, C. M. B., Struve, C., Calixto, J. B., Monteiro-Neto, V., da Silva, L. C. N., & Fernandes, E. S. (2016). Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02052>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, & L. G. Pedro, Eds.; 3.^a Ed).
- FIGUEIREDO A.C., PEDRO L.G., & BARROSO J.G. (2017). Voláteis e óleos essenciais. Parte I/II. *Agrotec*, *24*, 14–17.

- Firmo, W. C. A. (2018). *Bioprospecção de plantas medicinais do cerrado maranhense com propriedades antioxidante, antibacteriana contra Corynebacterium spp e toxicidade: aporte para o desenvolvimento de novos medicamentos* (Doctoral dissertation). Federal University of Maranhão, Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of Legal Amazon, São Luís.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, *10*(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., Altmann, K.-H., Karsak, M., & Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(26), 9099–9104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, *30*(2), 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B. K., Landrum, L. L., Matsumoto, K., Mazine, F. F., Lughadha, E. N., Proneça, C., Soares-Silva, L. H., Wilson, P. G., & Lucas, E. (2008). *World checklist of myrtaceae*. (R. Govaerts, M. Sobral, P. Ashton, F. Barrie, B. K. Holst, L. L. Landrum, K. Matsumoto, F. F. Mazine, E. N. Lughadha, C. Proneça, L. H. Soares-Silva, P. G. Wilson, & E. Lucas, Eds.). Royal Botanic Gardens.
- Guimarães, A. S. (2019). *Compostos Naftoquinônicos: Atividade Biológica, Fotoprotetora e Estudos De Interação Com ctDNA* (Master Thesis). Federal University of Alagoas, Graduate Program in Chemistry and Biotechnology, Maceió.
- He, X., Zhang, L., Chen, J., Sui, J., Yi, G., Wu, J., & Ma, Y. (2019). Correlation between Chemical Composition and Antifungal Activity of *Clausena lansium* Essential Oil against *Candida* spp. *Molecules*, *24*(7), 1394. <https://doi.org/10.3390/molecules24071394>
- Imamu, X., Yili, A., Aisa, H. A., Maksimov, V. v., Veshkurova, O. N., & Salikhov, Sh. I. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Daucus carota* sativa seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, *43*(4), 495–496. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0174-2>
- Khurana, N., Ishar, M. P. S., Gajbhiye, A., & Goel, R. K. (2011). PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. *European Journal of Pharmacology*, *662*(1–3), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.048>

- Kim, B.S., Park, S.J., Kim, M.K., Kim, Y.H., Lee, S.B., Lee, K.H., Choi, N.Y., Lee, Y.R., Lee, Y.E., & You, Y.O. (2015). Inhibitory Effects of *Chrysanthemum boreale* Essential Oil on Biofilm Formation and Virulence Factor Expression of *Streptococcus mutans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(Article ID 616309), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/616309>
- Kim, E.S., Kang, S.Y., Kim, Y.H., Lee, Y.E., Choi, N.Y., You, Y.O., & Kim, K.J. (2015). *Chamaecyparis obtusa* Essential Oil Inhibits Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Expression of Virulence Factors. *Journal of Medicinal Food*, 18(7), 810–817. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3309>
- Kobayashi, C., Fontanive, T. O., Enzweiler, B. G., de Bona, L. R., Massoni, T., Apel, M. A., Henriques, A. T., Richter, M. F., Ardenghi, P., & Suyenaga, E. S. (2011). Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 306–313. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.515595>
- Kubistova, L., Dvoracek, L., Tkadlec, J., Melter, O., & Licha, I. (2018). Environmental Stress Affects the Formation of *Staphylococcus aureus* Persisters Tolerant to Antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, 24(5), 547–555. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0064>
- Leal, F. A., Miguel, E. P., & Matricardi, E. A. T. (2020). Estimates of Deforestation Rates in Rural Properties in the Legal Amazon. *Floresta e Ambiente*, 27(2), e20170283. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.028317>
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, 355(6327), 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>
- Lima, E., Cazelli, D. P., Pinto, F., Mazuco, R., Kalil, I., Lenz, D., Scherer, R., de Andrade, T., & Endringer, D. (2016). Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: Chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity. *Pharmacognosy Magazine*, 12(45), 42. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.176113>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- Macedo, E. M. A., Santos, W. C., Sousa Neto, B. P., Lopes, E. M., Piauilino, C. A., Cunha, F. V. M., Sousa, D. P., Oliveira, F. A., & Almeida, F. R. C. (2016). Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic

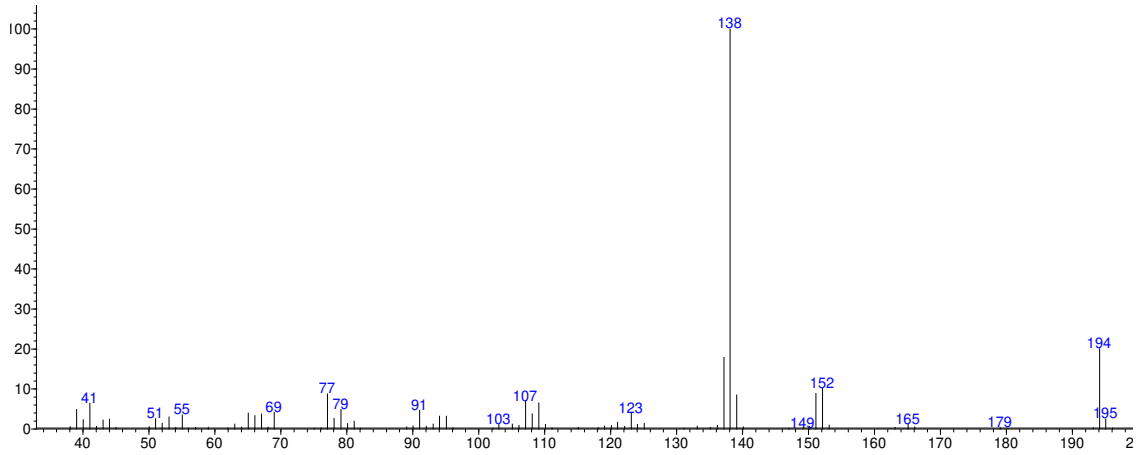
- effects in a model of chronic inflammation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(7). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165103>
- Macedo, J. A. B. (2016). *Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Primária à Saúde: Contribuição Para Profissionais Prescritores* (Specialization Thesis). Institute of Technology in Drugs – Farmanguinhos, Biodiversity Drug Innovation Management, Rio de Janeiro.
- Machado, K. da C., Islam, M. T., Ali, E. S., Rouf, R., Uddin, S. J., Dev, S., Shilpi, J. A., Shill, M. C., Reza, H. M., Das, A. K., Shaw, S., Mubarak, M. S., Mishra, S. K., & Melo-Cavalcante, A. A. de C. (2018). A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2376–2388. <https://doi.org/10.1002/ptr.6199>
- Maia, T. F., Donato, A., & Fraga, M. E. (2015). Atividade antifúngica de oleos essenciais de plantas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 17(1), 105–116.
- Martins, F. T., Santos, M. H. dos, Polo, M., & Barbosa, L. C. de A. (2006). Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. *Química Nova*, 29(6), 1203–1209. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600011>
- Morais, L., da Conceicao, G., & Nascimento, J. (2014). Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. *Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, 01(01), 317.
- Okhale, S. E., Buba, C. I., Oladosu, P., Ugbabe, G. E., Ibrahim, J. A., Egharevba, H. O., & Kunle, O. F. (2018). Chemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Leaf Essential Oil of *Syzygium guineense* (Willd.) DC. var. Guineense (Myrtaceae) from Nigeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 10(11), 341–349.
- Oliveira, D. R. de. (2016). *Avaliação da Atividade Tipo Antidepressiva do Óleo Essencial das Folhas de *Spiranthera Odoratissima* A. St.-Hil. e de seu Componente Majoritário, B-Cariofileno* (Master Thesis). Federal University of Goiás, Graduate Program of Pharmaceutical Science, Goiânia.
- Oliveira, L. G., Carvalho, A. V., Carvalho, R. A. F., Guimarães, J. L. C., Barros, M. J. B., Filho, M. T., Almeida, R. M., & Carvalho, E. do N. (2019). Crescimento pró-pobre na Amazônia Legal: uma análise para o decênio 2004-2014 com dados em painel. *Brazilian Journal of Development*, 5(9), 16703–16724. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n9-207>
- Pereira Junior, R. C. (2018). *Caracterização Química e Avaliação dos Potenciais Antimicrobiano, Inseticida e Citotóxico de Óleos Essenciais Obtidos de *Myrcia* spp.*

- (*Myrtaceae*) *Ocorrentes em Ecossistema de Terra Firme (Amazônia)* (Doctoral dissertation). Federal University of Amazonas, Graduate Program in Chemistry, Manaus.
- Pieri, F. A., Souza, M. C. de C., Vermelho, L. L. R., Vermelho, M. L. R., Perciano, P. G., Vargas, F. S., Borges, A. P. B., da Veiga-Junior, V. F., & Moreira, M. A. S. (2016). Use of β -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0842-1>
- Porto, D. F. (2014). *Desenvolvimento e avaliação da atividade antibacteriana de nanopartículas poliméricas carreadoras de vancomicina* (Master Thesis). Fluminense Federal University, Graduate Program of Applied Science for Health products, Niterói.
- Rezende, M. A. S. (2018). *Avaliação Nutricional e Toxicológica da Farinha da Larva de Tenebrio Molitor* (Master's Thesis). Federal Institute of Education, Science and Technology from Southeast of Minas Gerais, Graduate program of Food Science and Technology, Rio Pomba.
- Rocha, M. N. da, Campos, O. S., Marinho, M. M., & Marinho, E. S. (2019). Estudo Teórico do Ácido Giberélico: Caracterização Conformacional, Eletrônica e ADME. *Revista Expressão Católica Saúde*, *4*(2), 79. <https://doi.org/10.25191/recs.v4i2.3047>
- Rodrigues, W. (2016). Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. *Interações (Campo Grande)*, *17*(2), 267–277. <https://doi.org/10.20435/1984042X2016210>
- Rosa, C. S., Veras, K. S., Silva, P. R., Lopes Neto, J. J., Cardoso, H. L. M., Alves, L. P. L., Brito, M. C. A., Amaral, F. M. M., Maia, J. G. S., Monteiro, O. S., & Moraes, D. F. C. (2016). Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *18*(1), 19–26. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_006
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Anniballi, F., Valbonetti, L., & Paparella, A. (2018). Effect of *Origanum vulgare* essential oil on biofilm formation and motility capacity of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from discoloured Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(5), 1220–1231. <https://doi.org/10.1111/jam.13707>
- Sampaio, T. S., Blank, A. F., Gagliardi, P. R., Wisniewski Jr, A., Arrigoni-Blank, M. de F., Nizio, D. A. de C., Alves, M. F., & Nascimento Junior, A. F. de. (2020). Antifungal activity of essential oils of *Myrcia ovata* chemotypes and their major compounds on phytopathogenic fungi. *Bioscience Journal*, *36*(2). <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-42315>

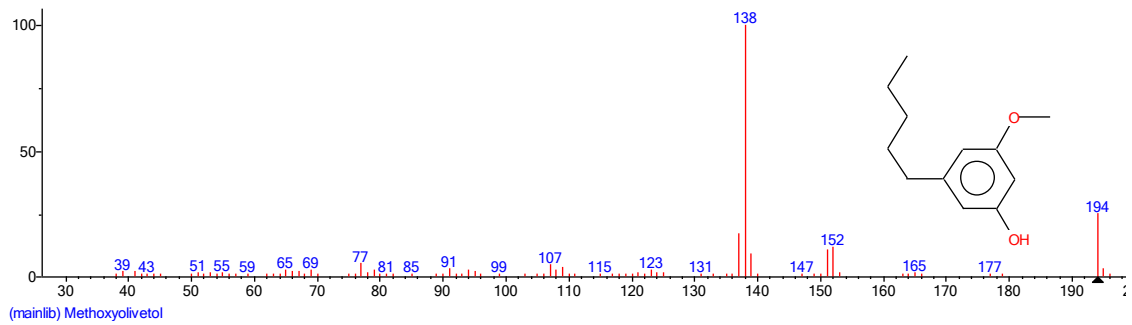
- Santana, C. B., Souza, J. G. de L., Coracini, M. D. A., Walerius, A. H., Soares, V. D., Costa, W. F. da, & Pinto, F. G. da S. (2018). Chemical composition of essential oil from *Myrcia oblongata* DC. and potencial antimicrobial, antioxidant and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). *Bioscience Journal*, 996–1009. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-39599>
- Sarkar, B., Ullah, M., & Islam, S. (2020). In Silico Analysis of Some Phytochemicals as Potential Anti-cancer Agents Targeting Cyclin Dependent Kinase-2, Human Topoisomerase IIa and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. *BioRxiv*.
- Silva, M. V. S., Frazão, T. S., Ferreira, M. M. A. V., Sales, J. S., Vieira, D. B., Vale, R. F. F. do, Carmo, L. H. do, Yano, T., & Figueiredo, P. M. S. (2015). Assessment in Vitro of Antibacterial Activity of Manipulated Product, on Solution Form, Obtained from Dry Extract of Leaves of *Psidium guajava* L. *International Journal of Chemistry*, 8(1), 64. <https://doi.org/10.5539/ijc.v8n1p64>
- Silva, L., Sarrazin, S., Oliveira, R., Suemitsu, C., Maia, J., & Mourão, R. (2016). Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *European Journal of Medicinal Plants*, 13(3), 1–9. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/25494>
- Silva, H.R.A., Bonifácio, M.A.S., Oliveira, M.S.C., & Eller, L.K.W. (2018). Avaliação dos Genes de Virulência e Formação dos Biofilmes em *Escherichia coli* Isoladas em um Laboratório Clínico de Presidente Prudente/Sp. *Colloquium vitae*. ISSN: 1984-6436, 9(3), 13-23. Retrieved from <<http://revistas.unoeste.br/index.php/cv/article/view/2242>>
- Silva, A. do Nascimento. (2019). *Prospecção de ativos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória em espécies de Myrcia DC. (MYRTACEAE)* (Doctoral dissertation). State University of Feira de Santana, Graduate Program of Vegetable Genetics Resources, Feira de Santana.
- Souza Filho, A. P. S., Santos, R. A., Santos, L. S., Guilhon, G. M. P., Santos, A. S., Arruda, M. S. P., Muller, A. H., & Arruda, A. C. (2006). Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, 24(4), 649–656. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000400005>
- Tchekalarova, J., da Conceição Machado, K., Gomes Júnior, A. L., de Carvalho Melo Cavalcante, A. A., Momchilova, A., & Tzoneva, R. (2018). Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice. *Seizure*, 57, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.03.009>

- Tian, S., Wang, J., Li, Y., Li, D., Xu, L., & Hou, T. (2015). The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.009>
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- World Health Organization (WHO). (2014). Antimicrobial Resistance. Fact sheet N°194. Available on < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>.
- World Health Organization (WHO). (2016). *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption*.
- Yeo, S. K., Ali, A. Y., Hayward, O. A., Turnham, D., Jackson, T., Bowen, I. D., & Clarkson, R. (2016). β -Bisabolene, a Sesquiterpene from the Essential Oil Extract of *Opoponax* (*Commiphora guidottii*), Exhibits Cytotoxicity in Breast Cancer Cell Lines. *Phytotherapy Research*, 30(3), 418–425. <https://doi.org/10.1002/ptr.5543>
- Yoo, H.-J., & Jwa, S.-K. (2018). Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Archives of Oral Biology*, 88, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.01.009>

Annex I

MASS SPECTROMETRY OF COMPOUND IR1706 (PM 194, FM, C₁₂H₁₈O₂)

NIST METHOXIOLIVETOL (IR 1601- Estimated)



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto nota-se que o óleo essencial das folhas de *Myrcia guianensis* apresenta-se com um importante potencial econômico presente na Amazônia Legal. Os resultados demonstram boa atividade frente *Staphylococcus aureus* ATCC e isolados clínicos, além de apresentar bom resultado frente biofilme bacteriano frente *Escherichia coli* (ATT 042).

Portanto, o óleo essencial proveniente das folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. se apresentam como um potencial agente no combate ao atual problema de saúde pública, que é a resistência aos antimicrobianos, de acordo com as características descritas sobre constituintes químicos identificados, potencial de ação e baixa toxicidade *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

Considerando as variáveis avaliadas neste estudo nota-se que o óleo essencial das folhas de *Myrcia guianensis* presente na Amazônia Legal se mostrou promissor para pesquisa e desenvolvimento de produtos de interesse farmacêutico.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos pelo financiamento à FAPEMA, CAPES e CNPq e a UNIVERSIDADE CEUMA pela permissão da utilização das instalações.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN, L. D. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrcia falax* (Rich.) DC. from Venezuela. **Rev. Soc. Quím. Perú**, v. 75, p. 221–227, 2009.
- ALCÂNTARA, G. A.; BORGES, L. L.; PAULA, J. R. Seasonal variation in the content of phenolic compounds in barks of *Myrcia rostrata* DC. by influence of environmental factors. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 3, p. 1306–1309, 2012.
- ALÓS, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, dez. 2015.
- ALVES, F. **Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa***. 2018. 79f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.
- ARAÚJO, L. S. DE et al. Conservação da biodiversidade do Estado do Maranhão: cenário Atual em dados geoespaciais. **Embrapa Meio Ambiente**, 2016.
- ARÁUJO, E. J. F. et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 35, n. 3, p. 355–361, 2014.
- ARESI, C. **Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: estudo bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- BARBOSA, J. C.; COMINALI, E. L. B. ***Pseudomonas aeruginosa* em Lentes de Contato: Uma Revisão Literária.** 2017. 10f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Toledo, Araçatuba: 2017.
- BERNARDES, R. S. A. et al. Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of the Aqueous Extract of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 6s, p. s135–s140, 12 nov. 2018.
- BEZERRA, R. V. et al. Atividade Antimicrobiana dos Monoterpenos (R)-(+)-Citronelal, (S)-(-)-Citronelal e 7-Hidroxicitronelal Contra Cepa de *Bacillus Subtilis*. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 62–69, 2019.
- BRASIL. **O Bioma Cerrado** (2014). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- BRITO, M. C. A. et al. Trade and Quality Control of Medicinal Plants in Brazil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 10, p. 32, 12 ago. 2016.
- CALAO, V. Y. P. **Caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) (Physical-chemical characterization, composition and antioxidant capacity of the essential oil of *Myrcia amazonica* DC. (Myrthaceae))**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém, 2014.

- CARNEIRO, R. A. FREITAS. **Doenças emergentes, respostas rápidas de prevenção**. 2017. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314–319, jun. 2008.
- CARVALHO, L. S. et al. Indicação terapêutica do óleo de copaíba: uma revisão de literatura Indication Have an opinion of a copaíba: a literature review. **Revista da FAESF**, v. 2, p. 46–50, 2018.
- CASCAES, M. et al. Constituents and Pharmacological Activities of Myrcia (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881–23904, 9 out. 2015.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). **Staphylococcus aureus in Healthcare Settings** (2011). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/HAI/organisms/staph.html>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). **Pseudomonas aeruginosa in Healthcare Settings** (2013). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). **Antibiotic/ Antimicrobial Resistance (AR/AMR)** (2020). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, 2010.
- CUNICO, M. M. et al. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97–103, 2004.
- DALLA COSTA, K. A. et al. Formação de Biofilmes Bacterianos em Diferentes Superfícies de Indústrias de Alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75-82, jun. 2016. ISSN 2238-6416. Disponível em: <<https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/512>>. Acesso em: 28 ago. 2020. doi:<https://doi.org/10.14295/2238-6416.v71i2.512>
- DOS SANTOS, C. et al. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three Myrcia Species. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 986, 24 abr. 2018.
- DOS SANTOS, G. et al. Essential Oil from Myrcia ovata: Chemical Composition, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice. **Planta Medica**, v. 80, n. 17, p. 1588–1596, 8 out. 2014.
- DRUMOND, S. N. et al. Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreio gênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 3, p. 579–590, jun. 2018.

FAUCHES, N. S.; AMARAL, T.O.; LARGUEZA, C. B. D.; TEODORO, A.J. Brazilian Myrtaceae Fruits: A Review of Anticancer Proprieties. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p.1-15, 2016, Article no.BJPR.26782. ISSN: 2231-2919, NLM ID: 101631759

FASUGBA, O. et al. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 545, 25 dez. 2015.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. (Eds) (2007). **Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático**, Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal (3ª Edição ISBN: 978-972-9348-16-7).

FIGUEIREDO A.C.; PEDRO L.G.; BARROSO J.G. Voláteis e óleos essenciais. Parte I/II. **Agrotec**, v. 24, p. 14–17, 2017.

FIOCRUZ. **Bactérias resistentes à medicamentos** (2017). Disponível em: <<http://www.periodicos.fiocruz.br/pt-br/content/bact%C3%A9rias-resistentes-medicamentos>>. Acesso em: 24 jun. 2020.

FLORA DO BRASIL. 2020 [em construção]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> Acesso em 22 janeiro de 2020

FONTES, J. E. N. et al. **Atividade larvicida do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia Ludina* e *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) contra o *Aedes aegypti***. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO A CIÊNCIA (SBPC). Anais. Florianópolis: SBPC, 2011.

FOUCHE, G. et al. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455–461, out. 2008.

GOMES, D.; CASALINI, C. Características Microbiológicas de *Klebsiella Pneumoniae* Isoladas no Meio Ambiente Hospitalar: Uma Revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 11, n. 22, 2018.

GOVAERTS, R. et al. **World checklist of myrtaceae**. Richmond, UK: Royal Botanic Gardens, 2008.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. In: **Gram-Positive Pathogens**. [s.l: s.n.]. p. 669–686, 2019.

JOHARCHI, M. R.; AMIRI, M. S. Taxonomic evaluation of misidentification of crude herbal drugs marked in Iran. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 105–112, 2012.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. . 3rd. ed. [s.l.] Sinauer Associates, 2007.

LEVIN-REISMAN, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, v. 355, n. 6327, p. 826–830, 24 fev. 2017.

LIMA, M. A. A. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Afr. **J. Biotechnol.**, v. 10, p. 11716–11720, 2011.

- LIMA, D. S. et al. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17–21, abr. 2017a.
- LIMA, T. C. D. et al. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 329-338, fev. 2017b.
- LIMA, R. de C. L. et al. Brazilian insulin plant as a bifunctional food: Dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antidiabetic compounds in *Myrcia rubella* Cambess. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 444–451, jun. 2018.
- LIMA, R. A., SOUZA SALDANHA, L., & SANT' ANNA CAVALCANTE, F. A. Importância da Taxonomia, Fitoquímica e Bioprospecção de Espécies Vegetais Visando o Combate e Enfrentamento Ao Covid-19. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 7, n. 1, p. 607-617, 2020. Recuperado de <<https://revistas.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/3721>>
- LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, jan. 2016.
- MACHADO, K. C. et al. A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 12, p. 2376–2388, dez. 2018.
- MARTINELLI, L. et al. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, 2017.
- MELO, V.V. de; DUARTE, I. P.; QUEIROZ, A. **Guia Antimicrobianos**. 57f, Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG). Goiânia, Goiás, 2012. Disponível em: <https://farmacia.hc.ufg.br/up/734/o/Guia_de_Antimicrobianos_do_HC-UFG.pdf?1409055717> Acesso em: 10 de março de 2018.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, 2016.
- MORAIS, L.; DA CONCEICAO, G.; NASCIMENTO, J. Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 01, n. 01, p. 317, 2014.
- MOREIRA, M. D. L. et al. Brief Review on Bacterial Resistance in *K. Pneumoniae*. **Open Science Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 11–15, 2019.
- MORETTO, B.M., BUENO, C.D.C., MORAIS, L.R. **Aromaterapia: O Benefício das Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais – Uma Revisão de Literatura**. 2015. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia), Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral, Matinhos, 2015
- MOTA, R. D. **Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos obtidos a partir da polpa da *Saccharum officinarum* (cana de açúcar)**. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade CEUMA, São Luís, 2014.

- OMS. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: Opções de Ações**. Geneva: World Health Organization; 2012. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75389/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf;jsessionid=AF3B42DAD61505B045212D26995E1492?sequence=3>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- OMS. **Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance 2014**. Disponível em: <<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/infographic-antimicrobial-resistance-20140430.pdf?ua=1>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- OMS. **WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation**. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- PANDINI, J. A. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 53–60, 27 jul. 2017.
- PANDEY, A.K. et al. **Chapter 6 - Distribution of aromatic plants in the world and their properties** in Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health. London Wall, London EC2Y 5AS, United Kingdom, p.89-114, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00006-6>. ISBN: 978-0-12-814700-9
- PEREIRA JUNIOR, R. C. **Caracterização Química e Avaliação dos Potenciais Antimicrobiano, Inseticida e Citotóxico de Óleos Essenciais Obtidos de *Myrcia* spp. (Myrtaceae) Ocorrentes em Ecossistema de Terra Firme (Amazônia)**. 2018. 210f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.
- PORTO, D. F. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antibacteriana de nanopartículas poliméricas carreadoras de vancomicina**. 2014. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.
- RODRIGUES, T. S. et al. Resistência Bacteriana à Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, n. 6, Ago., 2018.
- RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 17, n. 2, p. 267–277, 3 jun. 2016.
- ROSÁRIO, A. S. **Subtribo Myrciinae (Myrtaceae) na Amazônia brasileira, com ênfase no estado do Pará, Brasil**. 2012. 300f. Tese (Doutorado em Botânica Tropical) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- SALVADOR, M. et al. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the South of Brazil. **Nat. Prod. Commun.**, v. 6, p. 977–982, 2011.
- SAMPAIO, T. S. et al. Antifungal activity of essential oils of *Myrcia ovata* chemotypes and their major compounds on phytopathogenic fungi. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, 11 fev. 2020.
- SANCHA, S. A. R. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Metabolitos Secundários Isolados a Partir de uma Planta usada na medicina Tradicional Africana**. 2015. 145f.

Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

SCHIMITH, L. et al. Peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de novos compostos antimicrobianos. **Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA**, v. 2, 2018.

SHAH, C. et al. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 204, 2 dez. 2019.

SILVA, A. N.; UETANABARO, A. P.; LUCCHESI, A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). **Nat. Prod. Commun.**, v. 8, n. 2, p. 269–271, 2013.

SILVA, F. K. S. et al. Levantamento das Espécies Conhecidas como Pedra-Ume-Caá (Myrtaceae), com Ênfase nas Comercializadas na Cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 7–15, 30 mar. 2015a.

SILVA, M. V. S. et al. Assessment *in vitro* of Antibacterial Activity of Manipulated Product, on Solution Form, Obtained from Dry Extract of Leaves of *Psidium guajava* L. **International Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 64, 21 dez. 2015b.

SILVA, T. I. DA et al. Efeito larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 2, p. 256, 17 jun. 2017.

SILVA, L. A. et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, 2018.

SILVA, A. N. **Prospecção de ativos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória em espécies de Myrcia DC. (Myrtaceae)**. 2019. 159f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira De Santana, Feira de Santana, 2019.

SILVA, E. A. J. **Composição Química e Atividade Antifúngica do Óleo Essencial das Folhas de *Psidium guajava* no Controle de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2020. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2020a.

SILVA, A. S. et al. Quórum sensing e suas implicações na formação de biofilme bacteriano em hospitais. **J. Infect. Control**, v. 9, n. 1, p. 37-42, Jan-Mar 2020b.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Edição: 1 ed. [s.l.] Artmed, 2017.

SOBRAL, M. et al. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro** (2015). Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10699>>. Acesso em: 24 jun. 2020.

SOUSA, L. A. F. et al. The effect of the aqueous extract of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 42, p. 3139–3146, 2013.

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 4, p. 1251–1259, ago. 2019.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of Essential Oil from *Myrcia laruotteana* Fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 7–10, set. 2011.

STEHMANN, J.R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: Simões, C.M., Schenkel, E.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. Artmed, 2017. Cap. 1, p. 1 – 11

SURESH, M.K; BISWAS, R.; BISWAS, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 1, p. 1-12, jan. 2019.

TAKEARA, R. et al. Biological Properties of Essential Oils from the Piper Species of Brazil: A Review. In: **Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature**. 2017.

TAVARES, C. P. M. **Klebsiella pneumoniae e fatores associados que contribuem para a resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura**. 2019. 44 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

TENORIO, A. I. S. et al. Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Calypttranthes microphylla* B. Holts & M.L., *Myrcia aff fosteri* Croat and *Eugenia octopleura* Krug & Urb from Panama. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 29–33, set. 2011.

TURRI, L. **Atividades anticâncer e antiestrogênica de extratos e frações das folhas da “Psidium guajava” L.** 2018. 220f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

VALENZUELA-VALDERRAMA, M.; GONZÁLEZ, I. A.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: Perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 256–264, dez. 2019.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático (Medicinal Plants in the Amazon: Contribution to Its Systematic Knowledge)**. 3. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke, 2010.

VAREDA, P. M. P. et al. *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

XAVIER, L. D. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de Syzygium cumini**. 2019. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019.

XAVIER, R. G. C. **Filogrupos e fatores de virulência de estirpes de Escherichia coli obtidas do conteúdo uterino e de fezes de cadelas com piometra**. 2020. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

ZAGO, L. M. S.; MOURA, M. E. P. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, p. 157-173, set. 2018. ISSN 2526-2130. Disponível em: <<http://revistas.ifg.edu.br/tecnica/article/view/220>>. Acesso em: 28 ago. 2020.