



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**BIOPROSPECÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, TÓXICA E
ANTIBACTERIANA CONTRA *Corynebacterium diphtheriae***

MARCIA BARROS ALVES

São Luís-MA

2023

MARCIA BARROS ALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, TÓXICA E
ANTIBACTERIANA CONTRA *Corynebacterium diphtheriae***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto
Coorientador (a): Prof. Dra. Priscila Soares Sabbadini

**São Luís-MA
DEZEMBRO/2023**

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

Alves, Marcia Barros.

Bioprospecção de óleos essenciais de especiarias e avaliação das atividades antioxidante, tóxica e antibacteriana contra *Corynebacterium diphtheriae* / Marcia Barros Alves. - 2023.

105 f.

Coorientador(a): Priscila Soares Sabbadini.

Orientador(a): Lídio Gonçalves Neto.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, 2023.

1. Antibacteriano. 2. Biofilme. 3. *Corynebacterium diphtheriae*. 4. Óleos essenciais. I. Neto, Lídio Gonçalves. II. Sabbadini, Priscila Soares. III. Título.

MARCIA BARROS ALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, TÓXICA E
ANTIBACTERIANA CONTRA *Corynebacterium diphtheriae***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em **19 / 12 / 2023**

Banca examinadora

Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto (Orientador)
Universidade CEUMA

Prof. Dr. Wellyson da Cunha Araújo Firmo
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão

Prof. Dr. Lincoln de Oliveira Sant'anna
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Márcio Anderson Sousa Nunes
Universidade CEUMA

Prof. Dra. Andrea de Souza Monteiro
Universidade CEUMA

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Marcia Barros Alves, (x) autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Bioprospecção de óleos essenciais de especiarias e avaliação das atividades antioxidante, tóxica e antibacteriana contra *Corynebacterium diphtheriae*” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

São Luís, 19 de dezembro de 2023



Marcia Barros Alves

CPF: 601.780.373-54

RG: 0207.388.2002-9

A Deus por todos os milagres que me concede diariamente.

A minha família, que carregou comigo todas as alegrias e
agruras dessa caminhada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por neste doutorado abençoar-me desde a fase do seletivo, concedendo milagres e ânimo a cada momento em que foi necessário e não me permitir desistir nos momentos de dificuldades.

A minha família (essa vitória é nossa), em especial meus pais, Helena Barros e João Alves, que mesmo tendo uma origem de família interiorana e de tão pouco estudo, apoiaram-me incondicionalmente em cada passo dado em minha vida e escolhas.

Ao meu irmão, Marcio Alves, que sempre esteve torcendo e acreditando em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava, assim como minhas primas amadas Gabriella Ferreira e Marta Raquel Ferreira, madrinhas Marta Maria Alves e Elinisse Alves, tio João Paulo Ferreira e minha avó Maria José Barros.

Ao meu esposo, Rossini Carlos Sousa, que nunca me deixou esmorecer nas dificuldades ou preocupações, ouvindo os problemas, propondo soluções ainda que sua formação fosse em T.I., também tive apoio e acolhimento de meus sogros João Carlos Sousa e Maria do Amparo Silva e meus 5 cunhados (Li-Chang Shuen Sousa, Karla Sousa, Scarlet Sousa, Carlos Di Stefano Sousa e Stefhany Sousa), sempre interessados em saber como estava indo meu doutorado.

A professora Priscila Sabbadini, pela oportunidade e confiança fundamentais para que eu pudesse ingressar no programa e desenvolver o projeto sob seu apoio, paciência e dedicação.

Ao professor Lídio Neto, por também aceitar o desafio da orientação de um projeto já em curso e, com todo o cuidado de um profissional, ter acolhido a mim como parte de sua equipe.

Aos colegas do laboratório que não mediram esforços ao me ajudar diariamente no desenvolvimento dos experimentos, não economizaram na alegria e no companheirismo ao partilhar as dificuldades, em especial Katyane Nascimento, Jessica Mendes, Denes Sousa, Pâmela Viana, Victor Saruk, Thalyta Rodrigues, Danyelle Santos, Dionney Andrade, professor Thiago Ferro.

Aos meus amigos Ellen Cantanhede, Rafaella Souza, Iven Vale, Camilla Itapary, Fernanda Rosa, Patrícia Valéria Branco, Willyson Jardim que também acompanharam diversas fases da vida acadêmica e ouviram todos os meus desabafos, muitas vezes incentivando para, como se diz por aí, não deixar a peteca cair.

Aos companheiros e amigos caemeiros que estiveram acompanhando e ajudando muitas vezes cobrindo uma falta, concedendo folgas a serem pagas conforme disponibilidade

minha, alterando meu turno de trabalho para que pudesse estar presente nas disciplinas presenciais ou mesmo demonstraram curiosidade, preocupação e torcida com a aquisição deste título, em especial, Aída Correia, Honório Moreira, José Klaus, Maria Danielle Cutrim, Tarcísio Procópio, Thiago Christopher e Ygor Frazão.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio concedido ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram ou compartilharam deste trabalho, o meu muito obrigada!

ALVES, Marcia Barros. **Bioprospecção de óleos essenciais de especiarias e avaliação das atividades antioxidante, tóxica e antibacteriana contra *Corynebacterium diphtheriae***. 2023. 105 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia - BIONORTE) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

A difteria é uma doença bacteriana ocasionada por *Corynebacterium diphtheriae*, a possui preocupantes relatos de resistência às drogas de escolha. Nesse contexto, o interesse crescente no uso óleo essencial (OE) pode constituir uma ajuda na atenção primária à saúde. Neste trabalho, objetivou-se investigar as composições químicas dos OE das especiarias populares *Cinnamomum verum* J. Presl. (canela) e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo) e as atividades biológicas sobre isolados de *C. diphtheriae*. Os insumos vegetais de *C. verum* (folhas) e *S. aromaticum* (inflorescências) foram submetidos a extração dos OE, através de arraste por vapor d'água, os quais foram submetidos a análise química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Posteriormente, analisou-se a capacidade antioxidante, utilizando o método de fosfomolibdênio de amônio. Também foram verificadas atividade hemolítica e realizados bioensaios em *Artemia salina* e *Tenebrio molitor* com os OE. Foram feitos também experimentos para determinação de concentração mínima inibitória e bactericida dos OE em 5 amostras clínicas de *C. diphtheriae* isoladas no Maranhão e 2 amostras padrão. Por ter apresentado concentração inibitória mínima para todos os isolados, foi examinada a influência do OE de *S. aromaticum* sobre a morfologia bacteriana e na formação do biofilme, na concentração $\frac{1}{2}$ da inibitória. O composto majoritário para ambos os OE foi eugenol, com 72,11% no de *C. verum* e 44,29% no de *S. aromaticum*. O OE de *C. verum* apresentou 21,5% de atividade antioxidante e o de *S. aromaticum* 40,6%. A atividade hemolítica dos OE foi considerada baixa, tendo o OE de *C. verum* provocado hemólise na concentração de 225 $\mu\text{g/mL}$ e o de *S. aromaticum* na concentração de 514 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da toxicidade para *A. salina*, o OE de *C. verum* apresentou CL_{50} de 1,37 $\mu\text{g/mL}$ e o *S. aromaticum* CL_{50} de 377,25 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando alta toxicidade. Nos testes com *T. molitor*, a média de sobrevivência foi 56,88% com aplicação do OE de *C. verum* e de 80% com o OE de *S. aromaticum*. Quatro dos isolados (MA 19, MA 23, MA 52, MA 150) tiveram crescimento inibido pelo OE de *C. verum* em concentrações variando entre 1.500 a 750 $\mu\text{g/mL}$, porém para nenhum destes foi verificada concentração bactericida mínima, enquanto que todos os isolados foram inibidos em concentrações que variaram entre 1.000 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ com o OE de *S. aromaticum* e para dois dos isolados testados verificou-se concentração bactericida mínima de 2.000 $\mu\text{g/mL}$. O OE de *S. aromaticum* não foi capaz de alterar a morfologia bacteriana e para apenas um isolado inibiu a produção do biofilme. Desse modo, os OE demonstraram capacidade de inibição dos isolados testados e, em sua composição, substâncias com atividades antimicrobianas já descritas em literatura, cujas propriedades podem indicar características interessantes para produção de novos fármacos.

Palavras-chave: Antibacteriano; Biofilme; *Corynebacterium diphtheriae*; Óleos essenciais

ALVES, Marcia Barros. **Bioprospecting of spice essential oils and evaluation of antioxidant, toxic and antibacterial activities against *Corynebacterium diphtheriae***. 2023. 105 f. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology- BIONORTE) – Federal University of Maranhão, São Luís, 2023

ABSTRACT

Diphtheria is a bacterial disease caused by *Corynebacterium diphtheriae*, which has worrying reports of resistance to the drugs of choice. In this context, the growing interest in use of essential oil (EO) can be an aid in primary health care. In this work, the objective was to investigate chemical compositions of EOs of the popular spices *Cinnamomum verum* J. Presl. (cinnamon) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (clove) and biological activities on isolates of *C. diphtheriae*. The plant inputs of *C. verum* (leaves) and *S. aromaticum* (inflorescences) were subjected to EO extraction, through water vapor drag, which were subjected to chemical analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Subsequently, the antioxidant capacity was analyzed using the ammonium phosphomolybdenum method. Hemolytic activity was also verified and bioassays were carried out on *Artemia salina* and *Tenebrio molitor* with the EOs. Experiments were also carried out to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentration of EOs in 5 clinical samples of *C. diphtheriae* isolated in Maranhão and 2 standard samples. As it presented a minimum inhibitory concentration for all isolates, the influence of EO of *S. aromaticum* on bacterial morphology and biofilm formation was examined at a concentration $\frac{1}{2}$ of the inhibitory concentration. The majority compound for both EOs was eugenol, with 72.11% in that of *C. verum* and 44.29% in that of *S. aromaticum*. The EO of *C. verum* showed 21.5% antioxidant activity and that of *S. aromaticum* 40.6%. The hemolytic activity of EOs was considered low, with EO of *C. verum* causing hemolysis at a concentration of 225 $\mu\text{g/mL}$ and *S. aromaticum* at a concentration of 514 $\mu\text{g/mL}$. In the toxicity assessment for *A. salina*, the EO of *C. verum* presented an LC_{50} of 1.37 $\mu\text{g/mL}$ and the *S. aromaticum* LC_{50} of 377.25 $\mu\text{g/mL}$, demonstrating high toxicity. In tests with *T. molitor*, the average survival rate was 56.88% with the application of EO of *C. verum* and 80% with EO of *S. aromaticum*. Four of the isolates had growth inhibited by EO of *C. verum* at concentrations ranging between 1,500 and 750 $\mu\text{g/mL}$, however, for none of these, a minimum bactericidal concentration was observed, while all isolates were inhibited at concentrations ranging between 1,000 and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ with the EO of *S. aromaticum* and for two of the tested isolates there was a minimum bactericidal concentration of 2,000 $\mu\text{g/mL}$. The EO of *S. aromaticum* was not able to alter bacterial morphology and for only one isolate it inhibited biofilm production. Thus, the EOs demonstrated the capacity to inhibit the tested isolates and, in their composition, substances with antimicrobial activities already described in the literature, whose properties may indicate interesting characteristics for the production of new drugs.

Keywords: Antibacterial; Biofilm; *Corynebacterium diphtheriae*; Essential oils

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Taxa de sobrevivência de larvas *Tenebrio molitor* após inoculação dos óleos essenciais de *Cinnamomum verum* J. Presl. (A) e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (B). **42**
- Figura 2-** Micrografias após coloração pelo método de Gram, de *Corynebacterium diphtheriae* (MA 23) cultivada com óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry **44**
- Figura 3 -** Influência do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry na concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM sobre a formação de biofilme de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* em placas de poliestireno. **46**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Isolados de *Corynebacterium diphtheriae* utilizadas no estudo. **37**
- Tabela 2-** Composição química do óleo essencial extraído de folhas de *Cinnamomum verum* J. Presl. (canela). **40**
- Tabela 3-** Composição química do óleo essencial extraído de inflorescências desidratadas de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (cravo). **41**
- Tabela 4-** Concentrações inibitória e bactericida mínimas ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais de *Cinnamomum verum* J. Presl. e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry contra *Corynebacterium diphtheriae*. **43**
- Tabela 5-** Formação de biofilme mediante influência do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry. **45**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAPOE	Associação Brasileira de Produtores de Óleos Essenciais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CL	Concentração letal
CLSI	Clinical e Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
LDBRS	Laboratório de Doenças Bacterianas Respiratórias e Sistêmicas
MA	Maranhão
MH	Muller Hinton
NaCl	Cloreto de sódio
OE	Óleo(s) essencial(is)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PNPME	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
TD	Toxina diftérica
TSB	Tryptic Soy Broth

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	19
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
2.2.1 <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl. (canela)	22
2.2.2 <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo).....	24
2.2.3 Ação antibacteriana de óleos essenciais	25
2.2.4 Resistência bacteriana e o uso de óleos essenciais	27
2.3 <i>Corynebacterium diphtheriae</i> E DIFTERIA	28
2.4 BIOFILME BACTERIANO	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 ORIGEM DOS MATERIAIS VEGETAIS E OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.	33
3.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	33
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DE AMÔNIO.....	34
3.4 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	35
3.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE CONTRA <i>Artemia salina</i>	35
3.6 BIOENSAIO COM LARVAS DE <i>Tenebrio molitor</i>	36
3.7 ORIGEM E CULTIVO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS.....	36
3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	38
3.10 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA MORFOLOGIA E AGREGAÇÃO BACTERIANA	38
3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	38
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS	40
4.1 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	40
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO DE AMÔNIO	41
4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	41
4.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE CONTRA <i>Artemia salina</i>	41

4.5 BIOENSAIO COM LARVAS DE <i>Tenebrio molitor</i>	42
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA.....	42
4.7 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL NA MORFOLOGIA BACTERIANA	43
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL	44
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, o mundo tem vivenciado novos surtos de doenças infecciosas emergentes e reemergentes com potencial epidêmico que ocasionaram perdas de vidas, resultando em uma preocupação crescente. Uma dessas doenças é a difteria, listada pela Organização Mundial de Saúde em 2018 como uma das doenças infecciosas prioritárias que ameaçam a segurança global da saúde (ZUMLA e HUI, 2019).

A difteria costumava ser uma das infecções com alta mortalidade em crianças pequenas (DITTMAN *et al.*, 2000), sendo *Corynebacterium diphtheriae* o principal agente etiológico (LEGGET *et al.*, 2010). A partir do crescimento da bactéria na faringe e a evolução do quadro, ocorre a formação de uma pseudomembrana resultante da combinação dos efeitos do crescimento bacteriano, produção de toxina, necrose tecidual e resposta imune do hospedeiro (SALYERS e WHITT, 1994).

Com o desenvolvimento da vacina toxóide, a doença foi amplamente controlada no mundo, porém milhares de casos de difteria ainda são relatados anualmente (DUREAB *et al.*, 2018; WHO, 2018; RAHMAN e ISLAM, 2019). Em países com alta cobertura vacinal, os casos de difteria estão associados a viagens e migração de regiões endêmicas (ZAKIKHANY e EFSTRATIOU, 2012; MEINEL *et al.*, 2016; SCHEIFER *et al.*, 2019), uma vez que a vacina contra a difteria é composta pela forma inativada da toxina diftérica, o que permite a colonização assintomática e a transmissão silenciosa do patógeno, necessitando de intensa vigilância epidemiológica (SHARMA *et al.*, 2019; HENNART *et al.*, 2020).

Outras possíveis razões para que ainda ocorram casos esporádicos de difteria no mundo incluem falhas no cumprimento da programação e no reforço das vacinas, campanhas contra vacinação e imunossenescência (BERMEJO-MERTIN *et al.*, 2016).

Em 2020, Brasil, República Dominicana, Haiti e República Bolivariana da Venezuela confirmaram casos de difteria. No Brasil, entre 2010 e 2019, foram notificados 662 casos suspeitos de difteria, dos quais 77 (12%) foram confirmados, incluindo 8 óbitos. A região Nordeste teve a maior proporção de casos confirmados (58%), seguida das regiões Sudeste (18%) e Sul (10%) (OPAS, 2020).

No Maranhão, em 2010, três municípios do estado, onde a cobertura vacinal atinge 56%, tiveram registro de 27 casos de difteria confirmados, a maioria em crianças, e três desses casos resultaram em morte, sendo duas em crianças com esquema de vacinação completo (SANTOS *et al.*, 2015).

Isolados de *C. diphtheriae* provenientes de quadros de difteria e infecções invasivas no continente Europeu já exibiram tolerância as drogas de escolha, tais como penicilina e eritromicina (PATEY *et al.*, 1995). No Brasil também foi documentada resistência ou suscetibilidade intermediária a essas mesmas drogas (SANTOS *et al.*, 2015).

Apesar dos relevantes conhecimentos adquiridos durante os anos em diferentes áreas de pesquisa e estudos, as estratégias disponíveis para erradicar a difteria ainda são insuficientes (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2011). As vacinas são a forma de conter o avanço de epidemias, porém não erradicam o portador assintomático da população, o que permite a circulação de cepas toxigênicas e atoxigênicas que, ao ocorrer declínio na imunidade da população aliada a falta de reforços vacinais, permitem a sua ocorrência esporádica (FORMIGA e MATTOS GUARALDI, 1993; GALAZKA e ROBERTSON, 1995; DIAS, 2011).

Nesse contexto de resistência bacteriana frente aos antibióticos, a busca por drogas ou compostos que melhorem a atividade dos medicamentos de escolha encontrou forte fonte de pesquisa nos produtos naturais (extratos, óleos e fitoconstituintes), em particular nas plantas medicinais que, em certas circunstâncias, constituem ajuda nos cuidados primários de saúde e complemento terapêutico compatível com a medicina convencional (CIRINO, 2014).

Para que se possa utilizar produtos oriundos de plantas no tratamento de enfermidades deve haver garantia de segurança em relação a efeitos tóxicos, além de conhecimentos sobre efeitos secundários, interações, contraindicações, mutagenicidade, dentre outros. Portanto, a existência de ensaios farmacológicos e experimentação clínica que demonstrem eficácia para este tipo de produto terapêutico é de extrema importância (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Historicamente, as plantas têm sido utilizadas para o tratamento de várias doenças na medicina tradicional (JOHNY *et al.*, 2010). Nas concentrações consideradas bactericidas, compostos vegetais podem causar dano à membrana, a perda de produção de energia, disfunção enzimática e extravazamento de conteúdos celulares, o que prejudica a fisiologia e leva a morte das células (TSUCHIYA e IINUMA, 2000). A atividade antimicrobiana de plantas como *Piper betel* (pimenta betel) e *Terminalia catappa* (amendoeira) já foi descrita para diferentes corinebactérias, incluindo *C. diphtheriae* (UNNIKRISHMAN *et al.*, 2014).

A partir de especiarias ou ervas medicinais, plantas inteiras ou mesmo partes como folhas, frutas, flores e cascas, é possível extrair óleos essenciais (OE). Os OE são

caracterizados como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis e capazes de gerar sabores e/ou aromas. Em temperatura ambiente, apresentam-se no estado líquido com aspecto claro ou incolor. Não se misturam à água (TROMBETTA *et al.*, 2005; EDRIS, 2007).

Os OE são parcialmente responsáveis pelas propriedades farmacêuticas descritas para as plantas medicinais (TROMBETTA *et al.*, 2005; EDRIS, 2007). Podem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, tornando-se desta forma substâncias chave para a pesquisa de novos medicamentos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Cinnamomum verum J. Presl. (*C. verum*), popularmente conhecida como canela, é uma erva conhecida pelo seu tradicional uso em aplicações medicinais, tendo sido estudado seus efeitos para o período de gravidez, no controle de diabetes e problemas ginecológicos e atualmente já contar com publicações sobre suas propriedades antiinflamatórias, cardioprotetoras, antioxidantes e antimicrobianas (KAWATRA e RAJAGOPALAN, 2015; YANAKIEV, 2020).

Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L.M. Perry (*S. aromaticum*) é uma planta da família Myrtaceae, nativa da Indonésia, que se destaca pela a produção de botões florais, que são usados como especiarias em alimentos ou destinados à extração do óleo essencial, o qual é bastante usado na área medicinal em tratamentos analgésico e antiinflamatório, além de possuir ação antioxidante e significativa atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos relatados em literatura (AGUILAR-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017; MULLA *et al.*, 2017).

Surtos bacterianos são reportados com frequência ao longo dos anos, com taxas crescentes de resistência, representando gastos econômicos e perda de produtividade para as populações e preocupação por parte dos profissionais de saúde. Além disso, o fluxo de pessoas, bens de consumo e alimentos característicos de um mercado globalizado aumentam também as possibilidades destes surtos alcançarem grandes proporções rapidamente ao redor do mundo (BUSH *et al.*, 2011; ADEGOKE *et al.*, 2017).

Tendo em vista o desafio no tratamento de infecções com bactérias resistentes a múltiplas drogas, é notória a necessidade de encontrar substâncias com propriedades antimicrobianas que venham atuar no combate a esses microrganismos (PEREIRA *et al.*, 2004). Portanto, no presente trabalho objetivou-se investigar as composições químicas dos OE das especiarias populares *C. verum* (canela) e *S. aromaticum* (cravo), bem como as atividades biológicas sobre isolados de *C. diphtheriae*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição química e atividades biológicas de OE extraídos das especiarias de uso popular *Cinnamomum verum* J. Presl. (canela) e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise química dos OE.
- Verificar a capacidade antioxidante dos OE.
- Pesquisar o efeito dos OE sobre hemácias humanas.
- Analisar o potencial tóxico dos OE contra *Artemia salina*.
- Analisar a taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após inoculação dos OE.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bacteriana mínima (CBM) dos OE.
- Analisar a influência dos OE sobre a morfologia e agregação bacteriana.
- Pesquisar qualitativa e quantitativamente a atividade antibiofilme em placas de poliestireno, a partir dos resultados obtidos de CIM e CBM, dos OE sobre isolados de *C. diphtheriae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A principal responsável pela consolidação do conhecimento sobre o emprego de plantas medicinais é a tradição repassada verbalmente pelas gerações, resultando em carência do conhecimento científico quanto as suas propriedades farmacológicas e poucas informações sobre os efeitos benéficos ou maléficos (OLIVEIRA e ARAÚJO, 2007).

Estima-se que 80% da população mundial usa recursos das medicinas populares como alternativa a assistência médica, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (YUNES *et al.*, 2001).

Planta medicinal é definida por LOPES *et al.* (2005) como aquela que é administrada em homem ou animal para exercer ação terapêutica. Registros apontam indícios de uso das plantas medicinais pelas civilizações mais antigas (ANDRADE *et al.*, 2007).

As plantas possuem o metabolismo dependente da sua fisiologia, podendo ser classificado em primário, que é responsável pelo desenvolvimento e manutenção celular, com caráter conservativo e presente em todas as espécies; e secundário, encontrado em alguns grupos taxonômicos ou sendo exclusivo para cada espécie, que oferece vantagens para os indivíduos que o sintetizam, tais como defesa contra patógenos, processos de adaptação a estresse hídrico, entre outros (PROBST, 2012).

Muitos metabólitos secundários possuem valor comercial tanto na área farmacêutica, quanto nas áreas alimentícia, cosmética, entre outras (SIMÕES *et al.*, 2001). Os produtos do metabolismo secundário podem ser divididos em três grupos, segundo a sua biossíntese: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos. Em torno de 55.000 terpenoides já foram isolados, podendo estes apresentar funções tanto no metabolismo primário como secundário (CROTEAU *et al.*, 2000).

Cerca de 12.000 alcaloides conhecidos apresentam uma ou mais moléculas de nitrogênio, sendo sintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Os compostos fenólicos conhecidos, em torno de 8.000, podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico ou via do acetato/malonato (CROTEAU *et al.*, 2000).

A biossíntese de metabólitos secundários é um processo complexo e está sujeita a influência de diferentes variáveis, como fatores bióticos e abióticos, que podem interferir na qualidade e quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de uma planta em determinado momento (SANGWAN *et al.*, 2001; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

De acordo com GONZÁLEZ-LAMOTHE *et al.* (2009), os produtos do metabolismo secundário acumulados pelas plantas podem atuar de duas formas: como “potencializadores” de atividade antibacteriana, favorecendo a atividade de antibióticos, cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos microrganismos; ou como “atenuantes” de virulência, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção.

No século XIX, o empirismo da alquimia suplantado pela química experimental permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas. Esse fato foi um dos fatores determinantes da revolução industrial e tecnológica que desencadeou a produção acelerada de novos medicamentos, tornando disponíveis derivados de plantas mais puros e concentrados que se tornaram as drogas sintéticas, as quais os médicos priorizaram, passando a desconsiderar o papel importante da fitoterapia (SIMÕES *et al.*, 2001).

A indústria farmacêutica reativou o interesse pela busca de substâncias biologicamente ativas na década de 90, porém devido os compostos bioativos isolados de plantas cujas propriedades indicam potencial farmacológico nem sempre resultam na produção de um medicamento, tornando a bioprospecção de metabólitos secundários um mercado de risco. Para aprimorar a pesquisa envolvendo estas substâncias, a indústria farmacêutica tem direcionado o desenvolvimento de novos fármacos a bioensaios com moléculas alvo específicas, amparada pelo conhecimento de alguns mecanismos de ação farmacológica de produtos vegetais (MONTANARI e BOLZANI, 2001; WALSH e FISCHBACH, 2010; PROBST, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde lançou em 2007 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPME) com o intuito de incentivar e proporcionar a população brasileira o acesso seguro e uso racional das plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas são fonte de grande proporção de medicamentos, considerando que um quarto das espécies catalogadas já foram utilizadas para fins medicinais (DHAKAD *et al.*, 2018). Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (CEBALLOS *et al.*, 1993; LIMA, 1996; CUNHA *et al.*, 1995; COWAN, 1999; FARIAS e LIMA, 2000; BELÉM, 2002; MICHELIN *et al.*, 2005).

Os compostos aromáticos voláteis que estão presentes nas plantas originam o produto natural chamado OE pelo metabolismo secundário. As principais famílias de plantas que são reportadas como produtoras de OE são Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Zingiberaceae, Poaceae, Myristicaceae, Piperaceae, dentre outras (SIMÕES *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2013; SARTO e JUNIOR, 2014).

Os OE extraídos de plantas têm sido usados há muitos anos na preservação de alimentos, perfumaria, aromaterapia, especiarias e produtos de higiene bucal devido suas propriedades medicinais (BUCHBAUER, 2000). Estão presentes nas folhas, ramos, raízes, rizomas, sementes, frutos, flores e caule, podendo estar mais concentrados nas estruturas mais verdes das plantas, desempenhando funções necessárias à sobrevivência destas, como a defesa contra microorganismos (SIQUI *et al.*, 2000; BAKKALI *et al.*, 2008).

O baixo peso molecular, constituído na maioria das vezes por moléculas de natureza terpênica com odor agradável e marcante, é uma das características químicas apresentadas pelos OE, sendo comumente extraídos através de arraste a vapor d'água (MORAIS, 2009), pois possuem elevada tensão de vapor em relação a água, o que permite que a pressão do vapor os arraste (VALENTIM e SOARES, 2018). Costumam apresentar-se incolores ou levemente amarelados e pouco estáveis na presença de luz, calor e ar (SIMÕES e SPITZER, 1999; SAITO e SCRAMIN, 2000).

As propriedades apresentadas pelos OE resultam em peculiares vantagens do ponto de vista farmacológico, como por exemplo a volatilidade que pode ser aproveitada em nebulizações ou inalações, o que também facilita que sejam rapidamente eliminados do organismo pelas vias aéreas (BANDONI e CZEPAK, 2008; MACHADO e JUNIOR, 2011). O seu baixo peso molecular, aliado a sua natureza lipofílica, confere-lhes capacidade de rompimento ou penetração da membrana celular causando morte da célula por vazamento do citoplasma ou inibição da biossíntese de DNA (NAZZARO *et al.*, 2017).

A ação antimicrobiana dos OE pode apresentar-se por ações ligadas a interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular da bactéria, aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares, alterações de vários sistemas enzimáticos ou mesmo pela destruição do material genético (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

Quanto as propriedades biológicas dos OE, foram relatadas ação larvicida (RAJKUMAR *et al.*, 2010), atividade antioxidante (WANNES *et al.*, 2010), atividade

analgésica e anti-inflamatória (MENDES *et al.*, 2010), fungicida (CARMO *et al.*, 2008), atividade antitumoral (SILVA *et al.*, 2008) e ação antibacteriana (PELISSARI *et al.*, 2010).

A aplicação dos OE na medicina popular serviu de base para investigações científicas, nas quais são também relatadas dificuldades no desenvolvimento dos experimentos devido as peculiaridades dos óleos como volatilidade, insolubilidade em água e complexidade que interferem diretamente nos resultados (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Os estudos dos componentes dos OE revelam enorme complexidade e diversidade desse grupo de produtos naturais, que normalmente contém mono e sesquiterpenos, fenilpropanos e outros componentes voláteis (FRANZ, 2010).

Os terpenos são descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas incluindo a ação antibacteriana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e atividade antiparasitária (PADUCH *et al.*, 2007).

Os monoterpenos são altamente voláteis, sendo arrastados pelo vapor de água livres de outros componentes, podendo ser utilizados por suas características organolépticas marcantes (BANDONI e CZEPAK, 2008).

Tendo em vista a diversidade de espécies de plantas existente no Brasil, de um total estimado em mais de 50 mil espécies (JBRJ, 2020), estudos de produtos oriundos de plantas trazem a expectativa de encontrar substâncias com propriedades de interesse terapêutico e simultaneamente seletivas para serem usadas em futuras formulações de um produto comercial (FURTADO *et al.*, 2005).

Em 2008, foi fundada a Associação Brasileira de Produtores de Óleos Essenciais (ABRAPOE), com o objetivo de aproximar os produtores de OE e os centros de pesquisa para agregar qualidade ao produto, através de pesquisa e padronização, uma vez que o país é reconhecido mundialmente como produtor de OE (BIZZO *et al.*, 2009).

2.2.1 *Cinnamomum verum* J. Presl. (**canela**)

Canela é uma planta que pertence a família Lauraceae, da divisão Magnoliphyta, e possui média de altura de 10 a 15 metros, com folhas em formato oval, longas e flores de cor esverdeada que formam pequenos maços e possuem odor característico (CASTRO, 2010). É ampla a distribuição das espécies representantes dessa família no planeta nas regiões tropicais e subtropicais, composta de 49 gêneros e 3.000 espécies catalogadas

(CASTRO, 2010). O gênero *Cinnamomum* contém cerca de 250 espécies comumente encontradas em florestas tropicais e planícies de solos bem drenados (JANTAN *et al.*, 2008).

As espécies que compõem a família Lauraceae popularmente apresentam atividade contra sintomas de várias doenças e usos para os mais diversos fins, como perfumaria, condimento, entre outros, sendo o óleo essencial um dos principais produtos empregados para os usos descritos (REYNOLDS, 1993; MARQUES, 2001; CASTRO, 2010). No Brasil existem 12 espécies de *Cinnamomum*, encontradas na forma de árvore ou arbusto, distribuídas nas regiões da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020).

São sinônimos taxonômicos da canela: *Cinnamomum verum*, *Cinnamomum zeylanicum* Blume; *Camphorina cinnamomum* (L.) Farw.; *Cinnamomun alexei* Kosterm; *Cinnamomum aromaticum* J. Graham (SILVA, 2017).

Cascas do caule, folhas, flores são as principais partes de *C. verum* das quais é extraído óleo essencial, ao qual são atribuídas atividades antimicrobiana, antioxidante, inseticida (JOSHI, 2019).

A composição química deste OE varia de acordo com qual parte da planta foi usada para extração, conforme apontam os estudos da análise química do OE obtido das cascas de *C. zeylanicum*, que apontam a presença de transcinamaldeído, este último com interessante propriedade do ponto de vista farmacêutico a partir da interação com Acetil-CoA Carboxilase das bactérias, que as conduz a morte (MEADES *et al.*, 2010; VANGALAPATI *et al.*, 2012). Já aquele proveniente das folhas possui como principal constituinte o eugenol, composto também reportado com diversas atividades biológicas de interesse farmacêutico, dentre eles a atividade antimicrobiana (RAO *et al.*, 2007).

O OE de canela (*C. zeylanicum* Blume – Lauraceae) testado em linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentou controle efetivo do desenvolvimento bacteriano segundo SILVA *et al.* (2009), com maior susceptibilidade pelo *S. aureus*, resultados semelhantes aos obtidos por SCHERER *et al.* (2009).

Também tem sido descrito expressivo potencial antifúngico dos OE de canela (*C. zeylanicum*), limão tahiti (*Citrus aurantifolia*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), piprioca (*Cyperus articulatus*), tomilho branco (*Thymus vulgaris*), canela da china (*Cinnamomum cassia*) frente a *Candida albicans* e *C. tropicalis* (CASTRO e LIMA, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2011).

De maneira geral, a atividade do OE de canela é estudada por diversos autores, demonstrando dentre outras propriedades, ação inibitória e antimicrobiana, englobando bactérias Gram positivas e Gram negativas, como BERALDO *et al.* (2013), estudando o potencial de atividade inibitória do referido OE, relataram inibição em amostras padrão (*American Type Culture Collection-ATCC*) de *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *Lysteria monocytogenes* em concentrações inferiores a 0,02% e atividade bactericida em *L. monocytogenes*. SANTURIO *et al.* (2007) também relataram inibição pelo mesmo OE em 60 amostras distribuídas entre 20 sorovares de *Salmonella enterica* em concentrações de 400 a 3.200 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

A formulação de produtos a partir dos OE de canela representa um desafio devido as características voláteis da substância, porém XU *et al.* (2019), visando reduzir essa volatilidade, realizaram a produção de filme polimérico incorporado com o referido OE e detectaram aumento significativo da eficiência antimicrobiana contra bactérias Gram positiva (*S. aureus*) e Gram negativa (*E. coli*).

Em relação a patente, existe registro de hidrogel de *C. verum* com propriedades antimicrobianas (BR 102018001958 9) (GONZÁLEZ *et al.*, 2018), além de outras que exploram outras propriedades da espécie vinculadas com outras plantas para usos agrícolas (KELLY e LANGAN, 2016), alimentares (SCHEELE, 2011; TRIVEDI e GITTINS, 2012), atividades antitumoral (OLVERA, 2017) e terapias baseadas em ligantes de receptores quimiossensoriais (BARON *et al.*, 2012).

2.2.2 *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (**cravo**)

O *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo-da-índia) é proveniente do craveiro da Índia, uma árvore da família Myrtaceae nativa da Indonésia, perene, com altura que varia de 7 a 13 metros, possui inflorescências que são usadas principalmente como condimento na culinária devido ao seu aroma e sabor marcante (MAZZAFERA, 2003).

Historicamente, o cravo da Índia chegou ao Brasil em 1770 e na década de 2010, o referido país, chegou a ser o 3º maior produtor, tendo colheita de 6 mil toneladas/ano, principalmente nos estados de São Paulo e Bahia (OLIVEIRA *et al.*, 2009, LUTFI e ROQUE, 2014).

Também são atribuídas inúmeras propriedades medicinais ao *S. aromaticum*, sendo utilizado no combate de dor de cabeça, problema de indigestão, tosse, náusea, hipertensão, entre outras, cujos principais constituintes são eugenol, carvacrol, timol e cinamaldeído (CHEN *et al.*, 2016; KHEAWFU *et al.*, 2017; LAKSHMEESHA *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que a mesma planta apresenta os seguintes sinônimos taxonômicos reportados em literatura: *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Caryophyllus aromaticus* (L.), *Myrtus caryophyllus* Spreng. e *Jambosa caryophyllus* Nied. (JESUS e TORELI, 2019).

O OE de *S. aromaticum* é obtido das inflorescências do craveiro da Índia, que podem conter até 18% de óleo essencial, com uso para diversas finalidades, incluindo produtos para higiene bucal, ação antisséptica, analgésica, antifúngica, antialérgica, anticarcinogênica, mutagênica, inseticida e antibacteriana (JIROVETZ *et al.*, 2006). O eugenol é comumente o principal componente isolado do OE de *S. aromaticum*, sendo a ele atribuída a atividade antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2009).

Na Coreia, o cravo foi usado com sucesso na asma e vários distúrbios alérgicos por administração oral (KIM *et al.*, 1998). O OE de *S. aromaticum* (cravo da Índia) apresentou atividade contra fungos isolados de onicomicoses como *C. albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* nos experimentos de SANTOS *et al.* (2012), assim como MARIATH *et al.* (2006) também encontraram inibição de fungos dermatofíticos em concentrações de até 2 % com o mesmo OE.

Dentre os usos do *S. aromaticum*, o uso para obter ação antibacteriana é reportado em literatura (NUNEZ *et al.*, 2001; VELLUTI *et al.*, 2004; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2007; SCHERER *et al.*, 2009).

Sobre patente com o cravo da Índia, existem diversas depositadas considerando vários usos, como composição cosmética para uso tópico de uma mistura de óleos essenciais incluindo o cravo, perfume floral a base do óleo de cravo, lenço umedecido com óleo de cravo, desenvolvimento de inseticida e repelentes, entre outros (AFFONSO *et al.*, 2012).

2.2.3 Ação antibacteriana de óleos essenciais

A ação dos OE nas células bacterianas é principalmente relacionada aos danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (SIKKEMA *et al.*, 1994). Provocam permeabilidade na membrana celular devido a sua natureza lipofílica, acumulando-se na bicamada lipídica (BAKKALI *et al.*, 2008). Os danos estruturais causados à membrana citoplasmática comprometem as suas funções como barreira seletiva, ação enzimática e geração de energia (GILL e HOLLEY, 2006; VALERIANO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem relatado a importância do uso de plantas medicinais como recurso terapêutico desde 1978, recomendando a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso (ALBUQUERQUE, 2018).

O Brasil apresenta uma notória biodiversidade de plantas em seu território, no entanto o seu potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos só foi reconhecido pelo Governo Federal em 2006, por meio da criação da “Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterapia”, cujo objetivo é fomentar pesquisas, desenvolvimento tecnológico e inovação na área de produtos naturais e atender as necessidades epidemiológicas do país, resultando na criação da Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS) em 2009, com uma lista de plantas com potencial para gerar produtos de interesse para a rede pública de saúde (KARPIŃSKI e SZKARADKIEWICZ, 2015).

Os estudos que revelam resistência de microrganismos patógenos às drogas convencionais estimulam a busca por novas alternativas terapêuticas, incentivando principalmente a procura por substâncias naturais com poder antibiótico (SARTO e JUNIOR, 2014). Dessa maneira, existem vários relatos sobre a ação antimicrobiana destes tipos de compostos com resultados interessantes, tais como a inibição observada por BARA e VANETTI (1998) com uso do OE de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em isolados de *S. tryphimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*. COSTA *et al.* (2008) apontaram potencial biológico e toxicidade ativa do OE de canela de cunhã (*Croton zehntneri*) em testes com culturas de *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* e *Streptococcus β -haemolyticus*.

ARAÚJO *et al.* (2004), em experimento para verificar atividade antimicrobiana de OE de 7 plantas medicinais contra bactérias e fungos, observaram que as cepas bacterianas mostraram-se mais resistentes à ação dos OE do que as cepas fúngicas e os OE que obtiveram maior atividade antimicrobiana foram canela (*C. zeylanicum*), erva cidreira (*Lippia alba*) e rabo de raposa (*Conyza bonariensis*).

FREIRE *et al.* (2014) observaram expressiva ação antibacteriana em testes *in vitro* com OE de canela da china (*C. cassia*) e tomilho branco (*T. vulgaris*) frente a amostras padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *S. aureus* (ATCC 25923).

SANTOS *et al.* (2017) constataram a eficácia dos OE de canela, orégano e citronela frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*.

Os compostos isolados presentes como majoritários em OE também tem sido alvo de estudos, como o de SILVA *et al.* (2018), que utilizaram derivados do eugenol,

substância majoritária em OE de cravo, para avaliar a atividade antibacteriana em isolados de bactérias Gram positivas e Gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*) e observaram alta atividade de inibição.

Alguns estudos detectaram ação inibitória de óleos essenciais frente a isolados de *C. diphtheriae*, como MAHOMOODALLY *et al.* (2018) trabalhando com OE extraído de folhas de marmeleiro da Índia, JAYAPAL (2018) com o uso de OE extraído de folhas de manjerição santo e LAZZARABAL-FUENTES *et al.* (2019) utilizando OE de partes aéreas das plantas nativas chilenas rica rica e copa copa, mas ainda existem poucos registros de estudos sobre o potencial antimicrobiano de óleos essenciais contra esse microrganismo (RAPPER e VAN VUUREN, 2020).

2.2.4 Resistência bacteriana e o uso de óleos essenciais

Desde o uso em larga escala de antibióticos, que ocorreu no final da década de 1940, para tratar de doenças bacterianas em humanos, identificou-se seleção e aumento na frequência de resistência bacteriana a esses medicamentos (WOODFOR e LIVERMORE, 2009; CARLET *et al.*, 2012; ANDERSSON e HUGHES, 2017).

Os antibióticos são elementos fundamentais no controle de infecções nas vias respiratórias superior e inferior, o que torna a resistência um fator de risco para aumento da mortalidade, maior tempo de internação dos pacientes e falha clínica no tratamento (VAN *et al.*, 2017; GUITOR e WRIGHT, 2018).

GUITOR e WRIGHT (2018) apontam duas razões para a crise nos antibióticos: a evolução microbiana, resultado da capacidade dos microrganismos em desenvolver mecanismos para sobreviver a pressão seletiva causada pelos fármacos, que diminuiu a sensibilidade em todas as classes de antibióticos para todos os patógenos importantes e a falta de desenvolvimento ou descoberta de novos medicamentos, atribuída a questão do investimento econômico, por ser mais interessante desenvolver fármacos para doenças crônicas do que para aquelas consideradas agudas, culminando na dificuldade em identificar e testar novos medicamentos que sejam seguros.

A resistência bacteriana vem sendo reportada em ritmo crescente nos diferentes patógenos Gram positivos e Gram negativos, representando um grande desafio terapêutico e incerteza quanto ao uso de antimicrobianos no futuro (ROSSI e ANDREAZZI, 2005; CAPURRO, 2020). Já foi relatada a presença de genes de resistência em *C. diphtheriae* para várias classes de antibióticos, bem como genes adicionais encontrados em outras

espécies de *Corynebacterium*, revelando uma dinâmica evolutiva dessa importante característica de interesse clínico (BARRAUD *et al.*, 2011; HENNART *et al.*, 2020).

Durante séculos, as plantas foram usadas para vários propósitos, incluindo o tratamento de doenças infecciosas, o que as coloca em posição de destaque para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Nesse contexto, os óleos essenciais são explorados como substitutos promissores aos medicamentos usados atualmente, com relatos de considerável atividade antimicrobiana, atribuída diretamente a capacidade das plantas em sintetizar substâncias aromáticas, que em sua maioria são fenóis ou derivados substituídos por oxigênio (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017).

As especiarias, além de seu já reconhecido uso como aromatizantes, corantes e conservantes em alimentos, também já foram usadas na medicina popular para tratar diferentes doenças e têm sido alvo de um grande número de estudos *in vitro* que relatam eficácia no combate a doenças antibacterianas e antifúngicas, tanto em extratos como em seus constituintes puros, como óleos essenciais (SOKOVIĆ *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017).

O uso de plantas medicinais e seus produtos derivados como agentes antimicrobianos pode fornecer maior segurança para os usuários e o meio ambiente devido possuir origem natural, resultando em menor risco de aumento da resistência microbiana à sua ação (DAFERERA *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2014).

Os estudos de atuação promissora de OE frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas, que demonstram capacidade de diminuir a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, revelam que pode ocorrer atividade sinérgica entre óleos essenciais e antibióticos comuns ou outros óleos essenciais (BROCHOT *et al.*, 2017; AELENEI *et al.*, 2019; OLIVA *et al.*, 2018; ROSATO *et al.*, 2018).

2.3 *Corynebacterium diphtheriae* E DIFTERIA

O gênero *Corynebacterium* é constituído por variados bacilos Gram positivos, com mais de 163 espécies de corinebactérias descritas, sendo várias relacionadas com a colonização e/ou infecção em humanos e animais (POPOVIC *et al.*, 2000; KAUFMANN *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2011; BADELL *et al.*, 2020). Estão presentes no meio ambiente, além de integrarem a microbiota humana da pele e de mucosas, tidos como comensais, podem se tornar verdadeiros agentes patogênicos em condições especiais (PALÁCIOS *et al.*, 2010; MARTINS, 2014). As bactérias desse gênero apresentam uma camada peptidoglicana ligada covalentemente a uma malha de arabinogalactano, além da presença

de uma camada externa de ácido micólico e alto conteúdo guanina/citosina no genoma (DORELLA *et al.*, 2006; BAIRD e FONTAINE, 2007; SANTANA, 2014).

C. diphtheriae é uma espécie do gênero *Corynebacterium* clinicamente importante, assim nomeada por sua aparência característica em forma de taco na coloração de Gram e sua propensão a formar uma pseudomembrana (SOTO *et al.*, 1994; FUNKE *et al.*, 1997; SALLEB, 2019).

O principal agente etiológico da difteria é o *C. diphtheriae*, que compreende bacilos Gram positivos, pleomórficos, aeróbios, desprovidos de mobilidade e capacidade de esporulação. Esta espécie foi caracterizada em quatro subespécies: *gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti*. Um indivíduo pode abrigar mais de um biovar simultaneamente. Embora clinicamente semelhantes, os biovars podem ser distinguidos com base na morfologia das colônias, hemólise e reações bioquímicas (CLARRIDGE e SPRIGEL, 1995; FUNKE *et al.*, 1997; FUNKE e BERNARD, 2007).

Dentre os principais fatores de virulência de *C. diphtheriae* estão: a produção de toxina diftérica (TD), um polipeptídeo de aproximadamente 59 kDa, cujo efeito citotóxico provoca a inibição da síntese proteica e tem como alvo as células do miocárdio, sistema nervoso, rins e suprarrenais; a adesividade do bacilo diftérico, que lhe confere capacidade de adesão em superfície celular ou inerte, propiciando a formação de biofilme que contribuem para a manutenção e proliferação do microrganismo no ambiente e no hospedeiro (HOLMES, 2000; HIRATA Jr *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2015).

Outro principal mecanismo de virulência é captação de ferro das células do hospedeiro, que lhe confere sucesso no processo infeccioso e ainda controla a expressão de outros fatores de virulência (HOLMES, 2000; HIRATA Jr *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2015).

As análises genômicas identificaram potenciais genes envolvidos nas características adesivas, invasivas e de virulência de cepas de *C. diphtheriae*, mas também destacaram o impacto da transferência horizontal de genes na aquisição destes (SANGAL e HOSKISSON, 2016).

As manifestações locais e sistêmicas da difteria são em geral relacionadas à ação da toxina diftérica (TD), que é o fator de virulência mais bem estudado do *C. diphtheriae* (PAPPENHEIMER, 1993; WANG e LONDON, 2009; MAN *et al.*, 2010) e é considerada principal fator responsável, não só pela destruição celular, mas também pelo acúmulo de fibrina (MORTIMER e WHARTON, 1999), sugerindo que a presença de bacteriófagos

que transportam o gene *tox* é essencial para a formação de pseudomembrana (SABBADINI *et al.*, 2010).

A imunidade adquirida contra a difteria é obtida através da vacinação com o toxoide diftérico presente na vacina tríplice bacteriana contra tétano, difteria e coqueluche (DTP) (BONNET e BEGG, 1999; GALAZKA, 2000). A vacinação traz bons prognósticos para a população e está no calendário regular de imunização da maioria dos países (BITRAGUNTA *et al.*, 2010).

Após três décadas de controle, a difteria ressurgiu de maneira epidêmica no Leste Europeu, principalmente na Rússia e na Ucrânia, com aproximadamente 157.000 casos e 5.000 óbitos reportados no período de 1990 a 1999 (GALAZKA e ROBERTSON, 1995; REY *et al.*, 1996; GALAZKA, 2000). Foi inicialmente caracterizada por uma mudança na faixa etária acometida, que passou a ser constituída por indivíduos acima de 15 anos de idade (REY *et al.*, 1996; DITTMAN *et al.*, 2000). Um número elevado (30%) de casos graves ou fatais também foi observado em indivíduos vacinados (DITTMAN *et al.*, 2000).

Entre os anos 2010 e 2011, ocorreram 6.608 casos de difteria clássica na Índia (onde a cobertura vacinal é inferior a 80%), 1.238 na Indonésia, 240 no Nepal, 238 no Iran e 194 no Sudão, além de centenas de casos em outros países (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2011). Nos anos de 2015 e 2016, mais 10 casos foram confirmados na Índia no distrito de Dibrugarh, sendo que os pacientes se encontravam não imunizados ou parcialmente imunizados (DAS *et al.*, 2016).

No Brasil, entre 1969 e 1985, a difteria atingiu principalmente crianças com idade igual ou inferior a 10 anos, no Rio de Janeiro (FERREIRA, 1990). Ocorreram casos de difteria em quase todos os estados do território brasileiro, incluindo o Maranhão (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2001; BRASIL, 2007). Neste último estado, em 2010, houve um surto epidêmico de difteria por *C. diphtheriae*, o qual atingiu três municípios (Jatobá, Colinas e São Domingos). Foram confirmados 27 casos, a maioria em crianças e adolescentes entre a faixa etária de 7 a 15 anos, e três óbitos foram relatados, sendo que dois destes indivíduos tinham histórico de vacinação completa. A subespécie isolada nesse surto foi *intermedius* (SANTOS *et al.*, 2015).

2.4 BIOFILME BACTERIANO

Comunidades microbianas são capazes de aderir a substâncias bióticas ou abióticas formando biofilme no qual suas células estão envoltas em uma matriz por elas produzida,

constituindo-se em fator de importância clínica, pois dificulta o tratamento de várias infecções bacterianas (COSTERTON *et al.*, 1999; HALL e MAH, 2017).

A matriz de biofilmes bacterianos é composta por substâncias poliméricas como os polissacarídeos, poliamidas, poliésteres e polifosfatos (MORADALI *et al.*, 2017; MORADALI e REHM, 2020). Essas substâncias podem agir como moléculas de armazenamento em torno das células, possuindo diversas funções biológicas, como adesão, armazenamento de energia ou proteção e propriedades físico-químicas importantes para o comportamento bacteriano, como translocação, fixação em superfícies bióticas ou abióticas, invasão, proteção e persistência, sendo sua síntese regulada em resposta a estímulos ambientais (REHM, 2010; MORADALI e REHM, 2020).

As infecções baseadas em biofilme são difíceis de erradicar devido à sua capacidade de suportar concentrações de antibióticos que normalmente matariam células planctônicas de natação livre. Como consequência, biofilmes bacterianos contribuem significativamente para a morbimortalidade em pacientes (HALL e MAH, 2017).

A implantação de dispositivos médicos em pacientes os torna vulneráveis ao desenvolvimento de infecção com formação de biofilme, pois as células do tecido hospedeiro e as bactérias patogênicas competem para ocupar a superfície destes e, se as bactérias conseguem aderir e ocupar essa superfície, iniciam a formação do biofilme, alterando suas propriedades e obtendo resistência aos antibióticos (DEL POZO e PATEL, 2007; DEL POZO *et al.*, 2009; DEL POZO *et al.*, 2014; DEL POZO, 2017).

Esse processo de formação de biofilme é um fator de preocupação para os profissionais da saúde, pois nos últimos anos observa-se aumento acentuado de pacientes recebendo implantes de dispositivos médicos. Além disso, os biofilmes também podem causar infecções subclínicas, provocando mau funcionamento ou degradação química de biomateriais (DEL POZO e PATEL, 2007; DEL POZO *et al.*, 2009; DEL POZO *et al.*, 2014; DEL POZO, 2017).

No estágio final do desenvolvimento do biofilme ocorre a dispersão de células, etapa necessária para as bactérias deixarem a macroestrutura que a sustentam, em busca de alcançar novos locais no hospedeiro. Essa fase é caracterizada por uma alteração fenotípica ativa que envolve detecção de sinais ambientais, os quais culminam na liberação de células individuais e/ou agregados multicelulares (MCDUGALD *et al.*, 2012; PETROVA; SAUER, 2012; GUILHEN *et al.*, 2017).

Apesar do uso de antibióticos, como imipenem, colistina e similares, ter a capacidade de reduzir os biofilmes, em geral demonstram-se incapazes de eliminá-los

completamente, pois implicam em efeitos tóxicos e colaterais severos, de maneira que não é possível atingir a concentração mínima de antibiótico *in vivo* (ROY *et al.*, 2018).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o fenótipo hipermutador do biofilme não está apenas associado a mecanismos adaptativos ao ambiente, mas também ao desenvolvimento de resistência durante a exposição aos antibióticos, revelando múltiplos mecanismos de tolerância (fenotípicos e genéticos) (MACIÀ *et al.*, 2006; PLASENCIA *et al.*, 2007; MENA *et al.*, 2008; CIOFU *et al.*, 2017). Devido a essa natureza multifatorial da tolerância do biofilme aos antibióticos, é necessária uma combinação de diferentes estratégias para melhorar o efeito dos medicamentos de escolha e do sistema imunológico (MACIÀ *et al.*, 2006; PLASENCIA *et al.*, 2007; MENA *et al.*, 2008; CIOFU *et al.*, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DOS MATERIAIS VEGETAIS E OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os materiais vegetais tiveram origens distintas. As folhas de *C. verum* (canela) foram coletadas no município de Paço do Lumiar (MA), com coordenadas geográficas 2°32'02.1" Sul, 44°11'12.6" Oeste, de acordo com as normas estabelecidas na literatura, em quantidade adequada para a realização das análises químicas e biológicas (HARBONE, 1984) e submetidas a secagem em estufa a 45°C por 24 horas. As inflorescências de *S. aromaticum* (cravos da índia) foram adquiridas já desidratadas no Mercado Central, estabelecimento comercial popular de São Luís (MA).

Para a extração dos OE, ambos produtos vegetais secos foram triturados em moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE-340) e pesado aproximadamente 400 gramas de cada material vegetal. Separadamente, o material vegetal previamente pesado adicionado a 4.000 mL de água destilada, foi submetido ao Sistema Extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 6.000 mL e uma manta aquecedora como fonte geradora de calor. Em seguida, manteve-se a manta elétrica à temperatura de 100°C por 4 horas. O óleo obtido foi seco pelo método de percolação em sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), as alíquotas foram armazenadas em tubos de vidro sob refrigeração para evitar possíveis perdas voláteis. O rendimento foi calculado através da fórmula $R\% = (V.d/m) \times 100$, em que V = volume total de óleo extraído (mL), d = densidade do óleo (g/mL) e m = massa da espécie vegetal seca (g) (RABÊLO, 2010).

3.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A análise dos constituintes voláteis foi realizada em cromatógrafo a gás (SHIMADZU), acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050A equipado com coluna capilar fenilpolisifenileno-siloxano de BPX 5%. Utilizou-se o hélio de alta pureza (99,9995%) como gás de arraste. A temperatura do injetor e interface do GC com detector seletivo foi mantida a 280°C com vazão na coluna capilar (60 m x 0,25 mm x 0,25µm) de 2,7 mL min⁻¹, programada para operar a 50°C. Para as análises, alíquotas dos OE foram

injetadas com um volume de 1 µL em acetato de etila (0,0010 g de óleo essencial em 1 mL de acetato de etila de grau cromatográfico) nas seguintes condições: modo split com pressão de coluna de 150 kPa, velocidade linear de 59,1 m.s⁻¹, com vazão total de gás carreador de 30 mL min⁻¹ no impacto de elétrons em split 1:10, com gradiente de temperatura 40°C (5 min), 240°C (4°C min⁻¹); 240-300°C (8°C min⁻¹, 7 min); t = 60 minutos. Em MS, o modo de varredura de 0,5 segundos para varredura, faixa de massa de 400-500 Daltons, linha de transferência a 280°C e filamento (off) 0 a 4s (GOMES *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2020). Identificamos os componentes do óleo a partir da comparação destes com os dados obtidos de substâncias autênticas existentes nas bibliotecas de referência Wiley 229 Spectroteca e Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System (AMSDIS) (MEYER *et al.*, 1982).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DE AMÔNIO

Para avaliar a formação do complexo fosfomolibdênio, preparou-se um reativo cuja composição fundamenta-se em uma solução com fosfato de sódio 0,1 mol/L (28 mL), molibdato de amônio 0,03 mol/L (12 mL) e ácido sulfúrico 3 mol/L (20 mL), completando-se com água para 100 mL.

As soluções dos OE e do controle de máxima atividade antioxidante (ácido ascórbico) foram preparadas na concentração de 200 µg/mL. Posteriormente, uma alíquota de 0,4 mL destes, na referida concentração, foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL do reativo. A solução de controle de mínima atividade antioxidante foi preparada a partir de 0,4 mL de água destilada adicionada a 4 mL do reativo. Os tubos hermeticamente fechados foram incubados por 90 minutos a 95°C e depois resfriados até temperatura ambiente. Em seguida, realizaram-se as leituras das absorvâncias a 695 nm no espectrofotômetro (MICROPLATE READER, modelo TP-READER NM).

A ação antioxidante das amostras foi expressa em relação ao ácido ascórbico, considerando que o valor de sua absorvância corresponde a 100 % de ação antioxidante. A porcentagem da atividade antioxidante (%AA) foi calculada pela equação: %AA = $\frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{padrão} - A_{branco}} \times 100$, onde $A_{amostra}$ é a absorvância de cada amostra, A_{branco} é a absorvância do branco e $A_{padrão}$ é a absorvância do padrão (ácido ascórbico) (PRIETO *et al.*, 1999; EMERENCIANO *et al.*, 2015). As análises foram feitas em duplicata por duas vezes.

3.4 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O trabalho seguiu os preceitos éticos estabelecidos pela Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, que trata de pesquisas que envolvem direta ou indiretamente seres humanos. A utilização de hemácias humanas nos experimentos de hemólise e citotoxicidade foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade CEUMA, sob o parecer de nº 1.732.522, de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008.

Para a avaliação da atividade hemolítica dos OE, foram obtidas hemácias de voluntário saudável sem histórico recente de uso de antibióticos e/ou drogas anti-inflamatórias para doenças infecciosas e/ou inflamatórias por 3 semanas antes da coleta da amostra sanguínea, que foi realizada com sistema a vácuo. Uma alíquota de 4 mL do sangue foi lavada com solução salina (0,9% p/v, NaCl) por centrifugação a 3.000 rpm, durante 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Os eritrócitos sedimentados no tubo foram diluídos em solução salina até obtenção de uma suspensão a 1% (v/v). Alíquotas iguais de suspensão de eritrócitos e OE em diferentes concentrações (1.000, 500, 250, 125 e 50 µg/mL), foram misturadas e incubadas a 37°C, com agitação contínua, durante 60 minutos. As soluções foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos e, a partir do fluido sobrenadante, transferiu-se 100 µL para uma microplaca para aferir a absorbância no espectrofotômetro a 550 nm (MICROPLATE READER, modelo TP-READER NM). Para eliminar a interferência do OE na absorbância, foram preparadas soluções controle sem a adição de hemácias (solução controle branco). As suspensões de hemácias acrescidas de solução salina e de água destilada foram, respectivamente, os controles hemolíticos de mínimo e máximo. O experimento foi realizado em duplicata, por duas vezes (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE CONTRA *Artemia salina*

Ovos de *A. salina* adquiridos em comércio de piscicultura ornamental na cidade de São Luís (MA), Brasil, foram submetidos a condições ideais para eclosão e posterior desenvolvimento das larvas até alcançarem o estágio de metanúplio (24 horas); estas foram transferidas para recipientes plásticos, separando-se grupos de 10 indivíduos para cada receptáculo. O experimento foi realizado em duplicata e em cada receptáculo adicionou-se solução salina (0,9% p/v, NaCl) e alíquotas dos OE nas concentrações de 10, 100 e 1.000 µg/mL. Como controle positivo, utilizou-se 10 µg/mL de solução dicromato de

potássio ($K_2Cr_2O_7$) em salina. Solução de DMSO em salina a 0,01% foi utilizada como controle negativo. Após 24 horas de contato, foram contados os microcrustáceos mortos. O resultado avaliou a concentração letal média (CL_{50}), sendo considerado “tóxico” se a $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e “não tóxico” se a $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (MEYER et al., 1982; ROSA et al., 2016).

3.6 BIOENSAIO COM LARVAS DE *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* foram mantidas em recipiente plástico, contendo substrato apropriado, fechado com tampa perfurada revestida internamente por tecido fino, em temperatura aproximada de 15°C. Estas foram selecionadas de modo que tivessem aparência uniforme em tamanho e posteriormente higienizadas com álcool 70%. Em seguida, foram distribuídas em grupos experimentais em placas de Petri descartáveis e estéreis, contendo 10 indivíduos em cada grupo, correspondentes as concentrações de 1.000 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ dos OE e controle. Os grupos receberam, através de injeção, 10 μL dos OE previamente diluídos em DMSO (0,01%) nas concentrações trabalhadas ou somente salina (0,9% p/v, NaCl) para o grupo controle, na segunda esternite visível acima da cauda, na porção ventral, sendo posteriormente mantidas a 37°C. A taxa de sobrevivência das larvas foi observada em intervalos de 24 horas por 5 dias após a administração dos OE, considerando larvas mortas aquelas que visualmente apresentam melanização e ausência de resposta a estímulos físicos, tocando-as suavemente (FERRO et al., 2016). Os experimentos foram realizados duas vezes em duplicata.

3.7 ORIGEM E CULTIVO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

Para os experimentos com uso de amostras bacterianas foram utilizadas 5 *C. diphtheriae* isoladas de nasofaringe durante surto de difteria ocorrido no Maranhão, Brasil (SANTOS et al., 2015) e duas amostras padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), conforme Tabela 1. Todas as amostras foram cedidas pelo Laboratório de Difteria e corinebactérias de Importância Médica da UERJ (LDCIC-UERJ), que estão estocadas em meio GC-glicerol 20% no Laboratório de Doenças Bacterianas Respiratórias e Sistêmicas (LDBRS) da Universidade Ceuma e foram cultivadas por 24-48h/37°C em meio *Trypticase Soy Broth* (TSB), *Trypticase Soy Agar* (TSA) e/ou ágar sangue de carneiro e ágar chocolate telurito (SABBADINI et al., 2010).

Tabela 1 - Isolados de *Corynebacterium diphtheriae* utilizados no estudo.

Isolados <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Subespécie	Origem	Toxinogenicidade
MA 19	<i>Intermedius</i>	Difteria/Faringe Maranhão/Brasil	+
MA 23	<i>Intermedius</i>	Difteria/Faringe Maranhão/Brasil	+
MA 52	<i>Intermedius</i>	Difteria/Faringe Maranhão/Brasil	+
MA 131	<i>Intermedius</i>	Difteria/Faringe Maranhão/Brasil	+
MA 150	<i>Intermedius</i>	Difteria/Faringe Maranhão/Brasil	+
*ATCC 27010/ C7s	<i>Mitis</i>	Difteria/Orofaringe Estados Unidos da América	-
ATCC 27012	<i>Mitis</i>	Difteria/Orofaringe Estados Unidos da América	+

MA: Maranhão; ATCC: *American Type Culture Collection*; *: Amostras homólogas; -: Não produtor de toxina diftérica; +: Produtor de toxina diftérica

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Ensaio de microdiluição foram realizados a partir de inóculos de suspensões microbianas em salina ($1,5 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹, que corresponde a 0,5 da escala de McFarland), diluídas em meio de cultura caldo *Mueller Hinton* (MH) (Difco) na proporção 1:10 e transferidas para poços de microplaca de 96 poços contendo os OE diluídos seriadamente a partir da concentração de 3.000 µg/mL, na proporção de 1:2. As microplacas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A revelação do ensaio foi feita pela adição de 30 µL de resazurina (0,03%) em cada poço da microplaca, a qual foi novamente incubada por 30 minutos. Os controles do experimento foram o negativo, contendo apenas meio de cultura acrescido de suspensão bacteriana, e o positivo, constituído de meio de cultura com cloranfenicol (30 µg) ao qual foi incluída a suspensão bacteriana. A CIM foi a menor concentração dos OE na qual não se detectou mudança de coloração do azul para o róseo (PALOMINO *et al.*, 2002), denotando ausência de crescimento bacteriano. O experimento

foi realizado por duas vezes, em triplicata. A classificação da atividade antimicrobiana dos OE seguiu a proposta de ALIGIANNIS *et al.* (2001), na qual é considerada forte se a CIM estiver nas concentrações de 50 a 500 µg/mL, moderada com CIM entre 600 e 1.500 µg/mL e fraca com CIM acima de 1.500 µg/mL.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para a determinação da CBM, uma alíquota de 10 µL dos poços que não apresentaram crescimento microbiano visível no experimento de CIM foi retirada e inoculada em placas de ágar MH. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A CBM foi a menor concentração dos OE na qual não ocorreu crescimento bacteriano sobre a superfície do meio de cultura. Os OE foram considerados agentes bacteriostáticos, quando a razão CBM/CIM > 4, e agentes bactericidas, quando a razão CBM/CIM ≤ 4. Os ensaios foram realizados em duplicata, por duas vezes (KOO *et al.*, 2000; GATSING *et al.*, 2006; SANTURIO *et al.*, 2007).

3.10 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA MORFOLOGIA E AGREGAÇÃO BACTERIANA

Microrganismos na densidade óptica (DO) 0,3 em comprimento de onda de 570 nm, cultivados na presença de ½ da CIM do OE que apresentou CIM e CBM, por 24 e 48 horas, foram corados pelo método de Gram e observados em microscópio óptico sob objetiva de imersão. A fim de se verificar a ocorrência de alterações na morfologia dos microrganismos e o efeito na agregação bacteriana, foram considerados 10 campos contendo entre 40 e 70 microrganismos. O experimento foi realizado por duas vezes (GOMES *et al.*, 2013).

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

A formação de biofilme foi determinada em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (STEPANOVIC *et al.*, 2000). Alíquotas de suspensões bacterianas em meio de cultura caldo TSB, na DO de 0,2 aferida em comprimento de onda de 570 nm, foram dispostas em microplacas de 96 poços, juntamente com o OE que apresentou CIM e CBM na concentração de ½ da CIM. Poços controle, não contendo o OE

(controle negativo) e contendo dimetilsulfóxido (DMSO, controle positivo) a 1% também foram preparados. Após incubação por 48 horas a 37°C, aspirou-se cuidadosamente o conteúdo dos poços, que foram lavados com solução salina 0,9%. Houve então, para os microrganismos que permaneceram aderidos, fixação com metanol a 99% e coloração com cristal violeta a 2%. O corante foi solubilizado com 160 µL de ácido acético glacial e a DO da solução foi aferida em comprimento de onda de 550 nm (MICROPLATE READER, modelo TP-READER NM) (GOMES *et al.*, 2013).

A formação de biofilme foi classificada qualitativamente conforme categorias previamente propostas por STEPANOVIC *et al.* (2000) e SOUZA *et al.* (2015) em: não aderentes (-), quando $DO \leq DO_c$ (Controle); fracamente aderentes (+), quando $DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$; moderadamente aderentes (++) , quando $2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$; fortemente aderentes (+++), quando $4 \times DO_c \leq DO$. O experimento foi realizado por duas vezes, em triplicata.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises de dados foram realizadas com o programa *Graphpad Prism 6*. Os dados dos testes de concentração letal e toxicidade foram expressos como média \pm desvio-padrão. Nas análises dos dados obtidos nos testes de sobrevivência de *T. molitor* e atividade antibiofilme, para verificar as diferenças entre os grupos, considerou-se como significativo $p < 0,05$. A curva de sobrevivência no ensaio com as larvas de *T. molitor* foi obtida através da aplicação dos testes de Kaplan-Meier, analisando os resultados com o teste Log-Rank (Mantel-Cox). Para os dados obtidos do teste de biofilme aplicou-se o teste de *Tukey*.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As folhas de *C. verum* (canela) tiveram 2% de rendimento na produção de óleo essencial. Na Tabela 2, é possível observar que a análise cromatográfica identificou 21 componentes, sendo o eugenol (72,1%) o componente majoritário, seguido do α -felandreno (6,89%) e do O-cimeno (3,56%).

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial extraído de folhas de *Cinnamomum verum* J. Presl. (canela).

Pico	Área (%)	Composto identificado
1	0.46	α Tujeno
2	2.66	α Pineno
3	0.65	Canfeno
4	0.76	β Pineno
5	0.44	β Mirceno
6	6.89	α Felandreno
7	0.33	3Careno
8	3.56	o-Cimeno
9	0.82	Limoneno
10	0.64	1,8- Cineol
11	0.45	Terpinoleno
12	1.43	Linalol
13	0.41	α Terpineol
14	0.44	E- Cinamaldeído
15	72.1	Eugenol
16	3.15	β Cariofileno
17	0.54	α Humuleno
18	1.22	Não identificado
19	0.31	Espatulenol
20	0.24	Óxido de cariofileno
21	2.48	Benzoato de benzila

Fonte: O autor, 2019

O OE de *S. aromaticum* (cravo) apresentou rendimento de 3,64%. Na Tabela 3 verifica-se a identificação de 15 componentes, sendo os majoritários o eugenol (44,29%), o cariofileno (4,87%) e o α -humuleno (4,87%).

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial extraído de inflorescências desidratadas de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (cravo).

Pico	Área (%)	Composto identificado
1	44.29	Eugenol
2	0.72	Copaeno
3	0.02	Óxido de Cariofileno
4	0.04	Isocariofileno
5	4.87	Cariofileno
6	0.03	α -Cebebeno
7	4.87	α -Humuleno
8	0.16	γ - Muuroleno
9	0.10	α -Farneseno
10	0.11	Panaxene
11	0.10	β -Patchoulane
12	0.08	1- (2-bromoetil) Adamantano
13	0.29	Δ -Cadineno
14	0.25	Acetato de Eugenol
15	0.15	Hidroazuleno

Fonte: O autor, 2019

4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO DE AMÔNIO

A análise da atividade antioxidante do OE de *C. verum* demonstrou redução do radical fosfomolibdênio em 21,5% e o OE de *S. aromaticum* em 40,6%.

4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A avaliação da toxicidade sobre as hemácias humanas pelos OE revelou que concentração acima de $225 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ do OE de *C. verum* é necessária para hemolisar 50% das hemácias, assim como para o OE de *S. aromaticum* é de $514 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

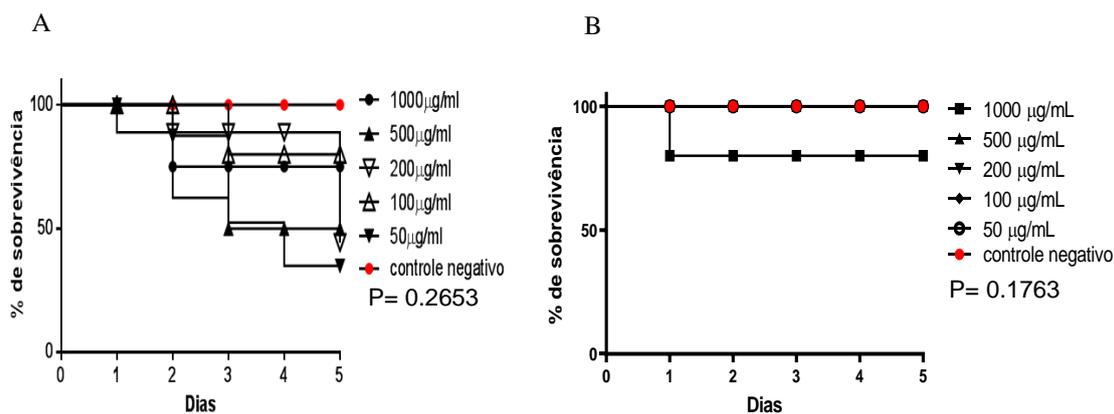
4.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE CONTRA *Artemia salina*

A avaliação preliminar da toxicidade dos OE contra *A. salina* demonstrou que para o OE de *C. verum* a concentração letal para 50% dos microcrustáceos (CL_{50}) foi de $1,37 \pm 3,24 \mu\text{g/mL}$, enquanto que para o óleo de *S. aromaticum* apresentou CL_{50} de $377,25 \pm 3,90 \mu\text{g/mL}$.

4.5 BIOENSAIO COM LARVAS DE *Tenebrio molitor*

A média de sobrevivência das larvas de *T. molitor* após a administração do OE de *C. verum* em cinco concentrações diferentes foi de 56,88%, já com o de *S. aromaticum* a taxa foi de 80% (Figura 1).

Figura 1 – Taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após inoculação dos óleos essenciais de *Cinnamomum verum* J. Presl. (A) e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (B).



Fonte: O autor (2019)

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA

Analisando o potencial de inibição dos OE, obteve-se para óleo de *C. verum* inibição em 4 amostras (MA 19, MA 23, MA 52, MA 150) dos 7 isolados testados, em concentrações que variaram entre 1.500 e 750 µg/mL. Para o OE de *S. aromaticum*, todos os isolados foram inibidos, com variação de concentrações de 1.000 a 62,5 µg/mL (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações inibitória e bactericida mínimas ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais de *Cinnamomum verum* J. Presl. e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry contra *Corynebacterium diphtheriae*.

<i>C. diphtheriae</i>	Óleos essenciais						
	<i>C. verum</i>			<i>S. aromaticum</i>			Cloranfenicol
	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM
MA 19	1.500	ND	ND	500	ND	ND	0,05
MA 23	1.000	ND	ND	1.000	ND	ND	0,23
MA 52	1.000	ND	ND	250	ND	ND	0,23
MA 131	ND	ND	ND	1.000	ND	ND	0,46
MA 150	750	ND	ND	62,5	2.000	32	0,93
ATCC 27010	ND	ND	ND	1.000	2.000	2	0,23
ATCC 27102	ND	ND	ND	1.000	ND	ND	0,23

CIM: Concentração inibitória mínima. CBM: Concentração bactericida mínima. MA: Maranhão. ATCC: American Type Culture Collection. ND: Não foi possível definir nas concentrações avaliadas. Bacteriostático: razão $\text{CBM/CIM} > 4$. Bactericida: razão $\text{CBM/CIM} \leq 4$. Média aritmética de um experimento realizado em duplicata.

Ainda na Tabela 4, verifica-se que foi possível determinar as concentrações bactericidas mínimas apenas para o OE de *S. aromaticum*, em dois isolados, tendo a relação entre as CBM e CIM indicado atividade bactericida contra ATCC 27010 e bacteriostática na MA 150.

4.7 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL NA MORFOLOGIA BACTERIANA

O OE de *S. aromaticum*, por ter inibido o crescimento de todas as amostras testadas, foi escolhido para realização do estudo do efeito do OE na morfologia da célula bacteriana e observou-se que este não provocou nenhuma mudança significativa, conforme observado com a coloração de Gram em microscopia dos esfregaços, demonstrados na Figura 2.

Figura 2 - Micrografias após coloração pelo método de Gram, de *Corynebacterium diphtheriae* (MA 23) cultivada com óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry.



A: coloração de Gram do isolado após 24h de crescimento em meio com OE em concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM. B: coloração de Gram após 48h de crescimento em meio com OE em concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM. C: coloração de Gram do controle bacteriano, crescido em meio sem OE. MA: Maranhão.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL

Assim como para o experimento do efeito do OE na morfologia bacteriana, a avaliação da atividade do OE na produção do biofilme foi realizada apenas com OE de *S. aromaticum*, por ter inibido todas as amostras de *C. diphtheriae* testadas.

Em relação a classificação qualitativa da produção do biofilme, de acordo com a proposta de Stepanovic *et al.* (2000), observou-se que os isolados MA 23, MA 52, MA 131 e as ATCC 27010 e 27012 formaram biofilme em placa de poliestireno sem o acréscimo do OE de *S. aromaticum* (grupo controle), classificadas todas como fracamente aderente.

Quando na presença do OE de *S. aromaticum*, foi observado que os isolados MA 52, MA 131 e ATCC 27012 mantiveram a mesma classificação de aderência na formação de biofilme daquela do grupo controle. Já os isolados MA 19 e a MA 150 passaram a ter produção classificada como fracamente aderente, alterando o seu perfil de adesão da formação de biofilme. Os isolados MA 23 e a ATCC 27010 tiveram a classificação alterada para não aderente, como se pode observar na Tabela 5.

Tabela 5 - Formação de biofilme mediante influência do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry.

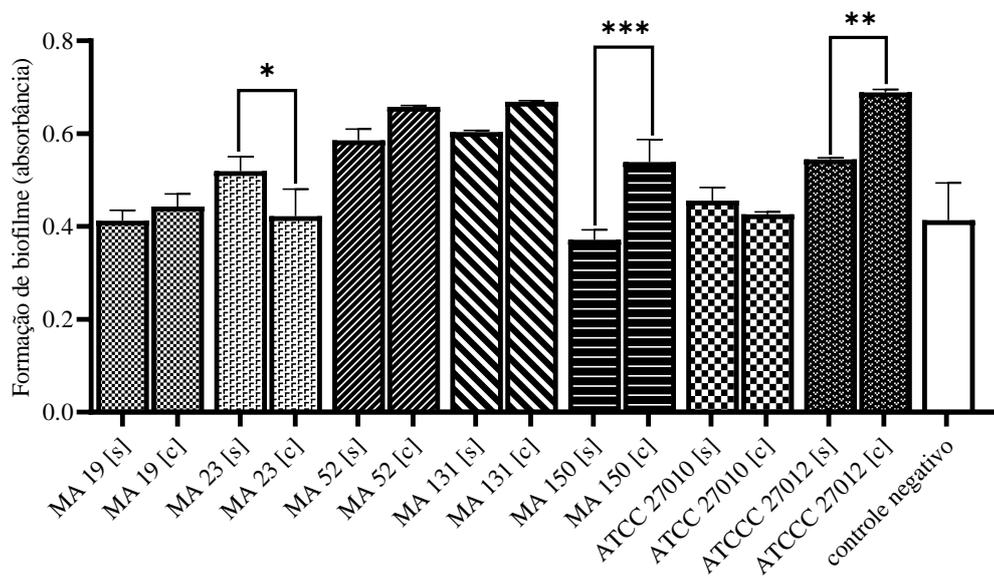
Amostras	Controle	½ da CIM
MA 19	-	+
MA 23	+	-
MA52	+	+
MA 131	+	+
MA 150	-	+
ATCC 27010	+	-
ATCC 27012	+	+

MA: Maranhão. Controle: formação de biofilme sem OE. CIM: Concentração inibitória mínima. Classificação: -: não aderente; +: fracamente aderente; ++: moderadamente aderente; +++: fortemente aderente.

Na Figura 3, analisando-se quantitativamente o biofilme formado, observa-se que a presença o óleo de *S. aromaticum* aumentou a produção do biofilme nas placas de poliestireno em 71, 4% das amostras bacterianas, quando comparadas ao controle (sem adição de OE).

Utilizando o teste de *Tukey*, foi observado que apenas um isolado (MA 23) teve redução significativa na produção de biofilme ($p < 0,05$) com OE na concentração de ½ da CIM, quando se comparou com a formação de biofilme do isolado sem a adição do OE. Todos os demais tiveram incremento na formação de biofilme, porém somente em dois (MA 150 e ATCC 27012) foi significativo estatisticamente.

Figura 3 - Influência do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry na concentração de ½ da CIM sobre a formação de biofilme de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* em placas de poliestireno.



MA: Maranhão. [s]: Formação de biofilme sem adição do óleo; [c]: Formação de biofilme com adição do óleo; *: $p < 0,05$ (Teste de Tukey); **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,0001$. Experimentos foram feitos duas vezes em triplicata. As barras representam media \pm desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais são fonte importante para desenvolvimento de medicamentos comerciais, abrindo possibilidades de descobertas para compostos bioativos que podem ser usados na medicina terapêutica, devido aos seus metabólitos de grande diversidade estrutural (COLEGATE e MOLYNEUX, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2010; DEXHEIMER e POZZOBON, 2017).

Nesta pesquisa, foi realizada a análise cromatográfica dos OE obtido das folhas de canela (*C. verum*) e das flores secas de cravo (*S. aromaticum*), que identificou para ambos os OE o eugenol como o componente majoritário. O eugenol é reportado como tendo ação antiviral, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, antioxidante e anti-inflamatória (HAN e PARKER, 2017; EL-SABER BATIHA *et al.*, 2020), revelando forte potencial farmacológico no combate ou controle a vários tipos de doenças.

KUBATKA *et al.* (2020) encontraram em óleo essencial comercial de canela através de análise de cromatografia gasosa, predominância de cinamaldeído (75%), assim como também outros estudos identificaram a mesma substância como componente majoritário (KALLEL *et al.*, 2019; ZIKELI *et al.*, 2020; MORTAZAVI e ALIAKBARLU, 2019). Essa diferença entre componentes majoritários do OE de canela (*C. verum*) pode ocorrer devido ao material vegetal a partir do qual foi extraído, como apontado por ELCOCKS *et al.* (2019). Estes autores, estudando o efeito bactericida da canela, encontraram diferenças entre os componentes presentes nos OE extraídos a partir da casca e das folhas de canela, sendo que aquele proveniente das cascas teve predominância de cinamaldeído, enquanto que o obtido a partir das folhas, o eugenol.

SILVESTRI *et al.* (2010), ASCENÇÃO e FILHO (2013), BAKOUR *et al.* (2018), GOMES *et al.* (2018) e EL-SABER BATIHA *et al.* (2020) também relataram eugenol como componente majoritário do OE extraído de *S. aromaticum*, corroborando os resultados descritos no presente trabalho.

Compostos que provocam desequilíbrio oxidativo no organismo podem conduzir ao desenvolvimento de doenças como câncer, revelando necessidade da busca por substâncias capazes de combater agente oxidantes (SILVA, 2016; MANTLE *et al.*, 1998; RUBERTO e BARATTA, 2000). Devido a síntese de metabólitos secundários das plantas, óleos essenciais e extratos de origem vegetal são potenciais fontes de antioxidantes (BAKKALI *et al.*, 2008; RAZAVI *et al.*, 2008). Neste estudo, o OE de *C. verum* apresentou baixa

atividade antioxidante (21,5%) em comparação ao controle positivo (ácido ascórbico-100% de atividade antioxidante), enquanto o OE de *S. aromaticum* revelou atividade maior (40,6%), confirmando o potencial antioxidante.

O composto eugenol é relatado como tendo propriedades antioxidantes (DIAS, 2009; BARBOZA *et al.*, 2018); no presente estudo, o OE de *C. verum*, apesar de tê-lo como composto majoritário, apresentou baixa atividade antioxidante e o OE de cravo (*S. aromaticum*) demonstrou maior taxa de atividade antioxidante. Nos estudos de ANDRADE *et al.* (2012) o óleo essencial de casca de canela (*C. verum*) não apresentou atividade antioxidante significativa. O óleo essencial de cravo foi reportado como tendo forte atividade antioxidante por SCHERER *et al.* (2009).

O resultado obtido pode ter ocorrido em virtude da taxa de compostos fenólicos (não foram quantificados neste estudo), que desempenham importante papel na atividade antioxidante e dependem das condições ambientais da planta (HUANG e FRANKEL, 1997; LEE e SHIBAMOTO, 2001). Um possível motivo pelo qual a atividade antioxidante do OE de *C. verum* demonstrou-se abaixo do esperado é a ocorrência de diferenças genéticas das plantas usadas nos trabalhos (SHAN *et al.*, 2005).

A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária constitui-se em sensível indicador de danos provocados por compostos químicos, auxiliando na triagem para testes de citotoxicidade (YAMAGUCHI *et al.*, 2013; SHARMA e SHARMA, 2001). Ensaio hemolítico avaliam a quantificação de hemoglobina liberada na presença de diferentes concentrações do composto estudado (MARYA *et al.*, 2012). A avaliação da toxicidade sobre as hemácias humanas pelos OE utilizados neste estudo revelou atividade hemolítica, de maneira que são necessárias concentrações acima de 200 µg/mL do OE de *C. verum* para hemolisar 50% das hemácias e 500 µg/mL para o OE de *S. aromaticum*.

RANGEL *et al.* (2018) apresentaram resultados que indicam baixa toxicidade do óleo essencial extraído de folha de canela (*C. verum*) em hemácias humanas, necessitando de concentrações acima de 875 µg/mL para lisar de 2 a 8 % de hemácias, também MENDONÇA (2015) trabalhando com óleo essencial comercial de canela e cravo (*S. aromaticum*) observou que apenas em concentrações acima 2.048 µg/mL ocorria hemólise em 3,2% e 1,7% respectivamente.

Em estudo anterior, o eugenol já foi reportado como composto com baixa atividade hemolítica (HE *et al.*, 2007), com 4,4% de hemólise em concentração de 4.000 µg/mL. O OE de *C. verum*, assim como o de *S. aromaticum*, apresentaram baixa atividade hemolítica comparada ao controle de hemólise mínima, resultado já relatado por MENDONÇA (2015)

que obteve baixa toxicidade sobre hemácias humanas utilizando óleos essenciais comerciais de *C. zeylanicum* e *S. aromaticum*.

Observou-se ainda, sobre a capacidade de hemólise dos OE, que as concentrações nas quais ocorreu lise de hemácias estão abaixo das CIM frente a *C. diphtheriae*, indicando que devem ser melhor estudadas as propriedades que sugerem capacidade de uso farmacêutico desses OE para difteria, pois mesmo provocando hemólise em concentrações abaixo da CIM, pode haver modulação de sua ação hemolítica e inibitória através da combinação com antibióticos de escolha para a referida doença ou mesmo em combinação com outros OE (FU *et al.*, 2007; PROBST, 2012).

Ambos os óleos essenciais trabalhados no presente estudo trouxeram CL₅₀ abaixo de 1.000 µg/mL no experimento de letalidade com *A. salina*, valores considerados tóxicos.

O ensaio de toxicidade aguda com *A. salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (SIQUEIRA *et al.*, 1998). A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de repostas biológicas, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER *et al.*, 1982). Apesar desse teste ser um bom parâmetro para indicar toxicidade *in vivo*, existem autores que o correlacionam como indicativo também de atividades antimicrobiana e anticancerígena (KANWAR, 2007; HARADA, 2009; LUNGUINO, 2012; ROSA *et al.*, 2016).

GOMES *et al.* (2019) encontraram resultados semelhantes utilizando OE extraído de folhas de canela (*C. verum*), tendo obtido CL₅₀ em 162,1 µg/mL, e de cravo (*S. aromaticum*), apresentando CL₅₀ de 1 µg/mL. A toxicidade apresentada pelos OE testados para este experimento está relacionada ao eugenol, componente que isoladamente já foi descrito como tendo alta toxicidade, mas também apresentando ação antimicrobiana, antisséptica e antiinflamatória (SHIH *et al.*, 2014; MANRIQUE *et al.*, 2016; HAN e PARKER, 2017), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, que obteve toxicidade para *A. salina* e efeito inibitório nas *C. diphtheriae* testadas.

As taxas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* foram elevadas, quando se utilizou OE de cravo (*S. aromaticum*) em concentração de até 1.000 µg/mL, enquanto que trabalhadas as mesmas concentrações com OE de canela (*C. verum*) teve valor pouco acima de 50%, conforme apresentado na Figura 1.

No Brasil, larvas de *T. molitor* são amplamente utilizadas e comercializadas como ração animal, devido a sua facilidade de manuseio e curto ciclo de vida, o que favorece o uso deste inseto como modelo alternativo para estudos *in vivo* de patogenicidade e de

toxicidade (HAN *et al.*, 2016; McGONIGLE *et al.*, 2016). MARTÍNEZ *et al.* (2018), trabalhando com óleo essencial comercial de canela (*C. verum*) e cravo (*S. aromaticum*), cujo componente majoritário de ambos foi eugenol assim como no presente estudo, buscou encontrar a concentração letal e o tempo letal destes sobre *T. molitor* nos estágios de pupa, larva e adulto e obtiveram resultados distintos, observando maiores taxas de letalidade para o OE de canela do que para o OE de cravo para *T. molitor* em estágio larval, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Os OE apresentaram capacidade de inibição dos isolados de *C. diphtheriae*, sendo que o OE de cravo (*S. aromaticum*) inibiu todos os isolados na concentração média de 559 µg/mL, enquanto que o de canela (*C. verum*) inibiu 57% dos isolados, aproximadamente, em concentração média de 1.062,50 µg/mL (Tabela 4). Não existem relatos publicados quanto a ação de inibição destes OE frente a *C. diphtheriae*, porém tem sido descrito resultados relacionados a capacidade de inibição microbiana destes OE sobre bactérias Gram positivas.

O OE de canela (*C. verum*) é relatado apresentando atividade inibitória frente a isolados de bactérias Gram positivas, como LEBEL *et al.* (2017) descreveram para *Solobacterium moorei* (na concentração de 0,039%), ABBASZADEGAN *et al.* (2016), testando em *Enterococcus faecalis*, observaram inibição efetiva na concentração de 1.000 µg/mL e BARDAJÍ *et al.* (2015) com ação de inibição moderada frente a *Streptococcus mitis* (350 mg/mL), *S. mutans* (200 mg/mL), *Lactobacillus casei* (300 mg/mL).

O OE de cravo (*S. aromaticum*) também tem relatos de atividade inibitória frente a bactérias Gram positivas, como XU *et al.* (2016), que observaram inibição frente a *S. aureus* em concentração de 625.10³ µg/mL. RADÜNZ *et al.* (2019), que obtiveram inibição efetiva frente a *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* na concentração de 304.000 µg/mL e ÁCS *et al.* (2016) que relataram forte inibição frente a *S. aureus* em concentração de 1.000 µg/mL.

A ausência de inibição de alguns isolados pelo OE de canela (*C. verum*), bem como as concentrações maiores para provocar inibição em relação ao OE de cravo (*S. aromaticum*), pode ser atribuída a maior quantidade de eugenol identificada no mesmo. Este composto apresenta maior efeito contra bactérias Gram negativas do que Gram positivas, alterando o funcionamento da membrana plasmática por aumentar a quantidade de gordura saturada C16, C18 e ácidos graxos, e diminuir a quantidade de gordura insaturada C18. Impede também o transporte de íons e adenosina trifosfato (ATP),

atingindo diferentes enzimas bacterianas como a ATPase, carboxilase, amilase e proteases (NAZZARO *et al.*, 2013; JESUS e TORELI, 2019).

A ocorrência dessas divergências quanto aos resultados obtidos nos testes de capacidade de inibição de OE pode ser atribuída às variáveis dos experimentos que afetam os resultados, tais como meio de cultura utilizado, tempo e temperatura de incubação, origem, volatilidade, entre outros. Assim como também pode ter relação com a composição da parede dos microrganismos (presença de ácidos corinemicólicos) testados, que fazem parte do grupo CMN, junto com as micobactérias (AURICCHIO e BACCHI, 2003).

SARTORATTO *et al.* (2004), baseado em estudos sobre materiais de plantas e suas ações inibitórias de ALIGIANNIS *et al.* (2001), propôs a classificação da atividade antimicrobiana de OE a partir dos valores de concentração inibitória, de maneira que a atividade antimicrobiana é considerada forte se a CIM for de 50 a 500 µg/mL, moderada, com CIM entre 600 e 1.500 µg/mL e fraca com CIM acima de 1.500 µg/mL, o que revela atividade antimicrobiana moderada para o OE de *C. verum* e de forte a moderada para o OE de *S. aromaticum* nos isolados testados neste trabalho.

SANTOS *et al.* (2017) avaliando a concentração bactericida mínima de óleo essencial comercial de canela (*C. verum*) frente a *S. aureus* não obtiveram efeito bactericida, apesar de ter observado a inibição, corroborando os dados obtidos no presente estudo, que não obteve efeito bactericida com OE de canela em isolados de *C. diphtheriae*.

Com o OE de cravo (*S. aromaticum*), mesmo demonstrando capacidade de inibição em todos os isolados testados, somente foi observada concentração bactericida mínima para 2 amostras (MA 150 e ATCC 27010), conforme apresentado na Tabela 4, divergindo dos estudos de WONGSAWAN *et al.* (2019) que reportaram atividade bactericida do OE de cravo em todos os 15 isolados de *Streptococcus suis* nos quais testou, em concentração de 0,01%, assim como também no trabalho de OLIVEIRA e SALES (2019), que obtiveram efeito bactericida em *S. aureus* com baixa concentração deste óleo (50 µL/mL) nas amostras testadas.

ALIBI *et al.* (2020) usaram a relação entre concentração bactericida e inibitória mínima para verificar se os óleos de cravo (*S. aromaticum*) e canela (*C. verum*) tinham efeito bacteriostático ou bactericida, tendo observado que ambos foram efetivamente bactericida para isolados de bactérias Gram negativa e Gram positivas, divergindo dos resultados obtidos neste trabalho, cuja análise de mesma relação demonstrou que somente

o OE de cravo foi bactericida em um isolado, com ausência de gene para toxina diftérica, e bacteriostático para um isolado com o referido gene.

As divergências observadas nos estudos de suscetibilidade e a dificuldade em comparar os resultados obtidos em pesquisas que verificam a atividade antimicrobiana de plantas medicinais e seus produtos derivados podem ser atribuídos as mudanças nas condições ambientais no momento da coleta do material vegetal, na parte da planta estudada, nos procedimentos e protocolos seguidos (AURICCHIO e BACCHI, 2003), características físico-químicas dos óleos essenciais (NAKAMURA *et al.*, 1999), reciprocidade de seus constituintes e na forma de extração (MOREIRA *et al.*, 2005; PONCE *et al.*, 2003), entre outros fatores.

O presente estudo verificando ação inibitória em todos os isolados do experimento pelo OE de *S. aromaticum* realizou teste para verificar a influência do óleo na célula bacteriana e também na formação de biofilme.

Não foi possível observar alteração na morfologia celular nem aumento de agregação das células bacterianas usando OE de cravo nas concentrações de ½ da CIM no presente trabalho. A hidrofobicidade dos óleos essenciais permite a interação com lipídios presentes na membrana celular das bactérias, provocando permeabilidade em sua estrutura, podendo conduzir a uma alteração ou mesmo vazamento de íons e outras moléculas celulares (SIKKEMA *et al.*, 1994).

GOMES *et al.* (2013) conseguiram observar alterações na morfologia bacteriana de isolados de *C. diphtheriae*, como filamentação ou aspecto cocoide, na presença dos antibióticos eritromicina e penicilina em concentrações abaixo daquelas consideradas inibitórias. KOVÁCS *et al.* (2016) avaliaram a morfologia de *Campylobacter jejuni* após 2h de tratamento com OE de cravo (*S. aromaticum*) a 330 µg/mL (1,65 x CIM) e verificaram que as células bacterianas encurtaram e apresentaram curvatura menos intensa, além de que demonstraram que os componentes do OE de cravo da Índia influenciaram não apenas na expressão de genes de estresse, mas também na expressão de genes associados à virulência por *C. jejuni*.

Esse contexto indica provável ação dose dependente, além de sugerir que o mecanismo de ação desses OE pode causar dano na membrana celular bacteriana através de extravasamento de componentes celulares, sem alterar a morfologia ou determinar a perda da viabilidade celular da bactéria (NAZZARO *et al.*, 2013).

Neste estudo, o OE de cravo (*S. aromaticum*) em concentração subinibitória alterou o perfil de produção de biofilme dos isolados (Tabela 5), aumentando a produção em 90%

das amostras testadas conforme apresentado na Figura 3. A formação de biofilme constitui um estilo de vida alternativo no qual os microrganismos adotam um comportamento multicelular que facilita e/ou prolonga a sobrevivência em diversos nichos ambientais (KOSTAKIOTI *et al.*, 2013).

A inatividade em ação antibiofilme com uso de OE de cravo e de eugenol frente a *E. coli* K-12 de laboratório já foi reportada (KIM *et al.*, 2016). MILLEZI (2012) relatou que eugenol não demonstrou eficiência na atividade antibiofilme frente a *S. aureus* e *E. coli* tendo sido mais eficiente em células planctônicas, corroborando o presente trabalho que obteve ação inibitória efetiva, mas sem ação significativa de antibiofilme para maioria das amostras testadas. ZHANG *et al.* (2017) conseguiram observar ação de redução de biofilme existente com o eugenol em concentrações duas e quatro vezes acima da CIM frente a *Porphyromonas gingivalis*, não obtendo a mesma capacidade na formação do biofilme.

O incremento de produção de biofilme já foi reportado também por GOMES *et al.* (2013) em estudo com influência de concentrações subinibitórias dos antibióticos eritromicina e penicilina em isolados de *C. diphtheriae*. HATHROUBI *et al.* (2015) observaram que concentrações sub-CIM de penicilina G aumentavam a produção e a autoagregação do biofilme em linhagens de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. O aumento da produção do biofilme em doses sub-CIM dos antibióticos pode estar relacionado com o mecanismo de ação destes, conforme sugerido por KOHANSKI *et al.* (2010) que relataram que os antibióticos com ação na parede celular promovem a maior produção de peptidoglicanos, gerando o aumento na matriz polissacarídica formadora do biofilme.

Em relação aos OE, essa observação do aumento na produção de biofilme pode ser atribuída a desestabilização da parede celular das bactérias, devido aos componentes do óleo em concentrações sub-CIM, estimulando a produção de mais substância polimérica extracelular. SANDASI *et al.* (2008) observaram que os componentes isolados de OE, utilizados separadamente, induziam a formação do biofilme em linhagens de *Listeria monocytogenes*. Estes componentes em baixas concentrações estariam ativando respostas celulares contra o estresse causado por essas moléculas. Com isso, a produção de exopolissacarídeos (EPS) poderia sofrer regulação, com o objetivo de aumentar o biofilme. Adicionalmente, células presentes no biofilme, na presença de um agente antimicrobiano em pequena concentração, reduzem o metabolismo, a utilização de nutrientes e oxigênio. Sendo um dos motivos da maior resistência das células do biofilme aos agentes antibacterianos (MAH e O'TOOLE, 2001).

6 CONCLUSÕES

Os OE de *C. verum* e *S. aromaticum* tiveram o eugenol como composto majoritário, substância já descrita para diversas atuações biológicas, apresentando atividades antioxidantes e hemolíticas baixas. Além disso, foi observada alta toxicidade dos OE frente *A. salina* e baixa para *T. molitor*. Os testes de inibição para ambos resultaram em concentrações inibitórias consideradas baixas, não tendo o OE de canela demonstrado capacidade bactericida. O OE de cravo promoveu o aumento da produção de biofilme por *C. diphtheriae*, em concentrações subinibitórias.

Os resultados obtidos revelam que os OE de canela e cravo tem atividade biologicamente interessantes, com a apresentação de inibição e baixo teor tóxico para hemácias, instigando o desenvolvimento de estudos adicionais e mais específicos para determinar a eficácia desses compostos naturais em combinação com antibióticos convencionais para controlar eficientemente o biofilme formado por bactérias patogênicas, como *C. diphtheriae*.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, A.; DADOLAH, S.; GHOLAMI, A.; MOEIN, M. R.; HAMEDANI, S.; GHASEMI, Y. *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.17, n2, p. 105-113, 2016. doi:10.5005/jp-journals-10024-1811.

ÁCS, K.; BENCSIK, T.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; KOCSIS, B.; HORVÁTH, G. Essential Oils and Their Vapors as Potential Antibacterial Agents against Respiratory Tract Pathogens. **Natura Product Communications**, v. 11, n.11, p.1709-1712, 2016.

ADEGOKE, A. A.; FALEYE, A. C.; SINGH, G.; STENSTRÖM, T. A. Antibiotic Resistant Superbugs: Assessment of the Interrelationship of Occurrence in Clinical Settings and Environmental Niches. **Molecules**, v. 22, n.1, p. 29, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22010029>

AELENEI, P.; RIMBU, C. M.; GUGUIANU, E.; DIMITRIU, G.; APROTOSOAI, A. C.; BREBU, M. *et al.* Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 156-164, 2019. <https://doi.org/10.1111/lam.13100>

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, N. 2, p. 146-161, 2012. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120012>.

AGUILAR-GONZÁLEZ, A. E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, V. 32., p. 181-185, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>.

ALBUQUERQUE, Yasmin Etienne. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais contra micro-organismos orais. 2018.** Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

ALIBI, S.; BEN SELMA, W.; RAMOS-VIVAS, J.; SMACH, M. A.; TOUATI, R.; BOUKADIDA, J. *et al.* Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. **Current Research in Translational Medicine**, v. 68, n. 2, p. 59-66. doi:10.1016/j.retram.2020.01.001. 2020.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Compositions and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 4168-4170, 2001. doi:10.1021/jf001494m.

ANDERSSON, D.; HUGHES, D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. **Microbiology Spectrum**, v.5, n.4, 2017. doi: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2006.08.023.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200025>

ARAÚJO, E. C.; ARAÚJO, E. C.; CORIOLANO, A. T.; OLIVEIRA, R. A. G. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.

ARAÚJO, J. C. L. V de; LIMA, E. de O.; CEBALLOS, B. S. O. de; FREIRE, K. R. de L.; SOUZA, E. L. de; FILHO, L. S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n.1, p.55-64, 2004. <https://doi.org/10.5216/rpt.v33i1.3189>.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n. especial, 2013. <http://dx.doi.org/10.18764/2178-2229.v20n.especialp137-144>

AURICCHIO, M. T; BACCHI E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n. 1, p. 55-61, 2003.

BADELL, E.; HENNART, M.; RODRIGUES, C.; PASSET, V.; DAZAS, M.; PANUNZI, L.; BOUCHEZ, V.; CARMILEROY, A.; TOUBIANA, J.; BRISSE, S. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. **Research in Microbiology**, v: 171, p. 122-127, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.02.003>

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.07.002.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. <https://doi.org/10.116/j.fct.2007.09.106>

BAKOUR, M.; SOULO, N.; HAMMAS, N.; FATEMI, H. E.; ABOULGHAZI, A.; TAROQ, A. *et al.* The Antioxidant Content and Protective Effect of Argan Oil and *Syzygium aromaticum* Essential Oil in Hydrogen Peroxide-Induced

Biochemical and Histological Changes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.2, p. 610, 2018. doi: 10.3390/ijms19020610

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. 1ªed.Vitória, Edufes, 2008. p.624

BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7-8, n. 1, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X1998000100003>.

BARBOZA, J. N.; FILHO, C. S. M. B.; SILVA, R. O.; MEDEIROS, J. V. R.; SOUSA, D. P. An Overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v. 2018, p. 3957262, 2018. doi: 10.1155/2018/3957262

BARDAJÍ, D. K. R.; REIS, E. B.; MEDEIROS, T. C. T.; LUCARINI, R.; CROTTI, A. E. M.; MARTINS, C. H. G. Antibacterial activity of commercially available plant-derived essential oils against oral pathogenic bacteria. **Natural Product Research**, v.30, n.10, p.1178–1181, 2015. doi:10.1080/14786419.2015.1043630

BARON, A. D.; BROWN, M. R.; JONES, C. R.; BEELEY, N. R.; FINEMAN, M. S.; Chemosensory receptor ligand-based therapies. 2012. AU2019253780A1.<https://patents.google.com/patent/AU2019253780A1/en?q=cinnamomum+verum>

BARRAUD, O.; BADELL, E.; DENIS, F.; GUIISO, N.; PLOY, M-C. Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae* mitis. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n. 11, p.2078–2080, 2011.doi: 10.3201/eid1711.110282.

BELÉM, Lindomar de Farias. **Estudo epidemiológico da Pitiríase versicolor no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico**. 2002. Tese (Doutorado no Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

BERALDO, C; SILVA, N.D.; SCANAVACCA, J.; TOSHIMI, J.D.; FERNANDES, A.J; MENGUE, C.F.M. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 436-440, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000400006>.

BERMEJO-MARTIN, J.F.; AVILA-ALONSO, A.; GONZALEZ-RIVERA, M.; TAMAYO, E.; EIROS, J.M.; ALMANSA, R. Postbooster antibodies from humans as source of diphtheria antitoxin. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 7, p. 1265, 2016. doi: 10.3201/eid2207.151670

BITRAGUNTA, S.; MURHEKAR, M.V.; CHAKRAVARTI, A.; VERMA, V.; NAMJOSHI, G. S.; PAREKH, S. S. *et al.* Safety and immunogenicity of single dose of tetanus-diphtheria (Td) vaccine among non/partially immune children against diphtheria and/or tetanus, Hyderabad, India, 2007. **Vaccine**, v.28, n.37, p. 5934-5938, 2010. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.047

BIZZO, H.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>.

BONNET, J.M.; BEGG, N.T. Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control. World Health Organization. **Communicable Disease Public Health**. v. 2, n.4, p. 242-249, 1999.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumo estratégicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. 140 p.

BROCHOT, A.; GUILBOT, A.; HADDIOUI, L.; ROQUES, C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. **Microbiologyopen**, v.6, n.4, p. e00459, 2017. doi: 10.1002/mbo3.459.

BUCHBAUER, G. The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.64-67, 2000.

BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G.; DAVIES, J.; EISESTEIN, B.; HUOVINEN, P. *et al.* Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, n. 12, p.894-896, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>.

CAPURRO, G. “Superbugs” in the Risk Society: Assessing the Reflexive Function of North American Newspaper Coverage of Antimicrobial Resistance. **SAGE Open**, v.10, n.1, p.1-13, 2020. <https://doi.org/10.1177/2158244020901800>

CARLET, J.; JARLIER, V.; HARBARTH, S.; VOSS, A.; GOOSSENS, H.; PITTET, D. Participants of the 3rd World Healthcare-Associated Infections Forum. 2012. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 1, n. 1, p.11, 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-1-11>.

CARMO, E.S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n.2, p. 362-367, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200030>.

CASTRO, Ricardo Dias de. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre a espécie *Candida***. 2010. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre cepas de *Candida*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n.3, p. 341-5, 2011.

CAVALCANTI, Y. W.; de ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida albicans*. **Revista de Odontologia Clínico-Científica**, v. 10, n.3, p.51-6, 2011.

CEBALLOS, B.S.O.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; LIMA, E.O.; URTIGA, R.F. Atividades antimicrobianas de produtos naturais sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas recreacionais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 4-6, 1993.

CHEN, H.; DIAO, J.; LI, Y.; CHEN, Q.; KONG, B. The effectiveness of clove extracts in the inhibition of hydroxyl radical oxidation-induced structural and rheological changes in porcine myofibrillar protein. **Meat Science**, v.111, p.60–66, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.017>

CHEN, X.; REN, L.; LI, M.; QIAN, J.; FAN, J.; DU, B. Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce. *Food Chemistry*, v. 214, p. 432-439, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.101>.

CIOFU, O.; ROJO-MOLINERO, E.; MACIÀ, M.D.; OLIVER, A. Antibiotic treatment of biofilm infections. **APMIS: acta pathologica, microbiológica, et immunologica Scandinavica**, v. 125, n.4, p.304-319, 2017. doi:10.1111/apm.12673.

CIRINO, Isis Caroline da Silva. **Modulação da resistência a drogas por óleos essenciais em linhagens de *Staphylococcus aureus***. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

CLARRIDGE, J.E.; SPRIGEL, C.A. ***Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix* and *Gardnerella***. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology Press, p. 357-373, 1995.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination**. 2 ed. California, CRC press, 2007. p.624

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; CARLA, K.B.; PEREIRA SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R.dos *et al.* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.583-6, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400015>

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, n. 5418, p.1318–22, 1999. doi: 10.1126/science.284.5418.1318

COWAN, M. N. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B; GRUISSEM, W; JONES R (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: Courier Companies, Inc., 2000, p. 1250-318.

CUNHA, G.M.A; MAIA, A.A.B.; NÉRI, D.R.; NOGUEIRA, N.A.P; MATOS, F.J.A. Atividade antimicrobiana de plantas popularmente usadas no Ceará. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76, p.5-6, 1995.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, N.B.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22. p.39-44, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9).

DAS, P.P.; PATGIRI, S.J.; SAIKIA, L.; PAUL, D. Recent Outbreaks of Diphtheria in Dibrugarh District, Assam, India. **Journal of clinical and diagnostic research**, v.10, n.7, p. DR01-DR03, 2016. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20212.8144>.

DEL POZO, J.L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.16, n.1, p. 51–65, 2017. doi:10.1080/14787210.2018.1417036.

DEL POZO, J.L.; ALONSO, M.; DE LA TORRE, M.; AGUINAGA, A. Infections related to totally implantable venous-access ports. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n.8, p. 676, 2014. doi:10.1016/S1473-3099(14)70838-2.

DEL POZO, J.L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.82, n. 2, p. 204–209, 2007. doi:10.1038/sj.clpt.6100247.

DEL POZO, J.L.; TRAN, N.V.; PETTY, P.M.; JOHNSON, C.H.; WALSH, M.F.; BITE, U. *et al.* Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.5, p.1333–1337, 2009. <https://doi.org/10.1128/JCM.00096-09>

DEXHEIMER, G.M.; POZZOBON, A. Atividade biológica de plantas da família Myrtaceae: revisão sistemática de artios entre 1989 e 2015. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 22, n. 2, 2017.

DHAKAD, A.K.; PANDEY, V.V.; BEG, S.; RAWAT, J.M.; SINGH, A. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 3, p.833–848, 2018. doi: 10.1002/jsfa.8600

DIAS, Alexandre Alves de Souza de Oliveira. **Avaliação de modelos animais experimentais no desenvolvimento de doenças invasivas por amostras toxinogênicas e atoxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans***. 2011. Tese (Doutorado)- Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

DIAS, A.A.S.O.; SANTOS, L.S.; SABBADINI, P.S.; SANTOS, C.S.; SILVA JUNIOR, F. C.; NAPOLEÃO, F. *et al.* Difteria pelo *Corynebacterium ulcerans*: uma zoonose

emergente no Brasil e no mundo. **Revista de saúde pública**, v.45, n.6, p.1176-91, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102011000600021>.

DIAS, Vera Lúcia Neves. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.** 2009. Tese (Doutorado), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

DITTMAN, S.; WHARTON, M.; VITEK, C.; CIOTTI, M.; GALAZKA, A.; GUICHARD, S. *et al.* Successful control of epidemic diphtheria in the State of former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p. S10-S22, 2000. <https://doi.org/10.1086/315534>.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005056>.

DUREAB, F.; MÜLLER, O.; JAHN, A. Resurgence of diphtheria in Yemen due to population movement. **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. 1, p.1-2, 2018. <https://doi.org/10.1093/jtm/tay094>.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: PTR**, v.21, n. 4, p.308-323, 2007. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>.

ELCOCKS, E.R.; SPENCER-PHILLIPS, P.T.N.; ADUKWU, E.C. Rapid Bactericidal Effect Of Cinnamon Bark Essential Oil Against *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 1025-1037, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14538>.

EL-SABER BATIHA, G.; ALKAZMI, L.M.; WASEF, L.G.; BESHBIHY, A.M.; NADWA, E.H.; RASHWAN, E.K. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p.202, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10020202>.

EMERENCIANO, D.P.; CRUZ, A.M.F.; PEREIRA, J.D.S.; MOURA, M.F.V.; MACIEL, M.A.M. Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de *Azadirachta Indica* A. Juss. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 8, n. 2, p. 147-156, 2015. doi 10.5935/1808-9569.20130001.

FARIAS, N.M.P.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle da infecção hospitalar. In: Prêmio Jovem Cientista XVI, **Edição Saúde da População, Controle da Infecção Hospitalar**. 2000. Porto Alegre: Fundação Roberto Marinho, p.91-120

FERREIRA, R. **Contribuição ao estudo clínico, epidemiológico e anátomo-patológico da difteria no estado do Rio de Janeiro.** 1990. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

FERRO, T.A.F.; ARAUJO, J.M.M.; PINTO, B.L.S.; SANTOS, J.S.; SOUZA, E.B.; SILVA, B.L.R. *et al.* Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2052, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.02052.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.C.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>.

FORMIGA, L.C.D.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Diphtheriae: current status and laboratory procedures for diagnosis. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 29, n. 3, p. 93-96, 1993.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, n. 3, p. 112-113, 2010. <https://doi.org/10.1002/ffj.1983>.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W. *et al.* Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n. 2, supl. I, p.372-377, 2014. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_053

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 989-994, 2007.

FUNKE, G.; BERNARD, K.A. **Coryneform Gram-positive rods**. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J.A.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 485-514, 2007.

FUNKE, G.; VON GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE, J.E. 3RD; BERNARD, K.A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p.125–159. 1997. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.1.125>.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.843-847, 2005.

GALAZKA, A. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. S2-S9, 2000. <https://doi.org/10.1086/315533>

GALAZKA, A.M.; ROBERTSON, S.E. Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world. **European Journal of Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 107-117, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF01719955>.

GATSING, D.; MBAH, J.A.; GARBA, I.H.; TANE, P.; DJEMGOU, P.; NJI-NKAH, B.F. An antisalmonellal agent from the leaves of *Glossocalyx brevipes* Benth (Monimiaceae).

Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 9, n. 1, p. 84-87, 2006. doi: 10.3923/pjbs.2006.84.87.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n. 1, p. 1-9, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-81, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.

GOMES, D.L.R.; PEIXOTO, R.S.; BARBOSA, E.A.; NAPOLEÃO, F.; SABBADINI, P. S.; DOS SANTOS, K.R. *et al.* SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 754-760, 2013. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.052373-0>.

GOMES, P.R.B.; MOUCHREK FILHO, V.E.; RABÊLO, W.F.; NASCIMENTO, A. A. do; LOUZEIRO, H.C.; LYRA, W.S. *et al.* Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico - Farmacéuticas**, v.47, n.1, p. 37-52, 2018. <https://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n1.70657>

GOMES, P. R. B.; REIS, J. B.; SILVA, J. C. DA; OLIVEIRA, R. W. S. DE; PAULA, M. L. DE; LOUZEIRO, H. C. *et al.* Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say,1818). **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacéuticas**, V. 48, N. 1, p. 122-127, 2019. doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80069>.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M. S.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009. doi: 10.3390/ijms10083400.

GONZÁLEZ, M. E. L.; QUEIROZ, A. A. A.; HELOU, G. M. R.; MARQUES, P. S. Hidrogel de *Cinnamomum zeylanicum* com propriedades antimicrobianas. BR 10 2018 001958 9. 2018. <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1443449&SearchParameter=CINNAMOMUM%20ZEYLANICUM%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>

GUILHEN, C.; FORESTIER, C.; BALESTRINO, D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. **Molecular Microbiology**, v. 105, n. 2, p.188-210, 2017. doi:10.1111/mmi.13698.

GUITOR, A. K.; WRIGHT, G. D. Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections. **Chest**. V.154, n.5, p.1202-1212, 2018. doi:10.1016/j.chest.2018.06.019.

HALL, C.W.; MAH, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276-301, 2017. doi:10.1093/femsre/fux010

HAN, S. R.; LEE, B. S.; JUNQ, K. J.; YU, H. J.; YUN, E. Y.; HWANG, J. S.; MOON, K. S. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 206-212, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.006>

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. **Pharm Biol.** 55(1):1619-1622. 2017 doi: 10.1080/13880209.2017.1314513

HARADA, Thaís Nichikuma. **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2009.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 3ª ed. Springer, London chapman and Hall ltd., 1984. p. 302.

HATHROUBI, S.; FONTAINE-GOSSELIN, S.È.; TREMBLAY, Y.D.N.; LABRIE, J.; JACQUES, M. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 179, p. 277 - 286, 2015. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.06.011.

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.163, n. 3, p.137–143, 2007. doi:10.1007/s11046-007-0097-2.

HENNART, M.; PANUNZI, L.G.; RODRIGUES, C.; GADAY, Q.; BAINES, S. L.; BARROS- PINKELNIG, M. *et al.* Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. **Genome Medicine**, V. 12, n. 107, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00805-7>

HIRATA Jr., R.; NAPOLEÃO, F.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; ANDRADE, A.F.; NAGAO, P.E.; FORMIGA, L.C.D. *et al.* Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 215, n. 1, p.115-119, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11379.x>.

HOLMES, R.K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. **The Journal Infectious Diseases.**, v.181, n. S1, p. 156-167, 2000. <https://doi.org/10.1086/315554>.

HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of tea catechins in diferente lipid systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n. 8, p. 3033-3038, 1997. <https://doi.org/10.1021/jf9609744>.

INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Flora e Funga do Brasil**. 2020. Dataset/Checklist. doi:10.15468/1mtkaw. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 12 Jan 2024.

JANTAN, I.B.; KARIM MOHARAM, B.A.; SANTHANAM, J.; JAMAL, J.A. Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n.6, p. 406-412, 2008. <https://doi.org/10.1080/13880200802055859>.

JAYAPAL, V. Antibacterial effect of essential oil of *Ocimum sanctum* L. by minimal bactericidal concentration, disc diffusion, and gaseous contact exposure methods over 18 bacteria. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, n.5, p. 3049-3055, 2018.

JESUS, G. de; TORELI, J. D. Efeitos Antimicrobianos dos Extratos de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry Aplicados à Saúde, Indústria e Agricultura. **Atas de saúde ambiental**, v. 7, 2019.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidante properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p.6303–6307, 2006. doi: 10.1021/jf060608c.

JOHNY, A.K.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 to antibiotics. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n. 10, p.1165-70, 2010. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0527>

JOSHI, R.K. Chemical disparity in the oil from leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 6, p. 443-449, 2019.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n. 10, p. 813-829, 2003. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>.

KALLEL, I.; HADRIC, B.; GARGOURI, B.; CHAABANE, A.; LASSOUED, S.; GDOURA, R. *et al.* Optimization of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) Essential Oil Extraction: Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Effects. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019. doi:10.1155/2019/6498347.

KANWAR, A.S. Brine shrimp (*Artemia salina*) a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, p. 236-240, 2007.

KARPIŃSKI, T.M.; SZKARADKIEWICZ, A.K. Chlorhexidine-pharmaco-biological activity and application. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1321-1326, 2015.

KAUFMANN, D.; OTT, P.; RUEGG, C. Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans*. **Infection**, v. 30, n. 3, p.168-70, 2002. <https://doi.org/10.1007/s15010-002-3030-0>.

KAWATRA, P.; RAJAGOPALAN, R. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. **Pharmacognosy Research**, v. 7, p. S1–S6, 2015. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.157990>.

KELLY, B. J.; LANGAN, J. P. Method of myceliation of agricultural substates for producing functional foods and nutraceuticals. US9427008B2. 2016. <https://patents.google.com/patent/US9427008B2/en?q=cinnamomum+verum&page=4>

KHEAWFU, K.; PIKULKAEW, S.; HAMAMOTO, H.; SEKIMIZU, K.; OKONOJI, S. Influence of clove oil and eugenol on muscle contraction of silkworm (*Bombyx mori*). **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 64–69, 2017. doi: 10.5582/ddt.2017.01012

KIM, H. M.; LEE, E. H.; HONG, S. H.; SONG, H. J.; SHIN, M. K.; KIM, S. H. *et al.* Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 125–131, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(97\)00143-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(97)00143-8)

KIM, Y.G.; LEE, J.H.; GWON, G.; KIM, S.I.; PARK, J.G.; LEE, J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36377, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36377>

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n.6, p. 423, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R. *et al.* Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans *Streptococci*. **Current Microbiology**. v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000. <https://doi.org/10.1007/s0028400101170>.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>.

KOVÁCS, J.K.; FELSŐ, P.; MAKSZIN, L; PÁPAI, Z.; HORVÁTH, G.; ÁBRAHÁM, H. *et al.* Antimicrobial and virulence modulating effect of clove essential oil on the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Applied and environmental microbiology**, v.82, n. 20, p. 6158-6166, 2016. <https://doi.org/10.1128/AEM.01221-16>.

KUBATKA, P.; KELLO, M.; KAJO, K.; SAMEC, M.; JASEK, K.; VYBOHOVA, D. *et al.* Chemopreventive and Therapeutic Efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. Bark in Experimental Breast Carcinoma: Mechanistic In Vivo and In Vitro Analyses. **Molecules**, v. 25, n.6, p.1399, 2020. doi:10.3390/molecules25061399

LAKSHMEESHA, T.R.; KALAGATUR, N.K.; MUDILI, V.; MOHAN, C.D.; RANGAPPA, S.; PRASAD, B.D. *et al.* Biofabrication of Zinc Oxide Nanoparticles With *Syzygium aromaticum* Flower Buds Extract and Finding Its Novel Application in Controlling the Growth and Mycotoxins of *Fusarium graminearum*. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1244, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01244>

LARRAZABAL-FUENTES, M.; PALMA, J.; PAREDES, A.; MERCADO, A.; NEIRA, I.; LIZAMA, C. *et al.* Chemical composition, antioxidant capacity, toxicity and antibacterial activity of the essential oils from *Acantholippia deserticola* (Phil.) Moldenke (Rica rica) and *Artemisia copa* Phil. (Copa copa) extracted by microwave- assisted hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 142, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111830>

LEBEL, G.; HAAS, B.; ADAM, A. A.; VEILLEUX, M. P.; LAGHA, A. B.; GRENIER, D. Effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark essential oil on the halitosis-associated bacterium *Solobacterium moorei* and in vitro cytotoxicity. **Archives of Oral Biology**, v. 83, p. 97–104, 2017. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.07.005

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et Perry]. **Food Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 443-448, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00161-3).

LEGGET, B. A.; De ZOYSA, A.; ABBOTT, Y. E.; LEONARD, N.; MARKEY, B.; EFSTRATIOU, A. Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse. The **Veterinary Record**, v.166, n. 21, p.656-657, 2010. <https://doi.org/10.1136/vr.b4846>

LIMA, Edeltrudes de Oliveira. **Estudo das dermatofitoses em João Pessoa, Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns de seus agentes isolados**. 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

LIU, Q.; MENG, X.; LI, Y.; ZHAO, C.N.; TANG, G.Y.; LI, H.B. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.6, p. 1283, 2017. doi: 10.3390/ijms18061283.

LOPES, C.R.; ALMASSY JÚNIOR, A.A.; ARMOND, C.; SILVA, F. da; CASALI, V.W. D. **Folhas de chá: Plantas medicinais na terapêutica humana**. 1ª ed. Viçosa, Editora UFV, 2005. p. 233.

LUNGUINO, Daiene Martins. **Estudo da antitumoral e efeitos toxicológicos do óleo essencial das folhas de *Xylopiá frutescens* Aubl. (Annonaceae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2012.

LUTFI, M.; ROQUE, N. F. Eugénias Histories. **Química Nova na Escola**, v. 36, n. 4, p. 252-260, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0104-8899.20140030>

MACHADO, B.F.M.T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos Gerais E Usos Em Terapias Naturais. **Cadernos acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACIÀ, M. D.; BORRELL, N.; SEGURA, M.; GÓMEZ, C.; PÉREZ, J. L.; OLIVER, A. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 975–83, 2006. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.975-983.2006>

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34 - 39, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2).

MAHOMOODALLY, M. F.; MOLLICA, A.; STEFANUCCI, A.; AUMEERUDDY, M. Z.; POORNEEKA, R.; ZENGIN, G. Volatile components, pharmacological profile, and computational studies of essential oil from *Aegle marmelos* (Bael) leaves: A functional approach. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 13–21, 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2018.09.054.

MAN, P.; MONTAGNER, C.; VITRAC, H.; KAVAN, D.; PICHARD, S.; GILLET, D. *et al.* Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. **The FEBS Journal**. v. 277, n. 3, p. 653-662, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07511.x>.

MANRIQUE, Y.; GIBIS, M.; SCHMIDT, H.; WEISS, J. Antimicrobial efficacy of sequentially applied eugenol against food spoilage micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1699– 709, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13294>.

MANTLE, D.; ANDERTON, J. G.; FALKOUS, G.; BARNES, M.; JONES, P.; PERRY, E. K. Comparative Biochemistry and Physiology- Part B: **Biochem Mol Biol**, v. 121, 385, 1998.

MARIATH, I.R.; LIMA, I.O.L.; LIMA, E.O.; BATISTA, L.M. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia aromatica* B. contra fungos dematiáceos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n.3, 2006.

MARQUES, C.A. A importância econômica da família *Lauracea* Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.195-206, 2001.

MARTÍNEZ, L.; PLATA-RUEDA, A.; COLARES, H.; CAMPOS, J.; DOS SANTOS, M.; FERNANDES, F. *et al.* Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 6, p. 716-725, 2018. doi:10.1017/S0007485317001262.

MARTINS, Carlos Alberto de Souza. **Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos causados por *Corynebacterium sp* em pacientes de centro de referência oncológico – Rio de Janeiro, Brasil** /Rio de Janeiro: INCA, 2014. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Laboratório de Difteria e Corinebactérias, Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Faculdade de Ciências Médicas - Rio de Janeiro, 2014.

MARTINS, T. G. T.; EVERTON, G. O.; ROSA, P. V. S.; ARRUDA, M. O.; SOUTO, L. A. da S.; FONSECA, D.; SILVA, I. S. da; COSTA, A. T.; SOUZA, L. dos S.; SOUZA, L. dos S.; ARAÚJO NETO, A. P. de; MOUCHREK FILHO, V. E. Larvicidal activity of the essential oil of *Pimenta dioica* Lindl. front larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e151985518, 2020. doi: 10.33448/rsd-v9i8.5518.

MARYA, C.M.; SATIJA, G.J.A.; NAGPAL, R.; KAPPOR, R.; AHMAD, A. *In vitro* inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice. **International Journal of Dentistry**, 2012. doi:10.1155/2012/759618.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; DAMASCO, P.V.; GOMES, D.L.; MELENDEZ, M.G.; SANTOS, L.S.; MARINELLI, R.S. *et al.* Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1685-8, 2011. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.027870-0>.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; MARQUES, E. A.; PEREIRA, G. A.; MOREIRA, L. O.; PIMENTA, F. P. *et al.* Diphtheria in a vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 236-239, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000300015>.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; HIRATA JÚNIOR, R.; DAMASCO, P.V. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. **Revista Imunizações.**, n. Suppl. 1, p. S2-20, 2011.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 231–238, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042003000200011>

MCDOUGALD, D.; RICE, S.A.; BARRAUD, N.; STEINBERG, P.D.; KJELLEBERG, S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p. 39–50, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>.

MCGONIGLE, J.E.; PURVES, J.; ROLFF, J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 34-38, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.002>.

MEADES, G.J.R.; HENKEN, R.L.; WALDROP, G.L.; RAHMAN, M.M.; GILMAN, S. D.; KAMATOU, G. P. *et al.* Constituents of Cinnamon inhibit bacterial acetyl CoA Carboxylase. **Planta Medica**, v.76, n. 14, p.1570-1575, 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249778>.

MEINEL, D.M.; KUEHL, R.; ZBINDEN, R.; BOSKOVA, V.; GARZONI, C.; FADINI, D. *et al.* Outbreak investigation for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* wound infections in refugees from Northeast Africa and Syria in Switzerland and Germany by

whole genome sequencing. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.08.010>.

MENA, A.; SMITH, E.E.; BURNS, J.L.; SPEERT, D.P.; MOSKOWITZ, S.M.; PEREZ, J. L. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. **Journal of Bacteriology**, v.190, n. 24, p. 7910–7, 2008. <https://doi.org/10.1128/JB.01147-08>.

MENDES, S.S.; BOMFIM, R.R.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ESTEVAM, C.S.E. *et al.* Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.005>.

MENDONÇA, Ana Flávia. **Atividade biológica dos óleos essenciais de plantas sobre isolados do complexo *Cryptococcus neoformans***. 2015. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v.45, n. 5, p. 31-34, 1982. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n 4, p. 316-320, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400010>

MILLEZI, Alessandra Farias. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. Tese (doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, 2012.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 105-11, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100018>

MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p. 39, 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.

MORADALI, M. F., REHM, B. H. A. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. **Nature Reviews Microbiology**, v.18, p.195–210, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0313->

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050- S4063, 2009.

MOREIRA, L.O.; ANDRADE, A.F.; VALE, M.D.; SOUZA, S.M.; HIRATA JR, R.; ASAD, L.M. *et al.* Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates

of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p.5907-5913, 2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5907-5913.2003>

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G; DEL VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565–570, 2005. doi:10.1016/j.lwt.2004.07.012.

MORTAZAVI, N.; ALIAKBARLU, J. Antibacterial Effects of Ultrasound, Cinnamon Essential Oil, and Their Combination Against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in Milk. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3700-3706, 2019. doi: 10.1111/1750-3841.14914.

MORTIMER, E.A.; WHARTON, M. Diphtheria toxoid. In: PLOTKIN, S.A.; ORENSTEIN, W.A. **Vaccines**. WB Saunders Company, Philadelphia, p. 104-157. 1999.

MULLA, M.; AHMED, J.; AL-ATTAR, H.; CASTRO-AGUIRRE, E.; ARFAT, Y. A.; AURAS, R. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. *Food Control*, V.73, p. 663-671, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>.

NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A.F.N.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of *Ocimum Gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500022>.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P.O.; JÚNIOR, A. M. B. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 108-113, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V.D. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v.10, n.4, p. 86-106. 2017. doi: 10.3390/ph10040086.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474. 2013. doi: 10.3390/ph6121451.

NUNEZ, L.; D'AQUINO, M.; CHIRIFE, J. Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 123-126, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000200010>.

OLIVA, A.; COSTANTINI, S.; DE ANGELIS, M.; GARZOLI, S.; BOŽOVIĆ, M.; MASCELLINO, M. T. *et al.* High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2584, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23102584>.

OLIVEIRA, C.J.; ARAÚJO, T.L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 93- 105, 2007. <https://doi.org/10.5216/ree.v9i1.7138>.

OLIVEIRA, D.R. de; COSTA, A.L.M.A.; LEITÃO, G.G.; CASTRO, N.G., SANTOS, J.P. dos; LEITÃO, S.G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amazônica**. v. 41, n. 3, p. 383 – 392, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300008>

OLIVEIRA, L.; SALES, S.S. Inhibitory effect and disinfectant activity of *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum gratissimum* L. essential oils against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from sheep carcasses. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 11, p. 1-12, 2019. doi:10.35699/2447-6218.2019.15951.

OLIVEIRA, Marlucy Bezerra. **Extração, caracterização e avaliação da atividade larvacida do óleo essencial do *Citrus Limon* Linneo (limão) frente ao mosquito *Aedes aegypti***. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

OLIVEIRA, R.A.; REIS, T.V.; SACRAMENTO, C.K.; DUARTE, L.P.; OLIVEIRA, F.F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.19, n.3, p. 771-775, 2009.

OLIVEIRA, R.A.G. de; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I.O. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, P. 77-82, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100014>.

OLIVERA, M. D. C. R. Composicion de extractos de plantas, vegetales y frutas para prevencion de cancer. MX2016007587A. 2017 https://lp.espacenet.com/publicationDetails/biblio?II=2&ND=3&adjacent=true&locale=pt_LP&FT=D&date=20171211&CC=MX&NR=2016007587A&KC=A

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Atualização epidemiológica: Difteria. 22 de setembro de 2020, Washington, D.C.: OPAS/OMS; 2020.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>.

PALACIOS, L.; VELA, A. I.; MOLIN, K.; FERNÁNDEZ, A.; LATRE, M. V.; CHACÓN, G. *et al.* Characterization of Some Bacterial Strains Isolated from Animal Clinical Materials and Identified as *Corynebacterium xerosis* by Molecular Biological Techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.9, p. 3138-45, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.02373-09>.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for

detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002. doi: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002.

PAPPENHEIMER, A.M. The story of a toxic protein, 1888-1992. **Protein Society**. v. 2, n. 2, p. 292-298, 1993. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020218>.

PATEY, O.; BIMET, F.; EMOND, J. P.; ESTRANGIN, E.; RIEGEL, P.; HALIOUA, B. *et al.* Antibiotic susceptibilities of 38 non-toxinogenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.36, n. 6, p.1108-1110, 1995. <https://doi.org/10.1093/jac/36.6.1108>.

PELLISSARI, G.P.; PIETRO, R.C.L.R.; MOREIRA, R.R.D. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n1, p.70-74, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100015>.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000200025>.

PETROVA, O.E.; SAUER, K. PAS domain residues and prosthetic group involved in bdla-dependent dispersion response by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.194, n. 21, p.5817–5828, 2012. doi: <https://doi.org/10.1128/JB.00780-12>

PLASENCIA, V.; BORRELL, N.; MACIÁ, M.D.; MOYÀ, B.; PÉREZ, J.L.; OLIVER, A. Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of *in vitro* and *in vivo* resistance development to single or combined antipseudomonal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 7, p.2574–81, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.00174-07>.

PONCE, A.G.; FRITZ, R.; DEL VALLE, C.; ROURA, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **LWT – Food Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 679–684, 2003. doi:10.1016/S0023-6438(03)00088-4

POPOVIC, T.; MAZUROVA, I.K.; EFSTRATIOU, A.; VUOPIO-VARKILA, J.; REEVES, M.W.; DE ZOYZA, A. *et al.* Molecular epidemiology of diphtheria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181 (Suppl 1), p.S168-77, 2000. doi:10.1086/315556

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p.337-341, 1999. doi: 10.1006/abio.1999.4019

PROBST, Isabella da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012, Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, 2012.

QUEIROZ, M.R.A.; ALMEIDA, A.C.; ANDRADE, V.A.; LIMA, T.S.; MARTINS, E.R.; FIGUEIREDO, L.S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de

Lippia origanoides frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.737-743, 2014. https://doi.org/10.1590/1983-084x/13_083.

RABÊLO, Waléria Ferreira. **Caracterização Química, Toxicidade e Avaliação da Atividade Antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010, Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2010.

RADÜNZ, M.; DA TRINDADE, M.L.M.; CAMARGO, T.M.; RADÜNZ, A.L.; BORGES, C.D.; GANDRA, E.A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180-186, 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.173

RAHMAN, M.R.; ISLAM, K. Massive diphtheria outbreak among Rohingya refugees: lessons learnt. **Journal of Travel Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-3, 2019. <https://doi.org/10.1093/jtm/tay122>.

RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p.142–149, 2010. doi:10.1016/j.tibtech.2009.12.002.

RANGEL, M.L.; DE AQUINO, S.G.; DE LIMA, J.M.; CASTELLANO, L.R.; de CASTRO, R.D. In Vitro Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Essential Oil on *Candida* spp. Involved in Oral Infections, v. 2018. doi:10.1155/2018/4045013.

RAO, B.R.R.; RAJPUT, D.K.; BHATTACHARYA, A.K. Essential oil composition of petiole of *Cinnamomum verum* Bercht. & Presl. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 16, n. 1, p. 38-41, 2007.

RAPPER, S.L.; VAN VUUREN, S.F. Odoriferous Therapy: A Review Identifying Essential Oils against Pathogens of the Respiratory Tract. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 6, p. e2000062, 2020. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000062>.

RAZAVI, S.M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L. *et al.* Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera*(*Apiaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 18, n. 1, p. 1-5, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100002>.

REHM, B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 578–592, 2010.

REY, M.; PATEY, O.; VINCENT-BALLEREAU, F. Diphtheria's European come back. **European Communicable Disease Bulletin**, v. 1, n. 2, p. 14-16, 1996.

REYNOLDS, J.E.F. **Martindale the Extra Pharmacopeia**. 30 Ed. Singapore, Amer Pharmaceutical Assn, 1993. p. 2500.

ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L. *et al.* Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) D.C. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_006

ROSATO, A.; CAROCCI, A.; CATALANO, A.; CLODOVEO, M.L.; FRANCHINI, C.; CORBO, F. *et al.* Elucidation of the synergistic action of *Mentha piperita* essential oil with common antimicrobials. **PLoS One**, v. 13, n.8, p. e0200902, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0200902.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 118.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**. v. 9, n.1, p. 522-554, 2018. doi:10.1080/21505594.2017.1313372.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil componentes in two lipid mdel systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000. doi 10.1016/S0308-8146(99)00247-2

SABBADINI, P.S.; GENOVEZ, M.R.N.; SILVA, C.F. da; ADELINO, T.L.N.; SANTOS, C.S. dos; PEREIRA, G.A. *et al.* Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.5, p.706-711, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000500018>.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000, 48 p. (Série Documentos, n. 20).

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 27, n.3, p. 429–438, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

SALEEB, P.G. *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtheria). In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 9ª ed. 2019. Cap. 204. P. 2526-2531.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Diphtheria. In: **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. American Society for Microbiology, Washintong DC, USA. 1994, p. 113-121.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, n.11, p. 1070-1075, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.11.006>.

SANGAL, V.; HOSKISSON, P. A. Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: New perspectives on an old foe. **Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.43, p.364-370, 2016. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.024

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, n.1, p. 3-21, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>

SANTANA, Mariana Passos. **Análise transcricional de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi, linhagem 258, a partir de montagem ab initio: um enfoque nos processos biológicos dos estimulons ácido, térmico e osmótico**. 2014. Tese (Doutorado)- Programa de pós-graduação em genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2014.

SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; ALEXANDER, K.S.; RIGA, A.; MATTHEWS, E. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 96, p. 821-825, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0030-7>.

SANTOS, C.H.S.; PICCOLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 76, p. 1-8, 2017.

SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, R.S.; SOUZA, C.S.E.; BRAGA, M.B.F. M.; GUEDES, G.M.M. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 130–2, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.019>.

SANTOS, L.S.; SANT'ANNA, L.O.; RAMOS, J.N.; LADEIRA, E.M.; STAVRACAKIS-PEIXOTO, R.; BORGES, L.L. *et al.* Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. **Epidemiology and Infection**, v. 143, v. 4, p.791-798, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001241>.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares e *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300031>

SARTO, M.P.M; JUNIOR, G.Z. Atividade Antimicrobiana De Óleos Essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, v.20, n.1, p.98-102, 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMENINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4. p. 275-280, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001> .

SCHEELE, G. High protein supplement. US8779189B2. 2011. <https://patents.google.com/patent/US8779189B2/en?q=cinnamomum+verum&page=4>(accessed 14 October 2022).

SCHEIFER, C.; ROLLAND-DEBORD, C.; BADELL, E.; REIBEL, F.; AUBRY, A.; PERIGNON, A. *et al.* Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 6, p. 463-466, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.12.001>

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7749-7759, 2005. doi: 10.1021/jf051513y.

SHARMA, N.C.; EFSTRATIOU, A.; MOKROUSOV, I.; MUTREJA, A.; DAS, B.; RAMAMURTHY, T. Diphtheria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p.81, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y>

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes -- by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00370-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00370-6).

SHIH, Y.H.; LIN, D.J.; CHANG, K.W.; HSIA, S.M.; KO, S.Y.; LEE, S.Y. *et al.* Evaluation Physical Characteristics and Comparison Antimicrobial and Anti-Inflammation Potentials of Dental Root Canal Sealers Containing Hinokitiol *In Vitro*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e94941, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094941>.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M. de; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SILVA, Maria Honorato de Moura. **Óleos essenciais de *Croton adamantinus* Mull Arg e *C. grewoides* Baill (*Euphorbiaceae*): composição química e atividades antibacteriana e antioxidante**. 2016. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016

SILVA, F.F. M. da; MONTE, F.J.Q.; DE LEMOS, T.L.G.; DO NASCIMENTO, P.G.G.; DE MEDEIROS COSTA, A.K.; DE PAIVA, L.M.M. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n.1, p. 34, 2018. doi: 10.1186/s13065-018-0407-4.

SILVA, Joicy Kelly Alves da. **Avaliação em ratos do potencial antiobesidade de extratos brutos das folhas e cascas do caule do *Cinnamomum zeylanicum* (canela)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES, J.A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p. 257-62, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000300005>

SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**. v. 38, n. 1, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100012>.

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVI, I.; CANSIAN, R. L. *et al.* Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v.57, n.5, p. 589- 594, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500004>.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed, Porto Alegre. Editora da Universidade UFRGS. 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; SIMON, D. **O guia Deepak Chopra de Ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita**. Rio de Janeiro, Campus, 2001. p.270.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Ed. Universidade-UFRGS, 1999, p.p. 387-415.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –*Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Revista Química Nova**, v. 21, n.5, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500004>.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biociência e Desenvolvimento**. v.16, p. 38-43,2000.

SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; MARIN, P. D.; BRKIĆ, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7532 -7546, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>

SOTO, A.; ZAPARDIEL, J.; SORIANO, F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. **Journal of Clinical Pathology**, v.47, n. 8, p.756–759,1994. doi: 10.1136/jcp.47.8.756.

SOUZA, C.D.; FARIA, Y.V.; SANT'ANNA, L.O.; VIANA, V.G.; SEABRA, S.H.; de SOUZA, M.C. *et al.* Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2. n. 110, p. 242-248, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140373>

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**. v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)

TRIVEDI, H. M.; GITTINS, E. K. Oral compositions containing extracts of *Zizyphus joazeiro* and related methods. US2012237455A1. 2012. <https://ip.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20120920&D>

B= &locale=pt_LP&CC=US&NR=2012237455A1&KC=A1&ND=4

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARIÉTRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005. doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005

TSUCHIYA, H; IINUMA, M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 161-165, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80089-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80089-6)

UNNIKRISHMAN, P.S.; SUTHINDHIRA, K.; JAYASRI, M.A. Inhibitory potential of *Turbinaria ornata* against key metabolic enzymes linked to diabetes. **BioMed Research international**, v. 2014, p. 783895, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/783895>.

VALENTIM, J.A.; SOARES, E.C. Extração de óleos essenciais por arraste a vapor/; um kit experimental para o ensino de química. *Química Nova Escola*, v. 40, n. 4, p. 297- 301, 2018. DOI:10.21577/0104-8899.20160131.

VALERIANO, Carolina. **Ação antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos sésseis e planctônicos de origem alimentar**. 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

VAN, H.O.; WANG, K.; LEE, J.J.; ROBERTS, N.W.; BUTLER, C.C. Implications of antibiotic resistance for patients' recovery from common infections in the community: a systematic review and meta-analysis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 65, n. 3, p. 371-382, 2017. <https://doi.org/10.1093/cid/cix233>

VANGALAPATI, M.; SATYA, S.; PRAKASH, S.; AVANIGADDA, S.; SREE, A.K.; SURYA, D. *et al.* A review on pharmacological activities and clinical effects of *Cinnamon* species. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.3, p. 653-663, 2012.

VELLUTI, A.; RAMOS, A.; MARÍN, S. Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B-1 production by *Fusarium verticilloides* in maize. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84., n. 10, p. 1141 – 1146, 2004. doi:10.1002/jsfa.1769.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal Activities of Thyme, Clove And Oregano Essential Oils. **Journal of Food Safety**, v. 27, n. 1, p. 91-101, 2007. doi:10.1111/j.1745-4565.2007.00063.x

WALSH, C.T.; FISCHBACH, M.A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.8, p. 2469-93, 2010. doi: 10.1021/ja909118a.

WANG, J.; LONDON, E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. **Biochemistry**, v. 48, n. 43, p.10446-10456, 2009. <https://doi.org/10.1021/bi9014665>.

WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M.B.; OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G. *et al.* Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 5, p. 1.362-1.370, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>

WHO. Surveillance and burden of diphtheria. http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/diphtheria/en/. (2018).

WONGSAWAN, K.; CHAISRI, W.; TANGTRONGSUP, S.; MEKTRIRAT, R. Bactericidal Effect of Clove Oil against Multidrug-Resistant *Streptococcus suis* Isolated from Human Patients and Slaughtered Pigs. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 14, 2019. doi:10.3390/pathogens9010014

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Infections caused by Grampositive bacteria: a review of the global challenge. **The Journal of infection**, v. 59, p. S4-S16, 2009. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453\(09\)60003-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453(09)60003-7).

XU, J. G.; LIU, T.; HU, Q. P.; CAO, X. W. Chemical composition antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1194, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21091194>.

XU, T.; GAO, C.; FENG, X.; HUANG, M.; YANG, Y.; SHEN, X. *et al.* Cinnamon and clove essential oils to improve physical, thermal and antimicrobial properties of chitosan-gum arabic polyelectrolyte complexed films. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 116-125, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.084>.

YAMAGUCHI, K.K.L.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; PEDROSA, T.N.; VASCONCELLOS, M.C.; LIMA, E.S. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v. 36, n.6, p. 826-830, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600015>

YANAKIEV, S. Effects of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) in Dentistry: A Review. **Molecules**. V. 25, p. 4184, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25184184>.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 147-152, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100025>.

ZAKIKHANY, K.; EFSTRATIOU, A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. **Future Microbiol**, v. 7, n. 5, p.595–607, 2012. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.24>.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHU, X.; CAO, P.; WEI, S.; LU, Y. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 396–402, 2017. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.054

ZIKELI, F.; VINCIGUERRA, V.; SENNATO, S.; MUGNOZZA, G. S.; ROMAGNOLI, M. Preparation of Lignin Nanoparticles with Entrapped Essential Oil as a Bio-Based Biocide Delivery System. **ACS Omega**. V. 5, n.1, p.358–368, 2020. doi: 10.1021/acsomega.9b02793.

ZUMLA, A.; HUI, D.S.C. Emerging and Reemerging Infectious Diseases: Global Overview. **Infectious disease clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. xiii-xix, 2019. doi: 10.1016/j.idc.2019.09.001.

ANEXOS

Anexo A:

Artigo intitulado “Revisão de atividade de plantas medicinais contra *Corynebacterium* spp.” aceito para publicação na Revista Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.

Notificações

[Ens. Cienc.] Decisão editorial

2021-06-28 07:08 PM

MARCIA BARROS ALVES, JÉSSICA MAYARA MENDES ARAÚJO, PÂMELA RUTH SANTOS VIANA, DENES SOUSA LEITE, PEDRO HENRIQUE CUNHA FONTENELLE, RODRIGO BÊNNETTON DA CONCEIÇÃO DUTRA, DANIELLE CRISTINA PEREIRA SANTOS, GABRIELLE GUEDES COUTINHO, WELLYSON DA CUNHA ARAÚJO FIRMO, PRISCILA SOARES SABBADINI,

Foi tomada uma decisão sobre o artigo submetido à revista Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde, "Revisão de atividade de plantas medicinais contra *Coynebacterium* spp.: Review on medicinal plant activity against *Corynebacterium* spp."

A decisão é: Aceito para publicação.

Mayara Murata

mayara.murata@kroton.com.br

Equipe Editorial _____

Título: Revisão de atividade de plantas medicinais contra *Corynebacterium* spp.

Title: Review on medicinal plant activity against *Corynebacterium* spp.

Authors:

Marcia Barros Alves, Mestrado em Biologia Parasitária pela Universidade CEUMA e Doutoranda em Biotecnologia pelo BIONORTE da Universidade Federal do Maranhão, marcia_barros16@hotmail.com;

Jéssica Mayara Mendes Araújo, Mestrado em Biologia Parasitária pela Universidade do CEUMA e Doutoranda em Biotecnologia pelo BIONORTE da Universidade Federal do Maranhão, jessicamendesaraujo1@hotmail.com;

Pâmela Ruth Santos Viana, Graduação em Biomedicina pela Universidade CEUMA e Mestranda em Saúde e Ambiente pela Universidade Federal do Maranhão, ruthvianna789@gmail.com;

Denes Sousa Leite, Graduação em Biomedicina pela Universidade do CEUMA, denessousa27@gmail.com;

Pedro Henrique Cunha Fontenelle, Graduação em Biomedicina pela Universidade CEUMA e Mestrado em Meio Ambiente pela Universidade CEUMA, pedrohfontenelle@hotmail.com;

Rodrigo Bênnetton da Conceição Dutra, Graduação em Biomedicina pela Universidade CEUMA, bennetton_89@hotmail.com;

Danielle Cristina Pereira Santos, Graduanda em Biomedicina pela Universidade CEUMA, dany.cps03@gmail.com;

Gabrielle Guedes Coutinho, Graduação em Biomedicina pela Universidade CEUMA e Mestranda em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Maranhão, gabriellegc38@gmail.com;

Wellyson da Cunha Araújo Firmo, Docente da Universidade CEUMA e do Mestrado em Saúde e Ambiente pela Universidade Federal do Maranhão, well_firmo@hotmail.com;

Priscila Soares Sabbadini, Docente da Universidade CEUMA e Docente do Doutorado em Biotecnologia pelo BIONORTE da Universidade Federal do Maranhão, prisabbadini@gmail.com;

RESUMO: Casos de infecções humanas relacionadas a algumas espécies do gênero *Corynebacterium* spp têm sido gradativos, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento e este gênero tem sido citado como patógeno de infecções nosocomiais associadas à sepse, endocardite, infecções de feridas cirúrgicas, próteses e infecções relacionadas ao cateter venoso central. As plantas medicinais representam às mais antigas “armas” empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos, ou seja, a utilização de plantas na prevenção e/ou na cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade. Neste sentido, este trabalho objetivou revisar a literatura disponível a fim de detectar artigos científicos sobre plantas medicinais com atividade antibacteriana contra corinebactérias. A metodologia utilizada foi o levantamento bibliográfico nos principais bancos de dados de pesquisas científicas. Setenta e três espécies de Plantas Medicinais demonstraram atividade antibacteriana contra o gênero *Corynebacterium* spp, além do produto *havan sámagri* que é composto por uma mistura de 54 espécies vegetais. Treze das plantas estudadas não apresentaram nenhuma atividade inibitória para diferentes espécies de corinebactérias. Dessa forma, fica claro a relevância da realização de novas pesquisas na área, devido à possibilidade de validar as informações populares e o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

Palavras-chave: Plantas medicinais, atividade antibacteriana, *Corynebacterium* spp.

ABSTRACT: Cases of human infections related to some species of the genus *Corynebacterium* spp. have increased gradually both in industrialized and developing countries. This genus has been cited as a pathogen of nosocomial infections associated with sepsis, endocarditis, infections of surgical wounds, prostheses, and infections related to the central venous catheter. Medicinal plants represent the oldest “weapons” used by humans for the treatment of all types of diseases, that is, the use of plants in the prevention and/or healing of diseases is a habit that has always existed in human history. In this sense, this work aims to review the available literature in order to collect scientific articles on medicinal plants with antibacterial activity against corynebacteria. The methodology used was bibliographic survey in the main scientific research databases. Seventy-three species of medicinal plants showed antibacterial activity against the genus *Corynebacterium* spp., in addition to the product *havan sámagri*, which is composed of a mixture of 54 plant species; among them, thirteen plants did not show any inhibitory

activity for different species of that genus. Thus, there is a clear relevance in conducting new research in the area due to the possibility of validating popular information and the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Medicinal plant, antibacterial activity, *Corynebacterium* spp.

INTRODUCTION:

The genus *Corynebacterium* is part of the family *Corynebacteriaceae* and is characterized by having complex cell walls, mycolic acids, string factor and cross-reactivity, which are highly relevant virulence factors. *Corynebacterium* spp. comprises Gram-positive, pleomorphic, aerobic bacilli devoid of mobility and sporulation capacity. *Corynebacteria* may appear individually, in pairs or as palisades. Some species have metachromatic granules that are reserves of high energy phosphates (BIBERSTEIN, 1994).

This genus has more than 100 species and ten subspecies and has been cited with an increasing frequency as pathogens of nosocomial infections associated with sepsis, endocarditis, infections of surgical wounds, prostheses and infections related to the central venous catheter. It can also cause pharyngitis, as well as infection of the prostate, gastrointestinal tract and skin. Some species of the genus, in addition to being considered pathogenic to humans, are also pathogenic to animals. The main route of transmission is direct contact with the source of contamination. The most eminent and well-known species are *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium anycolatum*, *Corynebacterium striatum*, among others.

The incidence of infections caused by multiresistant *Corynebacteria* has been increasing and, mainly, making it difficult to treat nosocomial infections. Geographic variations in the frequency of isolated species and in natural and acquired antimicrobial resistance are described.

Medicinal plants represent the oldest "weapons" used by humans for the treatment of all types of diseases, that is, the use of plants in the prevention and/or healing of diseases is a habit that has always existed in human history (MACIEL et al., 2002). Evidence of the use of medicinal and toxic plants is found in the oldest civilizations, serving as an important source of biologically active compounds (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007).

In recent decades, there has been a growing interest in the use of medicinal plants and their extracts in therapy, constituting, in certain circumstances, an aid in primary health care and a therapeutic complement compatible with conventional medicine. For this, there must be a guarantee of safety in relation to toxic effects, in addition to knowledge about side effects, interactions, contraindications, mutagenicity, among others. The existence of pharmacological trials and clinical experimentation that demonstrate the efficacy of this type of medication is also extremely important (ARAÚJO et al., 2007).

Popular knowledge on the use of medicinal plants as a therapeutic means is kept through oral tradition and, due to this factor, there is a lack of scientific knowledge on its pharmacological and toxicological properties and little information is proven about beneficial and harmful effects (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

The World Health Organization (WHO) estimates that 80% of the world population uses resources from popular medicines to meet the needs of private medical assistance, which may cost around 22 billion dollars (YUNES; PEDROSA; CECHNEL FILHO, 2001).

In the 19th century, the empiricism of alchemy was supplanted by experimental chemistry, which allowed the laboratory synthesis of new organic substances. This was one of the determining factors of the industrial and technological revolution that triggered the accelerated production of new medicines and, as more pure and concentrated derivatives of plants became available, doctors prioritized synthetic drugs and disregarded the important role of herbal medicine (SIMÕES; SCHENKEL; SIMON, 2001).

For some years, the government and professional interest in associating technological advances with popular knowledge and sustainable development have been fostered aiming an effective, comprehensive, humanized and independent health care policy (FRANCE et al., 2008).

Numerous scientific studies have been carried out to validate popular information regarding the use of medicinal plants. We can mention the current and intense interest that scientists, as well as the pharmaceutical industry, show by developing research in order to discover new active principles and to improve discoveries of new pharmacological activities of already known substances from plants. The segments mentioned above show concern regarding the development of techniques for isolation and identification, production and cultivation of drugs (plant origin), biogenesis of active principles and other methods that lead to the improvement of their products (GURIB-

FAKIM, 2006). The popular use of plants has been verified in order to obtain the most varied medicinal effects, including its application as antimicrobials (NOUMEDEM et al., 2013).

The investigation of natural materials as sources of new antibacterial agents has potentially increased in recent years. Different extracts of medicinal plants are tested in order to provide scientific guarantees for this therapeutic practice, bringing advantages, such as low cost and easy access, reduction of adverse effects and prevention or reduction of risks of intoxication due to inappropriate use.

METHODS:

Bibliographic surveys were carried out in the main databases of scientific research, national and international, such as Scielo, PubMed and Google Scholar, for a quantitative study. The keywords Antibacterial activity, medicinal plants, Antimicrobial and *Corynebacterium* spp. were used. The search period established for the research was from 1999 to 2016.

RESULTS AND DISCUSSION:

Seventy-three species of medicinal plants showed antibacterial activity against the genus *Corynebacterium* spp., in addition to the product *havan sámagri*, which is composed of a mixture of 54 plant species, as shown in Table 1.

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism.

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Anredera diffusa</i>	Madeira vine	Basellaceae	Flower	Yes	[1]
	<i>Asclepias curassavica</i>	Tropical milkweed	Asclepidaceae	Flower	No	[1]
	<i>Cassia tomentosa</i>	Glandular senna	Fabaceae	Flower	No	[1]
	<i>Cestrum auriculatum</i>	Cestrum	Solanaceae	Flower	No	[1]
	<i>Himatanthus succuba</i>	Bellaco caspi	Apocynaceae	Flower	No	[1]
	<i>Krameria triandra</i>	Rhatany	Krameriaceae	Flower	Yes	[1]
	<i>Peperomia galioides</i>	White cinnamon	Piperaceae	Flower	Yes	[1]
	<i>Sambucus peruviana</i>	Elderberry	Caprifoliaceae	Flower	Yes	[1]
	<i>Boswellia sacra</i>	Frankincense	Burseraceae	Oil and resin	Yes	[2]
	<i>Boswellia frereana</i>	Coptic frankincense	Burseraceae	Resin	Yes	[2]
	<i>Butea monosperma</i>	Flame-of-the-forest	Fabaceae	Leaf, bark and flowers	Yes	[3]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Polyalthia cerasoides</i>	Narela	Annonaceae	Bark	Yes	[4]; [5]
	<i>Saraca thaipingensis</i>	Yellow Saraca	Leguminosae	Flower, leaf and twig	Yes	[6]
	<i>Piper betel</i>	Betel pepper	Piperaceae	Leaf	Yes	[7];[8]
	<i>Terminalia catappa</i>	Tropical almond	Combretaceae	Leaf and Fruit	Yes	[9];[10]
	<i>Adathoda vasica</i>	Malabar nut	Acanthaceae	Leaf	Yes	[10]
	<i>C. diphtheriticum</i>	<i>Terminalia catappa</i>	Tropical almond	Combretaceae	Leaf and Fruit	Yes
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>Anredera diffusa</i>	Bertalha	Basellaceae	Flower	No	[1]
	<i>Asclepias curassavica</i>	Milkweed	Asclepidaceae	Flower	No	[1]
	<i>Cassia tomentosa</i>	Glandular senna	Fabaceae	Flower	No	[1]
	<i>Cestrum auriculatum</i>	Cestrum	Solanaceae	Flower	No	[1]
	<i>Himatanthus succuba</i>	Bellaco caspi	Apocynaceae	Flower	No	[1]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>Krameria triandra</i>	Rhatany	Krameriaceae	Flower	Yes	[1]
	<i>Peperomia galioides</i>	White cinnamon	Piperaceae	Flower	Yes	[1]
	<i>Sambucus peruviana</i>	Elderberry	Caprifoliaceae	Flower	No	[1]
<i>C. femi</i>	<i>Carya illinoensis</i>	Pecan tree	Juglandaceae	Leaf	No	[11]
	<i>Liquidambar orientalis</i>	Oriental sweetgum	Hamamelidaceae	Bark	Yes	[12]; [13]
<i>C. pyogenes</i>	<i>Khaya senegalensis</i>	African mahogany	Meliaceae	Leaf and bark	Yes	[14]
	<i>Cassia goratensis</i>	Winter cassia	Leguminosae	Leaf and bark	Yes	[14]
	<i>Boswellia dalzielii</i>	Frankincense tree	Burseraceae	Leaf and bark	Yes	[14]
	<i>Bauhinia thonningi</i>	Hano	Leguminosae	Leaf and bark	Yes	[14]
	<i>Butyrospermum parkii</i>	Shea	Sapotaceae	Leaf and bark	Yes	[14]
	<i>Guiera senegalensis</i>	Sabara	Combretaceae	Leaf and bark	Yes	[14]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. pyogenes</i>	<i>Anogeissus schimperi</i>	Bakli	Combretaceae	Leaf and bark	Yes	[14]
	<i>Anacardium occidentale</i>	Cashew tree				
	<i>Terminalia catappa</i>	Tropical almond	Combretaceae	Leaf	Yes	[15]
	<i>C. macginleyi</i>	<i>Acacia leucophloea</i>	Acacia	Fabaceae	Bark	Yes
<i>Acalypha indica</i>		Indian copperleaf	Euphorbiaceae	Shoots	Yes	[16]
<i>Albizia lebbbeck</i>		Woman's tongue tree	Fabaceae	Bark	Yes	[16]
<i>Ammania baccifera</i>		Blistering ammania	Lythraceae	Whole plant	Yes	[16]
<i>Boerhaavia diffusa</i>		Punarnava	Nyctaginaceae	Whole plant	Yes	[16]
<i>Bombax ceiba</i>		Red silk-cotton	Malvaceae	Bark	Yes	[16]
<i>Butea monosperma</i>		Flame-of-the-forest	Fabaceae	Bark	Yes	[16]
<i>Calotropis procera</i>		Rubber tree	Apocynaceae	Flower	Yes	[16]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. macginleyi</i>	<i>Cardiospermum halicacabum</i>	Love in a puff	Sapindaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Cassia occidentalis</i>	Coffee senna	Leguminosae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Catharanthus roseus</i>	Madagascar periwinkle	Apocynaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Datura stramonium</i>	Devil's snare	Solanaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Cissus quadrangularis</i>	Devil's backbone	Vitaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Cleome viscosa</i>	Asian spiderflower	Cleomaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Clitoria ternatea</i>	Asian pigeonwings	Fabaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Emblica officinalis</i>	Myrobalan	Phyllanthaceae	Fruit	Yes	[16]
	<i>Ficus bengalensis</i>	Bargad	Moraceae	Bark	Yes	[16]
	<i>Ficus religiosa</i>	Fig tree	Moraceae	Bark	Yes	[16]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. macginleyi</i>	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	Hibiscus	Malvaceae	Leaf	Yes	[16]
	<i>Hildegardia populifolia</i>	Poplar leaved	Sterculiaceae	Stem bark	Yes	[16]
	<i>Hyptis suaveolens</i>	Pignut	Lamiaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Justicia adhatoda</i>	Malabar nut	Acanthaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Lantana camara</i>	Lantana	Verbenaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Lawsonia inermis</i>	Egyptian privet	Lythraceae	Leaf	Yes	[16]
	<i>Morus alba</i>	White mulberry	Moraceae	Bark	Yes	[16]
	<i>Solanum khasianum</i>	Nightshade	Solanaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Ocimum sanctum</i>	Basil	Lamiaceae	Leaf and seed	Yes	[16]
	<i>Phyllanthus amarus</i>	Seed-under-leaf	Phyllanthaceae	Whole plant	Yes	[16]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. macginleyi</i>	<i>Physalis minima</i>	Wild cape gooseberry	Solanaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Piper betle</i>	Betel pepper	Piperaceae	Leaf	Yes	[16]
	<i>Plumbago zeylanica</i>	Ceylon leadwort	Plumbaginaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Pongamia pinnata</i>	Indian beech	Fabaceae	Bark and seed	Yes	[16]
	<i>Rosa indica</i>	Rose	Rosaceae	Flower	Yes	[16]
	<i>Sida acuta</i>	Common wireweed	Malvaceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Tamarindus indicus</i>	Tamarind	Fabaceae	Bark	Yes	[16]
	<i>Terminalia catappa</i>	Tropical almond	Combretaceae	Bark	Yes	[16]
	<i>Terminalia arjuna</i>	Arjuna	Combretaceae	Bark	Yes	[16]
	<i>Terminalia chebula</i>	Chebolic myrobalan	Combretaceae	Bark and fruit	Yes	[16]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. macginleyi</i>	<i>Tridax procumbens</i>	Tridax daisy	Asteraceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Veronica cinerea</i>	Ash colored Fleabane	Asteraceae	Whole plant	Yes	[16]
	<i>Terminalia catappa</i>	Tropical almond	Combretaceae	Leaf	Yes	[17]
<i>C. rubrum</i>	<i>Avicennia marina</i>	White mangrove	Avicenniaceae	Leaf, stem and root	Yes	[18]
	<i>Aegle marmelos</i>	Japanese bitter orange	Rutaceae	Leaf, fruit and seed	No	[19]
	<i>Annona squamosa</i>	Custard-apple	Annonaceae	Leaf and seed	Yes	[19]
	<i>Citrus limon</i>	Lemon	Rutaceae	Leaf and seed	Yes	[19]
	<i>Azadiracta indica</i>	Neem	Meliaceae	Fruit	No	[19]
	<i>Piper betle</i>	Betel pepper	Piperaceae	Leaf	Yes	[19]
	<i>Mangifera indica</i>	Mango tree	Anacardiaceae	Fruit	Yes	[20]

Table 1: Classification of plants and their respective activities against the tested microorganism (Continuation).

Microorganism	Vegetable species	Common name	Family	Used part	Inhibition	Citation
<i>C. urealyticum</i>	* <i>havan</i> <i>sámagri</i>	-	-	-	Yes	[21]
<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Syzygium cumini</i>	Malabar plum	Myrtaceae	Leaf	Yes	[22]
	<i>Ageratum conyzoides</i>	Billygoat-weed	Asteraceae	Leaf	Yes	[23]

* material used for oblation in India, a mixture of 54 plant species. [1] = Catherine Neto et al. (2002); [2] = Hasson et al. (2011); [3] = Pooja et al. 2016; [4] Treeratanapiboon et al. (2011); [5] = Hemalatha et al. (2013); [6] = Prachayasittikul et al. (2012); [7] = Nandam, Prasad and Kandru (2013); [8] = Swapna, Ammani and Saripalli (2013); [9] Naz et al. (2007); [10] = Unmikrishnan et al. (2014); [11] = Caxambu et al. (2016); [12] = Guerdal and Kultur (2013); [13] = Sagdiç et al. (2005); [14] = Kudi et al. (1999); [15] = Obafemi et al. (2006); [16] = Koday et al. (2010); [17] = Chanda et al. (2013); [18] = Moteriya, Dalsaniya and Chanda (2015); [19] = Padali, Trivedi and Chanda (2016); [20] = Rakholiya et al. (2013); [21] = Nautiyal, Chauhan and Nene (2007); [22] = Loguercio et al. (2005); [23] = Singh et al. (2016)

The species *Boswellia sacra*, *Boswellia frereana*, *Butea monosperma*, *Annedera diffusa*, *Krameria triandra*, *Peperomia galioides*, *Piper betel*, *Terminalia catappa*, *Adathoda vasica*, *Sambucus peruviana*, *Saraca thaipingensis* and *Polyalthia cerasoides* show antibacterial activity against *Corynebacterium diphtheriae*, while *Asclepias curassavica*, *Cestrum auriculatum*, *Cassia tomentosa* and *Himatanthus succuba* did not show any such activity. *T. catappa* also shows activity against the species *Corynebacterium diphtheriticum*. *K. triandra* and *P. galioides* also act against *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. However, *A. diffusa*, *A. curassavica*, *C. tomentosa*, *C. auriculatum*, *H. succuba* and *S. peruviana* do not inhibit *C. pseudodiphtheriticum*.

Carya illinoensis (pecan nutshell extract) shows no inhibitory action against *Corynebacterium femi*, although the extract is efficient in inhibiting important Gram-positive pathogenic bacteria.

The extract of the species *Liquidambar orientalis* at a concentration of 10% completely inhibits the growth of *Corynebacterium xerosis*.

Khaya senegalensis, *Cassia goratensis*, *Boswellia dalzielii*, *Bauhinia thonningi*, *Burrospermum parkii*, *Guiera senegalensis*, *Anogeissus schimperi*, *Anacardium occidentale* and *T. catappa* show activity against *Corynebacterium pyromogen*.

The species *Albizia lebbbeck*, *Acacia leucophloea*, *Acalypha indica*, *Ammania baccifera*, *B. monosperma*, *Boerhaavia diffusa*, *Bombax ceiba*, *Calotropis procera*, *Cardiospermum halicacabum*, *Cassia occidentales*, *Catharanthus roseus*, *Datura stramonium*, *Cissus quadrangulares*, *Cleome viscosa*, *Clitoria ternatea*, *Embllica officinalis*, *Ficus bengalensis*, *Ficus religiosa*, *Hibiscus rosasinensis*, *Hildegardia populifolia*, *Hyptis suaveolens*, *Justicia adhatoda*, *Lantana camara*, *Lawsonia inermis*, *Morus alba*, *Solanum khasianum*, *Ocimum sanctum*, *Phyllanthus amarus*, *Physalis minima*, *P. betle*, *Plumbago zeylanica*, *Pongamia pinnata*, *R. indica*, *Sida acuta*, *T. catappa*, *Terminalia chebula*, *Rosa indica*, *Tamarindus indicus*, *Terminalia arjuna*, *Tridax procumbens* and *Vernonia cinerea* show activity against *Corynebacterium macginley*.

T. catappa, *Avicennia marina*, *Annona squamosa*, *Citrus limon*, *P. betle*, *Mangifera indica* show activity against *Corynebacterium rubrum*. However, *Aegle quinces* and *Azadiracta indica* do not show any such activity.

Havan sámagri, produced in order to demonstrate that the treatment with medicinal smoke is effective, shows activity against *Corynebacterium urealyticum*.

Finally, the plant species *Syzygium cumini* and *Ageratum conyzoides* show antibacterial activity against the genus *Corynebacterium* spp.

The articles analyzed reported that, for the identification of the active principles of plants, sensitivity and bacterial resistance, antibacterial tests were performed *in vitro* using mainly the crude extract from different parts of plants, such as, leaf, bark, flower, twig and oil, and fractioning them using solvents.

The evaluation of antibacterial activity was performed mainly by the diffusion agar method, characterized by being a quick, simple test capable of evaluating the sensitivity of bacterial samples, and the method of minimum inhibitory concentration, which consists in determining the lowest concentration of a certain principle capable of inhibiting microbial growth.

CONCLUSION

The relevance of conducting studies on medicinal plants is because of the possibility of validating popular information, discovering new active principles, and researching new pharmacological activities of already known substances. Few studies on corynebacteria have been found, emphasizing the need for more research along this line since natural and acquired antimicrobial resistance is described for the species.

REFERENCES

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. **Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea***. *Journal of Ethnopharmacoly*. v.109, n. 3. 2007. p. 464-471. DOI: 10.1016/j.jep.2006.08.023

ARAÚJO, E.C. et al. **Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB)**. *Revista Espaço para a Saúde*. v. 8, n. 2. 2007. p. 44-52.

BIBERSTEIN E.L. & HIRSH D.C. **Corynebactérias; *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*; *Rhodococcus equi***. In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. (Ed.), *Microbiologia Veterinária*. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.119-126. 2003.

CAXAMBÚI S, BIDNDDI E, KDLCHINSKII E M, PADILHA R L, BRANDELLI A, SANT'ANNA V*, (2016) **Evaluation of the antimicrobial activity of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell aqueous extract on minimally processed lettuce leaves** DDI <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.0043>

FRANÇA, I.S.X. et al. **Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais.** *Revista Brasileira de Enfermagem.* v. 61, n. 2, p. 2008. 201-208. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672008000200009>

GURDAL, B, KULTUR S. **An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey).** *Journal of ethno pharmacology* 146 (2013) 113–126. 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.12.012

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday.** *Molecular Aspect of Medicine.* 2006. 27. p. 1-93.

Hasson S. S. et al. **In vitro antibacterial activity of three medicinal plants-Boswellia (Luban) Species.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2011) S178-S182. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60151-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60151-2)

JK VAN DER LELIE H, LEVERSTEIN-VAN HALL M, MERTENS M, VAN ZAAENEN HC, VAN OERS RH, THOMAS BL, VON DEM BORNE AE, KUIJPER EJ. **Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*.** *Veterinary Microbiology.* 2011;153:323-331. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.007

KODAY N. K., RANGAIAH G. S., BOBBARALA V, CHERUKURI S. **Bactericidal activities of different Medicinal plants extracts against Ocular pathogen viz *Corynebacterium macginleyi*.** *Drug Invention Today* Vol.2.Issue.1.January 2010.

KUDI, A.C. et al. **Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity.** *Journal of Ethnopharmacology* 67 (1999) 225–228. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00214-1)

MACIEL, M.A.M. et al. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova. v. 25, n. 3. 2002. p. 429-438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.

MARTINS CAS, FARIA LMD, SOUZA MC, CAMELLO TCF, VELASCO E, HIRATA JUNIOR R, THULER LCS, MATTOS-GUARALDI AL. **Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(6):905-913. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600015>

MEM INST OSWALDO CRUZ **Corynebacterium pseudodiphtheriticum enter and survive within HEP-2 epithelial cells.** 2012; 107(4):486-493.

MUNUSWAMY HEMALATHA et al. **A review on antimicrobial efficacy of some traditional medicinal plants in Tamilnadu.** Journal of Acute Diseases (2013)99-105

NAUTIYAL, C.S. et al. **Medicinal smoke reduces airborne bacteria.** Journal of Ethnopharmacology 114 (2007) 446–451. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60107-9](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60107-9)

NETO, C. C. et al. **Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas.** Journal of Ethnopharmacology 79 (2002) 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00398-1)

NOUMEDEM, J.A et al. **Phytochemical analysis, antimicrobial and radical-scavenging properties of *Acalypha manniana* leaves.** Springerplus. v. 3. 2013. p. 503.

OLIVEIRA, C.J.; ARAÚJO, T.L. **Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial.** Revista Eletrônica de Enfermagem. v. 9, n. 1. 2007. p. 93-105.

OSTERWALDER B, FREI R, GRATWOHL A, REBER H, SPECK B. **Antibiotic-resistant Corynebacteria - a new problem of infection in immunosuppressed patients.** Schweiz Med Wochenschr. 1986; 116(26):880-884.

PRACHAYASITTIKUL S. et al. **Antioxidant and antimicrobial activities of *Saraca thaipingensis* Cantley ex Prain.** Asian Paicfic Journal of Tropical Biomedicine (2012).

POOJA, G. et al. **Antibacterial study of *butea monosperma* (lamk.) Taub. Plant parts using agar well diffusion method.** World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. Volume 5, Issue 10, 1002-1010. 2016

ROZDZINSKI E, KERN W, SCHMEISER T, KURRLE E. ***Corynebacterium jeikeium* bacteraemia at a tertiary care center.** *Infection.* 1991;19:201-204.

SAGDIÇ O, ÖZKAN G, ÖZCAN M, ÖZÇELİK S. **A Study on Inhibitory Effects of Sı:la Tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) Storax Against Several Bacteria.** Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Erciyes University, 38039 Kayseri, Turkey. *Res.* 19, 549–551 (2005).

SCAND J INFECT DIS. (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. 1995; 27: 581-584.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; SIMON, D. ***O guia decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita.*** Rio de Janeiro: Campus, 2001.

SOUZA, M.C., et al. **Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.107, p. 486-93, 2012.

TREERATANAPIBOON L. et al. **Bioactive 4-hydroxycinnamide and bioactivities of *polyalthia cerasoides*.** *EXCLI Journal* 2011;10:16-22.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** *Química Nova.* v. 24, n.1. 2001. p. 147-1

Anexo B: Publicação de capítulo em informativo de publicação digital- SABBADINI, Priscila Soares; VIANA, Pamela Ruth Santos; LEITE, Denes Sousa; SOARES, Thalita Rodrigues; NERY, Victor Saruk Corrêa; FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo; ALVES, Marcia Barros. Difteria em países latino americanos e imigração para o Brasil. Boletim Informativo do Núcleo de Estudo em Gestão de Saúde, v. 4, Boletim Informa, 2019.

BOLETIM DO NÚCLEO
DE ESTUDO EM
GESTÃO DA SAÚDE

v. 4 n. 1 | julho-outubro 2019.

DIFTERIA EM PAÍSES LATINO-AMERICANOS E IMIGRAÇÃO PARA O BRASIL.

A difteria é uma doença potencialmente contagiosa e letal, cujas lesões características são pseudomembranas branco-acinzentadas aderentes ao trato respiratório (Figura 1) (1).



Figura 1 - Pseudomembrana na difteria
Fonte: <https://www.researchgate.net>

Apesar do principal agente causador ser a bactéria *Corynebacterium diphtheriae* (Figura 2), alguns países, principalmente os europeus, relataram o aumento do número de casos da doença por *Corynebacterium ulcerans*, com ocorrência a partir da transmissão do micro-organismo de animais domésticos para o homem (2).

BOLETIM DO NÚCLEO
DE ESTUDO EM
GESTÃO DA SAÚDE

v. 2 n. 1 | dez. 2018/març. 2019.

3- Ministério da Saúde. Orientações sobre Vacinação [acesso em 23 mai 2019]. Disponível em <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/vacinacao/orientacoes-sobre-vacinacao>.

4-Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis (Brasil). Nota Informativa nº 9, de 12 de fevereiro de 2019. Presta informações sobre os surtos por difteria na região das Américas, risco de ocorrência de difteria e a importância da prevenção contra a doença.

5- Organización Panamericana de la Salud (OPAS). Actualización Epidemiológica Difteria. Resumen de la situación en las Américas, 2019.

6- Santos LS, et al. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. *Epidemiol Infect.*, 2015; 143:791-798.

Autores: Priscila Soares Sabbadini^{1,2}; Pamela Ruth Santos Viana¹; Denes Sousa Leite²; Thalita Rodrigues Soares¹; Victor Saruk Correa Nery³; Wellyson da Cunha Araújo Firmo³; Marcia Barros Alves⁴

¹Docente do Curso de Biomedicina da Universidade Ceuma, São Luís – MA; ²Docente do Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte; ³Discente do Curso de Biomedicina da Universidade Ceuma; ⁴Discente do Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte

Anexo C:

Artigo científico publicado- Pâmela Ruth Santos Viana, Denes Sousa Leite, Victor Elias Mouchrek Filho, Dionney Andrade de Sousa, Ana Luíza de Mattos Guaraldi, Márcia Barros Alves, Wellyson Araújo da Cunha Firmo, Priscila Soares Sabbadini. Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. essential oil against *Corynebacterium ulcerans*. Revista Ciência e Natura da Universidade Federal de Santa Maria, RS., 2020.


CIÊNCIA e NATURA

HOME ABOUT LOGIN REGISTER SEARCH CURRENT ARCHIVES ANNOUNCEMENTS THESIS ABSTRACTS

Home > Vol 42 (2020) > Viana

Universidade Federal de Santa Maria
 Ci e nat., Santa Maria, v. 42, Esp. Ed.: UNICEUMA, e9, 2020
 DOI: 10.5902/217949041995
 ISSN 2178-460X
 Received: 03/12/2019 Accepted: 03/12/2019 Published: 09/10/2020



Environment

Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. essential oil against *Corynebacterium ulcerans*

Pâmela Ruth Santos Viana^I
 Denes Sousa Leite^{II}
 Victor Elias Mouchrek Filho^{III}
 Dionney Andrade de Sousa^{IV}
 Ana Luíza de Mattos-Guaraldi^V
 Márcia Barros Alves^{VI}
 Wellyson da Cunha Araújo Firmo^{VII}
 Priscila Soares Sabbadini^{VIII}

^I Universidade CEUMA, São Luis, Brasil; e-mail: ruthviana799@gmail.com;

^{II} Universidade CEUMA, São Luis, Brasil; e-mail: denesousa27@gmail.com;

^{III} Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Brasil; e-mail: victormouchrek@ufma.br;

^{IV} Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Brasil; e-mail: dionneyandrade@ufma.br;

^V Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; e-mail: aguaraldi@gmail.com;

^{VI} Universidade CEUMA, São Luis, Brasil; e-mail: marcia_barros16@hotmail.com;

^{VII} Universidade CEUMA, São Luis, Brasil; e-mail: well_firmo@hotmail.com;

^{VIII} Universidade CEUMA, São Luis, Brasil; e-mail: priscila.sabbadini@ceuma.br

ABSTRACT

Multiresistant strains of *Corynebacterium ulcerans* highlight the necessity of researches in new drugs and the pharmacological use of essential oils (EO) could be a therapeutic alternative. Thus, this study aimed to evaluate the antibacterial activity and the effect of subinhibitory concentration of AZEO on bacterial morphology and biofilm formation on polystyrene surface by *C. ulcerans* isolated in dogs. The AZEO was obtained by steam distillation from the leaves of the plant. The phosphomolybdenum and hemolysis inhibition tests were made to analyse, respectively, the antioxidant and toxicity activity. It was determined the minimum inhibitory and bactericide concentrations (Δ MIC and MBC) of AZEO on *C. ulcerans* strains and from these results tests were made with subinhibitory concentrations of AZEO. The inactivation of phosphomolybdenum complex by AZEO was lower than 1% and the hemolytic capacity was low. The antimicrobial study results indicated that AZEO inhibited growth of both tested microbial strains. Bacterial filamentation was observed in AZEO presence, as well as bacterial autoaggregation. There was significant difference in biofilm inhibition. We suggest that *A. zerumbet* may represent an alternative therapy to control *C. ulcerans*-induced bacterial infections.

KEYWORDS: ANTIOXIDANT; FILAMENTATION; AUTOAGGREGATION

Anexo D:

Artigo científico publicado-Danyelle Cristina Pereira Santos, Paulo Dyago Borges Gomes, Denes Sousa Leite, Beatriz Gomes Vila Nova, Marcia Barros Alves, Pamela Ruth Santos Viana, Juliana Alves Rodrigues, Ana Luiza de Mattos Guaraldi, Priscila Soares Sabbadini, Wellyson da Cunha Araújo Firmo. Bioprospecção das atividades antioxidante, antibacteriana e antibiofilme contra *Corynebacterium ulcerans* e toxicidade de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. Revista Scientia Plena. 2020.



SCIENTIA PLENA
www.scientiaplena.org.br

VOL. 16, NUM. 10

2020

doi: 10.14808/sci.plena.2020.104501

Bioprospecção das atividades antioxidante, antibacteriana e antibiofilme contra *Corynebacterium ulcerans* e toxicidade de *Stryphnodendron coriaceum* Benth

Bioprospecting of antioxidant, antibacterial and antibiofilm activities against *Corynebacterium ulcerans* and toxicity of *Stryphnodendron coriaceum* Benth

D. C. P. Santos^{1*}; P. D. B. Gomes¹; D. S. Leite¹; B. G. V. Nova¹; M. B. Alves^{1,2}; P. R. S. Viana^{1,3}; J. A. Rodrigues¹; A. L. Mattos-Guaraldi⁴; P. S. Sabbadini^{1,2}; W. C. A. Firmo^{1,3*}

¹Laboratório de Doenças Bacterianas Respiratórias e Sistêmicas, Universidade Ceuma, 65075-120, São Luis-MA, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luis-MA, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luis-MA, Brasil

⁴Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

*well_firmo@hotmail.com

(Recebido em 15 de junho de 2020, aceite em 29 de outubro de 2020)

Objetivo do estudo foi avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e antibiofilme contra *Corynebacterium ulcerans* e toxicidade do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBH) de *Stryphnodendron coriaceum* Benth (barbatimão). As folhas de *S. coriaceum* foram submetidas a maceração com álcool a 70%. Avaliou-se a atividade antioxidante pelos métodos do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e redução do complexo de fosfomolibdênio. A atividade antibacteriana foi medida por microdiluição (1:2) para as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) e a inibição da formação de biofilme em cinco isolados clínicos e um amostra padrão de *C. ulcerans*. O estudo da toxicidade foi realizado por testes de hemólise, alelopatia e *Tenebrio molitor*. O EBH apresentou capacidade antioxidantes, capturando 50,7% do DPPH na concentração de 0,37 µg/mL e reduzindo 21,99% do fosfomolibdênio. A CIM observada foi de 500 µg/mL para as amostras, exceto a amostra 809, e o EBH não apresentou aspecto bactericida (CBM). A amostra CDC KC 279 diminuiu a formação do biofilme com interferência do EBH, enquanto, a amostra 2649 sofreu aumento (estatisticamente significativa). A concentração eficiente para hemolisar 50% das hemácias foi de 460,6±0,03881 µg/mL. No teste alelopático, as sementes apresentaram baixa germinação e não houve diminuição na velocidade de crescimento das radículas em contato com o EBH. A taxa média de sobrevivência de *T. molitor* foi 60% no grupo da maior concentração, sem significância estatística (p=0,752) com o controle, essas características sugerem baixa toxicidade. A espécie vegetal em estudo, apresenta propriedades farmacológicas importantes, que pode levar a formulação de produtos terapêuticos, estudos complementares são necessários.

Palavras-chave: corinebactérias, ensaios biológicos, plantas medicinais

The objective of the study was to evaluate the antioxidant, antibacterial and antibiofilm activities against *Corynebacterium ulcerans* and the toxicity of the Crude Hydroalcoholic Extract (CHE) of *Stryphnodendron coriaceum* Benth (barbatimão). The leaves of *S. coriaceum* were subjected to maceration with 70% alcohol. The antioxidant activity by the methods of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and reduction of the phosphomolybdenum were reported. Antibacterial activity was measured by microdilution (1:2) for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal (MBC) and inhibition of biofilm formation in five clinical strains and a standard *C. ulcerans* test. The toxicity study was carried out by tests of hemolysis, allelopathy and *Tenebrio molitor*. EBH has antioxidant capacity, capturing 50.7% of DPPH at a concentration of 0.37 µg/mL and 21.99% of phosphomolybdenum. The MIC observed was 500 µg/mL for all strains, except of strains 809, and the CHE does not have a bactericidal aspect (MBC). The CDC KC 279 standard decreased the biofilm formation with CHE interference, while a 2649 strain increased (statistically significant). The efficient concentration for hemolysing 50% of the red blood cells was