



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

KELLY DE SOUSA MONTEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO

BRASÍLIA, DF

2019

KELLY DE SOUSA MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientadora: Farmacêutica, Erika da Silva Monteiro

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M775a Monteiro, Kelly de Sousa
Avaliação da atividade antibacteriana e antioxidante de
óleo essencial de alecrim do campo / Kelly de Sousa
Monteiro; orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador
Érika da Silva Monteiro. -- Brasília, 2019.
63 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Atividade antibacteriana. 2. antioxidante. 3. óleo
essencial. 4. Baccharis dracunculifolia. I. Orsi, Daniela
Castilho, orient. II. Monteiro, Érika da Silva, co-orient.
III. Título.

KELLY DE SOUSA MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Ms. Daniel Oliveira Freira
(Faculdade LS/ Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é meu guia e protetor, e quem permitiu que tudo isso fosse possível.

Aos meus pais, que estiveram comigo em todo momento me dando todo o apoio necessário e não mediram esforços para me proporcionar sempre o melhor. Obrigada, por todos os ensinamentos e valores que me foram passados ao decorrer dos anos, foi com vocês que eu aprendi bons princípios, como honestidade, compaixão, coragem, fé e amor.

As minhas irmãs pelo carinho, lealdade e companheirismo.

A minha orientadora Professora, Dra. Daniela Castilho, pessoa admirável e extremamente competente, que me acolheu e me ajudou em tudo que foi necessário para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Érika Monteiro, por toda ajuda e ensinamentos para que esse trabalho fosse realizado.

Aos professores, Christopher William Fagg e Eliana Fortes Gris pela ajuda.

Aos amigos e colegas que conheci durante a graduação que me proporcionaram momentos de alegria. Em especial aos amigos Gabriela, Hugo e Samuel, pelo companheirismo, ajuda, e por todas as risadas que me proporcionaram no decorrer do curso.

A Universidade De Brasília, Faculdade de Ceilândia, pelo espaço fornecido para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A espécie *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim do campo apresenta em seu óleo essencial diversos metabólitos secundários de grande importância para indústria farmacêutica, por possuir atividade antibacteriana e antioxidante. Levando em consideração o aumento da resistência aos antimicrobianos e a importância da busca por novos antimicrobianos, o presente trabalho teve o objetivo de determinar a atividade antibacteriana e antioxidante de dois óleos essenciais de alecrim do campo, um coletado no Distrito Federal (região Centro Oeste) e outro proveniente de Mogi Mirim, São Paulo (região Sudeste). Para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizados os métodos de difusão em disco e microdiluição para encontrar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados da atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco para os óleos de alecrim do campo mostraram atividade antimicrobiana para as bactérias gram positivas testadas (halos de 19,4-32,0 mm). No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos gram negativos testados. Os óleos essenciais apresentam dificuldade de se difundir uniformemente pelo meio de cultura devido à sua natureza hidrofóbica, tornando o método de difusão em ágar questionável na determinação da sua atividade antimicrobiana. No método de microdiluição em caldo os resultados mostraram valores de CIM de 0,03 a 0,15 mg/mL e valores de CBM de 0,03 a 0,20 mg/mL para as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 e *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. O óleo da região Centro Oeste apresentou-se mais efetivo sobre todas as cepas testadas, apresentando menores valores de CIM e CBM e também apresentou maiores valores de atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em relação ao óleo da região Sudeste. As diferenças de atividade antibacteriana e antioxidante observadas podem ser atribuídas à diferença de composição química dos óleos testados, que varia com época de colheita e localidade.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia, popularly known as field rosemary, has in its essential oil several secondary metabolites of great importance to the pharmaceutical industry, due to its antibacterial and antioxidant activity. Considering the increase of antimicrobial resistance and the importance of searching for new antimicrobials, the present work aimed to determine the antibacterial and antioxidant activity of two field rosemary essential oils, one collected in the Federal District (Brazilian Cerrado biome) and another from Mogi Mirim, São Paulo (Southeast region). For the determination of antibacterial activity, disk diffusion and microdilution methods were used to find the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Results of antimicrobial activity by disc diffusion assay for field rosemary oils showed antimicrobial activity for gram positive bacteria tested (halos 19.4-32.0 mm). However, there was no antimicrobial activity for the gram-negative microorganisms tested. Essential oils have difficulty diffusing evenly through the culture medium due to their hydrophobic nature, making the agar diffusion method questionable in determining their antimicrobial activity. The broth microdilution method the results showed MIC values from 0.03 to 0.15 mg/mL and MBC values from 0.03 to 0.20 mg/mL for the bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 and *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. The oil from the Brazilian Cerrado region was more effective on all bacteria tested, presenting lower MIC and MBC values and showed higher values of antioxidant activity and phenolic compounds content compared to oil from the Southeast region. The differences in antibacterial and antioxidant activity observed can be attributed to the difference in chemical composition of the tested oils, which varies with harvest time and location.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*, essential oil, antimicrobial activity, antioxidant activity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC).....	13
1.2. Composição do óleo essencial de alecrim do campo.....	13
1.3. Métodos de extração dos óleos essenciais.....	15
1.4. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	15
1.5. O problema da resistência aos antimicrobianos e a necessidade da busca por novos agentes antimicrobianos	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. JUSTIFICATIVA	20
4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1. Obtenção dos óleos essenciais de alecrim do campo.....	24
5.2. Preparo dos inóculos bacterianos	25
5.3. Estudo da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim do campo por ensaio de difusão em disco.....	25
5.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim do campo	26
5.5. Determinação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de alecrim do campo	28
5.5.1. Teor de Compostos fenólicos pelo método de Folin-Denis.....	28
5.5.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	28
5.5.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	29
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1. Rendimento do óleo essencial de alecrim do campo	29
6.2. Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos óleos essenciais de alecrim do campo	30
6.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim do campo	32
6.4. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais dos óleos essenciais de alecrim do campo	34
7. CONCLUSÃO.....	35

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO	36
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	39
10. ANEXOS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco para os óleos de alecrim do campo.....	30
Tabela 2 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim do campo.....	31
Tabela 3 - Determinação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de alecrim do campo.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Determinação de CIM para o óleo de alecrim do campo utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular.....	27
Figura 2. Redução da resazurina em resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas.....	27
Figura 3. Esquema do processo de obtenção do óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.....	29

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos óleos essenciais de alecrim do campo	45
ANEXO 1.1. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Centro Oeste com as bactérias <i>S. aureus</i>, <i>B. cereus</i> e <i>S. mutans</i>	45
ANEXO 1.2. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Centro Oeste com as bactérias <i>P. aeruginosa</i>, <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	45
ANEXO 1.3. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Sudeste com as bactérias <i>S. aureus</i>, <i>S. mutans</i> e <i>B. cereus</i>	46
ANEXO 1.4. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Sudeste com as bactérias <i>E. coli</i>, <i>S. enteritidis</i> e <i>P. aeruginosa</i>	47
ANEXO 2- Testes de CMB dos óleos essenciais de alecrim do campo	48
ANEXO 2.1 – Imagens das placas com <i>S. aureus</i> ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; (+) = controle positivo; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL 6- 0,05 mg/mL; 7- 0,04 mg/mL e 8- 0,03 mg/mL	48
ANEXO 2.2 – Imagens das placas com <i>S. mutans</i> ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL, 4- 0,10 mg/mL	48
ANEXO 2.3 – Imagens das placas com <i>B. cereus</i> ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,10 mg/mL; 4- 0,08 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	49
ANEXO 2.4 – Imagens das placas com <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,25 mg/mL; 3- 0,20 mg/mL; 4- 0,15 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	49
ANEXO 2.5 – Imagens das placas com <i>E. coli</i> ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	50
ANEXO 2.6 – Imagens das placas com <i>S. enteritidis</i> ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15	

mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	50
ANEXO 2.7 – Imagens das placas com <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	51
ANEXO 2.8 – Imagens das placas com <i>S. faecalis</i> ATCC 29212 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL	51
ANEXO 2.9 – Imagens das placas com <i>S. aureus</i> ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL.....	52
ANEXO 2.10 – Imagens das placas com <i>S. mutans</i> ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	52
ANEXO 2.11 – Imagens das placas com <i>S. faecalis</i> ATCC 29212 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	53
ANEXO 2.12 – Imagens das placas com <i>S. enteriditis</i> ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	53
ANEXO 2.13 – Imagens das placas com <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	54
ANEXO 2.14 – Imagens das placas com <i>E. coli</i> ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; 5- 0,04 mg/mL e 6- 0,03 mg/mL.....	54
ANEXO 2.15 – Imagens das placas com <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo	55

ANEXO 2.16 – Imagens das placas com <i>B. cereus</i> ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,04 mg/mL; 2- 0,03 mg/mL; 3- 0,02 mg/mL; 4-0,01 mg/mL	55
ANEXO 3- NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS - 2,2 azinobis-3-etilbenzolina-6-ácido sulfônico
- ATCC- American Type Culture Collection
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CBM – Concentração bactericida mínima
- CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
- DPPH - 2,2-difenil-picril-hidrazil
- ESBL- β -lactamases de espectro estendido
- KPC- *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase
- MRSA- Staphylococcus aureus resistente à meticilina
- UFC- Unidades formadoras de colônia

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* DC)

Baccharis dracunculifolia DC, popularmente conhecida como “alecrim do campo”, “vassourinha” ou “vassoura” é uma planta nativa do Brasil, mais especificamente das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, comum principalmente em campos abertos e pastagens abandonadas, sendo encontrada ainda em outras regiões da América do Sul, como Argentina, Bolívia e Uruguai (SANTOS et al., 2012, MACHADO. et al., 2015).

A espécie *Baccharis Dracunculifolia* DC é um arbusto que cresce em média 2 a 3 metros, que se reproduz por sementes (aquênios), apresenta caules bastante ramificados, cobertos por tricomas que se encontram agrupados e distribuídos regularmente pelo limbo e ápices foliares (BERNARDES, 2014; SANTOS et al., 2012, MACHADO et al., 2015).

A família *Asteraceae*, a qual pertence plantas como o alecrim do campo (*B. dracunculifolia*) e a carqueja (*B. reticularia*), tem sido amplamente estudada quanto à composição química e atividade biológica (MEDEIROS, 2014). Aos diferentes extratos e óleo essencial destas espécies são atribuídas diversas atividades: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiulcerogênica, leishmanicida e antimalárica (SFORCIN, 2012; MEDEIROS, 2014).

1.2. Composição do óleo essencial de alecrim do campo

Os óleos essenciais apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários que possuem uma variedade de atividades e efeitos tanto para as plantas que os originam como para os animais e seres humanos que entram em contato com essas substâncias (MEDEIROS, 2014). Os óleos essenciais são de grande importância para a indústria farmacêutica e de perfumes, devido sua fragrância e atividades antibacteriana e antioxidante (SILVEIRA et al., 2012).

A composição dos óleos essenciais varia dependendo da região geográfica e do processo de extração utilizado. Outros fatores como clima, época do ano, ataque de patógenos e fatores genéticos também influenciam no tipo de material obtido (SOARES et al. 2013; MEDEIROS, 2014). Os óleos essenciais de muitas plantas

aromáticas do Cerrado brasileiro são compostos principalmente por terpenos e terpenoides. Em análises da composição de alguns óleos essenciais obtidos de plantas nativas do Cerrado brasileiro (*Psidium myrsinites* Mart. ex DC. (Araçá-bravo), *Hyptis* sp., *Psidium laruotteanum* Cambess (Araçá-cascudo) e *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer) foi possível observar que sesquiterpenos são mais frequentes que os monoterpenos, em especial os isômeros de cariofileno, biciclogermacreno, espatulenol e germacreno (MEDEIROS, 2014). Os metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais, destacando-se os flavonoides, alcaloides, taninos e terpenos propiciam bioatividades como antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana, sendo, portanto, de grande interesse para a indústria farmacêutica (BAG et al., 2012)

O óleo essencial obtido da espécie *B. dracunculifolia* apresenta composição bastante variada. Enquanto, Boix et al. (2010) encontraram os compostos verbenona (10,1%), mirceno (10,2%), 1,8-cineol (10,4%) e a cânfora (25,2%) como constituintes principais do óleo essencial de *B. dracunculifolia* coletada na costa sudeste do Brasil, outros trabalhos relataram o E-nerolidol como composto majoritário, como no trabalho de Schossler et al. (2009), que encontraram os compostos E-nerolidol (22,80%) mais o β -Pineno (12,17%) como constituintes majoritários do óleo essencial de *B. dracunculifolia* coletada na cidade de Guaíba, RS, Brasil.

Parreira et al. (2010) encontraram o (E)-nerolidol (33,51%) e o espatulenol (16,24%) como constituintes predominantes do óleo essencial de alecrim do campo coletado do município de Franca, SP. Santos et al. (2012) também identificaram no óleo essencial de alecrim do campo coletado do município de Botucatu, SP os sesquiterpenos E-nerolidol (33,81%) e espatulenol (18,96%), além de outras substâncias em menor quantidade como: α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, E-pinocarveol, mirtenol, E-cariofileno, β -santaleno, oxido de cabreuva B, γ -muuroleno, valenceno, δ -cadineno, isômero de nerolidol, E-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol, khusimona, β -oplopenona, epi- α -cadinol, β -murolol, cubenol, 14-hidroxi-(z)-cariofileno e eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol.

1.3. Métodos de extração dos óleos essenciais

O Cerrado brasileiro apresenta-se como uma rica fonte de metabólitos bioativos. Apesar da maior parte das pesquisas nessa área estarem voltadas a avaliação de extratos aquosos ou alcoólicos, alguns óleos essenciais já são conhecidos por suas atividades biológicas (MEDEIROS, 2014).

A extração dos óleos essenciais se dá por diferentes métodos. Alguns dos métodos de extração utilizados são: destilação a vapor, hidrodestilação, extração por solventes orgânicos e extração por fluido supercrítico (NAVARRETE et al., 2011). Os métodos mais comumente utilizados para extrair os óleos essenciais são a destilação a vapor e a extração com solventes (SILVEIRA et al. 2012)

Na extração por arraste de vapor o material vegetal a ser extraído, geralmente é moído ou triturado, e colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, arrastando os óleos essenciais pelo vapor de água e conduzindo a mistura de vapores a um condensador, onde os vapores voltam ao estado líquido, sendo então separados do óleo pela diferença de densidade (SILVA, 2011).

Durante a extração do óleo essencial de *B. dracunculifolia* por arraste a vapor d'água, a maior parte do óleo (em torno de 60% que é constituída principalmente por monoterpenos) é extraído durante a primeira hora de destilação, enquanto que depois, é extraída a fração composta por moléculas mais pesadas (principalmente os sesquiterpenos que são de maior interesse comercial) (SOUSA et al., 2009). A medida que o tempo de destilação aumenta, a porcentagem dos componentes principais de alguns óleos é modificada (CANNON et al. 2013)

1.4. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais é evidenciada em vários estudos, e acredita-se que a capacidade antibacteriana dos óleos essenciais esteja relacionada a danos estruturais e funcionais que estes causam na membrana citoplasmática das bactérias, pois os óleos essenciais são geralmente lipofílicos e desta forma, acabam acumulando-se na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, gerando um aumento de permeabilidade, o que acaba por afetar a

manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (MOUSSAOUI; ALAQUI, 2016; JYOTHI; SESHAGIRI, 2012). No estudo de Cox et al. (2001) que avaliaram o mecanismo de atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, os autores concluíram que o efeito letal do óleo essencial de melaleuca é causado principalmente pela inibição de eventos metabólicos localizados na membrana celular e pela perda do controle quimiosmótico da célula.

A inibição da atividade enzimática bacteriana também foi identificada como um mecanismo antibacteriano exercido por componentes de óleos essenciais tais como o cinamaldeído, o eugenol e o carvacrol. Gill e Holley (2006) avaliaram a capacidade destes três compostos, observando inibição de ATPase em membranas de *E. coli* e *L. monocytogenes*. O alil isotiocianato, composto presente no óleo essencial de mostarda também foi avaliado quanto à inibição enzimática. Luciano e Holley (2009) testaram o efeito do alil isotiocianato na inibição da enzima tioredoxina redutase em *E. coli* O157:H7 e observaram que a atividade inibitória desta substância contra *E. coli* pode estar relacionada à inibição da síntese de DNA.

Salazar et al. (2018) avaliaram a atividade antibacteriana e a atividade sinérgica frente a antibióticos do óleo essencial de *B. dracunculifolia*. O óleo modulou sinérgicamente o antibiótico norfloxacin contra *P. aeruginosa* e reduziu a concentração inibitória mínima (CIM) de Gentamicina de 20,16 para 4,00 µg/mL e de Ampicilina de 645,10 a 512,00 µg/mL. O óleo essencial alterou ainda sinérgicamente a atividade da Norfloxacin contra *E. coli* com uma redução de concentração inibitória mínima de 40,32 para 3,17 µg/mL e uma redução de CIM de Gentamicina de 50,80 para 25,40 µg/mL. O óleo essencial também apresentou sinérgismo contra o *S. aureus* e quando associado à Norfloxacin, apresentou uma redução de CIM de 322,54 para 203,20 µg/mL, enquanto quando associada à Ampicilina, demonstrou sinérgismo reduzindo a CIM de 80,60 para 20,16 µg/mL.

O estudo de Luchesi (2017), que buscou avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante de óleos essenciais, reportou a atividade antibacteriana do óleo essencial de *B. dracunculifolia*, principalmente frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*.

1.5. O problema da resistência aos antimicrobianos e a necessidade da busca por novos agentes antimicrobianos

Resistência antimicrobiana é um termo amplo, que engloba a resistência não só de bactérias, mas também de micobactérias, fungos, e parasitas frente à fármacos (WHO, 2019). As bactérias podem manifestar resistência intrínseca (inerente), ou seja, mecanismos de resistência naturais, como resultado de uma característica funcional ou estrutural de um gênero ou espécie bacteriana, ou podem expressar resistência adquirida, originada a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outras bactérias (BAPTISTA, 2013, COSTA, 2016). Assim, a evolução de cepas resistentes é um fenômeno que ocorre quando microrganismos se replicam de forma errônea ou quando genes de resistência são trocados entre eles (WHO, 2019).

O surgimento frequente de novas linhagens bacterianas resistentes tem se tornado um problema de saúde pública mundial (ECDC, EMEA 2009). A resistência antimicrobiana é uma situação alarmante ultimamente, e se deve principalmente ao uso indiscriminado e indevido de antimicrobianos e a práticas deficientes no controle de infecções hospitalares, que tem permitido a disseminação de microrganismos resistentes que antes encontravam-se apenas em ambiente hospitalar ao ambiente comunitário (WHO, 2019).

A família *Enterobacteriaceae* tem merecido atenção especial nos últimos anos por estar entre os microrganismos mais isolados na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica, e por apresentar diversos mecanismos de resistência, sendo o principal mecanismo de resistência a produção de betalactamases, que agem contra os fármacos beta-lactâmicos (OLIVEIRA, et al. 2011). As espécies de *Klebsiella* spp., pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, merecem atenção especial devido a seus variados mecanismos de resistência. A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo largamente distribuído na natureza e no trato gastrointestinal. É uma bactéria oportunista, que pode causar pneumonias primárias em pacientes imunocomprometidos, que estão sujeitos a inúmeros fatores de risco (OLIVEIRA. et al, 2011; BEN-DAVID et al., 2011).

Durante as últimas décadas, observou-se um aumento na propagação de perfis de resistência ESBL (*Extended-Spectrum β -Lactamase*) em *K. pneumoniae*. As bactérias ESBL produzem β -lactamases codificadas por genes plasmidiais que

conferem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas de terceira geração, mas não as cefamicinas e carbapenêmicos. Então, para o controle das infecções passou-se a fazer uso, em larga escala, de antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, tais como imipenem e meropenem. A partir de 2001, surgiram as cepas CRKP (*Carbapenem-resistant K. pneumoniae*) ou KPC. Hoje as cepas KPC são encontradas com frequência em unidades hospitalares em todo o mundo (BLAIR et al., 2015).

Um dos principais agentes etiológicos de infecções microbianas é o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria encontrada normalmente no corpo humano em interação biológica de comensalismo, mas em situações em que o paciente se encontra fragilizado, este microrganismo se torna oportunista e passa a expressar seu potencial de virulência (BREVES et al., 2015). A partir da década de 70, o *S. aureus* passou a ser um patógeno emergente nas infecções hospitalares, pois as cepas isoladas apresentavam resistência aos antibióticos β -lactâmicos. As cepas com este perfil de resistência foram denominadas de MRSA (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*). Houve rápida disseminação das cepas MRSA nos ambientes hospitalares e estas se apresentavam sensíveis apenas aos antimicrobianos: vancomicina e teicoplanina, que são nefrotóxicos (ZUO et al., 2008).

Nos últimos 10 anos, as cepas de *S. aureus* MRSA, que eram restritas ao ambiente hospitalar, passaram a ser isoladas em pacientes com infecção de pele na comunidade, sem relato de internação nos últimos meses. Esta nova cepa foi denominada de CA-MRSA (*Community-associated MRSA*) (BENOIT et al., 2008). E atualmente algumas cepas de *S. aureus* já se apresentam resistentes à vancomicina (UDWADIA et al., 2011).

Esses fatos intensificam a ineficiência ascendente dos agentes antimicrobianos fornecidos no mercado atual e reforçam a necessidade da disponibilização de novos agentes terapêuticos antimicrobianos. Apesar dos antibacterianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso. Para isso adotam a estratégia do sinergismo, um mecanismo onde dois diferentes compostos são combinados para aumentar suas atividades individuais. Essa estratégia tem servido de inspiração para as pesquisas voltadas a descoberta de compostos que tem como finalidade atuar nos mecanismos de resistência bacteriana, minimizando-os (HEMAISWARYA et al., 2008). Por este motivo, atualmente várias pesquisas atuam nas áreas de produtos naturais,

explorando possíveis alternativas no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis (SILVA, 2013).

1.6. Atividade antioxidante

Os antioxidantes são de grande interesse para a indústria alimentícia e cosmética, a fim de evitar a deterioração de produtos (ANDRADE et al., 2012). As oxidações nos alimentos causam alterações nas características sensoriais, reduzem o valor nutricional, e podem ainda resultar na formação de compostos potencialmente tóxicos (HUSSEIN et al., 2013). A crescente demanda por produtos mais naturais, com diminuição de aditivos sintéticos, impulsiona estudos que buscam explorar diferentes propriedades de óleos essenciais extraídos de plantas, dentre elas a atividade antioxidante (DANNENBERG et al., 2016). Há suspeitas de que os antioxidantes sintéticos sejam carcinogênicos, portanto a substituição ou redução de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais em alimentos é uma boa alternativa (ANDRADE et al., 2012) A atividade antioxidante dos óleos essenciais de diferentes espécies vegetais é atribuída principalmente a presença de compostos fenólicos nos óleos essenciais. Estes compostos atuam como doadores de hidrogênio ao radical livre, dando origem a um radical estável (SILVA, 2011). Os compostos fenólicos dividem-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (SILVA et al., 2010). Para avaliar a atividade antioxidante in vitro utilizam-se métodos espectrofotométricos, dentre eles os mais utilizados são: o método do DPPH• radical (2,2-difenil-1-picrihidrazil), o sistema β -caroteno/ácido linoleico (BCAL) e o método do ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (BERGAMASCHI, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante de dois óleos essenciais de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*): um coletado no Distrito Federal (região Centro Oeste) e outro proveniente de Mogi Mirim, São Paulo (região Sudeste).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar estudo da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim do campo empregando ensaio de difusão em disco
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim do campo
- Determinar a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de alecrim do campo

3. JUSTIFICATIVA

A questão da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais torna urgente a busca por novos fármacos antimicrobianos. As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição variados constituintes metabólitos secundários, são apontadas como excelentes alvos de busca por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana. Assim, esse trabalho visa avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) coletado na região do Distrito Federal e também comparar os resultados com outro óleo essencial de alecrim do campo proveniente de Mogi Mirim, São Paulo.

4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO

Kelly de Sousa Monteiro, Érika da Silva Monteiro, Daniela Castilho Orsi
Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de
Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

RESUMO

A espécie *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim do campo apresenta em seu óleo essencial diversos metabólitos secundários de grande importância para indústria farmacêutica, por possuir atividade antibacteriana e antioxidante. Levando em consideração o aumento da resistência aos antimicrobianos e a importância da busca por novos antimicrobianos, o presente trabalho teve o objetivo de determinar a atividade antibacteriana e antioxidante de dois óleos essenciais de alecrim do campo, um coletado no Distrito Federal (região Centro Oeste) e outro proveniente de Mogi Mirim, São Paulo (região Sudeste). Para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizados os métodos de difusão em disco e microdiluição para encontrar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados da atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco para os óleos de alecrim do campo mostraram atividade antimicrobiana para as bactérias gram positivas testadas (halos de 19,4-32,0 mm). No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos gram negativos testados. Os óleos essenciais apresentam dificuldade de se difundir uniformemente pelo meio de cultura devido à sua natureza hidrofóbica, tornando o método de difusão em ágar questionável na determinação da sua atividade antimicrobiana. No método de microdiluição em caldo os resultados mostraram valores de CIM de 0,03 a 0,15 mg/mL e valores de CBM de 0,03 a 0,20 mg/mL para as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 e *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. O óleo da região Centro Oeste apresentou-se mais efetivo sobre todas as cepas testadas, apresentando menores valores de CIM e CBM e também apresentou maiores valores de atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em relação ao óleo da região Sudeste. As diferenças de atividade antibacteriana e antioxidante observadas podem ser atribuídas à diferença de composição química dos óleos testados, que varia com época de colheita e localidade.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia, popularly known as field rosemary, has in its essential oil several secondary metabolites of great importance to the pharmaceutical industry, due to its antibacterial and antioxidant activity. Considering the increase of antimicrobial resistance and the importance of searching for new antimicrobials, the present work aimed to determine the antibacterial and antioxidant activity of two field rosemary essential oils, one collected in the Federal District (Brazilian Cerrado biome) and another from Mogi Mirim, São Paulo (Southeast region). For the determination of antibacterial activity, disk diffusion and microdilution methods were used to find the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Results of antimicrobial activity by disc diffusion assay for field rosemary oils showed antimicrobial activity for gram positive bacteria tested (halos 19.4-32.0 mm). However, there was no antimicrobial activity for the gram-negative microorganisms tested. Essential oils have difficulty diffusing evenly through the culture medium due to their hydrophobic nature, making the agar diffusion method questionable in determining their antimicrobial activity. The broth microdilution method the results showed MIC values from 0.03 to 0.15 mg/mL and MBC values from 0.03 to 0.20 mg/mL for the bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 and *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. The oil from the Brazilian Cerrado region was more effective on all bacteria tested, presenting lower MIC and MBC values and

showed higher values of antioxidant activity and phenolic compounds content compared to oil from the Southeast region. The differences in antibacterial and antioxidant activity observed can be attributed to the difference in chemical composition of the tested oils, which varies with harvest time and location.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*, essential oil, antimicrobial activity, antioxidant activity

INTRODUÇÃO

Baccharis dracunculifolia DC. é uma planta popularmente conhecida como alecrim do campo e ocorre naturalmente no Brasil. Os ápices foliares de *B. dracunculifolia* apresentam um grande número de tricomas glandulares que proporcionam elevada secreção de material resinoso incluindo flavonóides, terpenos e óleos essenciais (VEIGA et al, 2017). O alecrim do campo destaca-se por se associar a muitos insetos herbívoros. Em geral, os compostos secundários das plantas são tóxicos e inibem o ataque de insetos. Entretanto, alguns herbívoros coletam esses compostos para sua própria defesa, como as abelhas de espécie *Apis mellifera*, que coletam e transportam os ápices foliares de *B. dracunculifolia* para o interior da colmeia, para a produção da própolis verde que auxilia na defesa da colmeia contra seus próprios predadores (BANKOVA et al., 2014).

Portanto, tanto a própolis verde quanto o óleo essencial do alecrim do campo apresentam uma grande variedade de constituintes fitoquímicos com atividade biológica. A composição do óleo essencial da *B. dracunculifolia* depende da região geográfica e do processo de extração utilizado (PARREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2016; RAMOS et al., 2016; VEIGA et al, 2017). O óleo essencial de alecrim do campo coletado do município de Franca, SP, foi composto principalmente por sesquiterpenos e monoterpenos, com a presença de nerolidol (33,51%), espatulenol (16,24%), α -murolol (4,66%), d-cadineno (3,66%), biciclogermacreno (3,42%), β -cariofileno (2,28%) e germacreno D (2,18%), perfazendo 66% da composição do óleo essencial (PARREIRA et al., 2010). A própolis verde e o óleo essencial do alecrim do campo são reconhecidos medicinalmente por suas várias atividades biológicas como: antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiprotozoária, anti-inflamatória, antioxidante,

imunomoduladora e analgésica (PARREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2016; RAMOS et al., 2016; VEIGA et al., 2017).

O problema da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas tem se agravado muito nos últimos anos, especialmente nas infecções de origem hospitalar e drogas que antes se mostravam eficazes na rotina clínica tem perdido sua eficácia contra a maioria das cepas isoladas. A resistência antimicrobiana e a sua disseminação entre bactérias são geralmente consequência da pressão seletiva dos antibióticos. As bactérias resistentes são transmitidas entre doentes e os fatores de resistência são transferidos entre bactérias sendo, em ambas as situações, mais frequentes em instituições de saúde. O uso contínuo de antimicrobianos aumenta a pressão seletiva, favorecendo a emergência, multiplicação e disseminação de bactérias resistentes. O uso inapropriado e não controlado de agentes antimicrobianos, incluindo a prescrição excessiva, administração de doses subterapêuticas, duração insuficiente de tratamento e erros de diagnóstico levando à escolha incorreta de fármacos, contribuem para esta situação (BELL et al., 2014; HOLMES et al., 2016).

Atualmente várias pesquisas atuam nas áreas de produtos naturais, explorando possíveis alternativas no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis (GUIMARÃES et al., 2010). Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante de dois óleos essenciais de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*): um coletado no Distrito Federal (região Centro Oeste) e outro proveniente de Mogi Mirim, São Paulo (região Sudeste).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção dos óleos essenciais de alecrim do campo

O arbusto de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) foi identificado com a colaboração do Professor Botânico Dr. Christopher William Fagg da Universidade de Brasília. As folhas foram coletadas no mês de agosto de 2018, na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL/UnB), localizada no Park Way, Distrito Federal, Brasil. As folhas coletadas foram lavadas com água corrente e em seguida o

material foi seco em temperatura ambiente. O óleo essencial foi obtido por meio de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger pelo período de 6 horas. Foram utilizadas 50 g de planta seca para cada 700 mL de água destilada, trituradas por 1 minuto em liquidificador e dispostas em balão de fundo redondo com capacidade para 1 litro. O óleo foi recolhido do aparelho tipo Clevenger com pipeta de Pasteur e transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados para que houvesse a separação de fases entre o óleo e a água, após isso o óleo puro foi transferido para novos tubos eppendorf. O rendimento do óleo foi calculado através da relação: Volume do óleo (mL) / Massa de material vegetal seco (g) x 100. O outro óleo essencial era de uma marca comercial proveniente de Mogi Mirim, São Paulo.

5.2. Preparo dos inóculos bacterianos

Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 e *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08–0,10 de densidade óptica (D.O) a 625 nm em espectrofotômetro.

5.3. Estudo da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim do campo por ensaio de difusão em disco

O método de ensaio de difusão em disco foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para realizar o ensaio de difusão em disco, com o auxílio de *swab* estéril, o inóculo microbiano foi semeado na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL dos óleos essenciais de alecrim do campo. Os testes foram realizados em triplicata e as leituras

foram realizadas após 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

5.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim do campo

O método de microdiluição em caldo foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). De acordo com a CLSI (1999) a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%. Foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Os óleos essenciais de alecrim do campo foram diluídos em caldo LB através de diluição seriada. Foi adicionado inicialmente ao óleo 20 µL de DMSO + 20 µL de Tween. Então, adicionou-se em tubos estéreis 0,1 mL do inóculo na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 0,1 mL das diferentes concentrações de óleos essenciais de alecrim do campo, resultando em uma concentração final de bactérias de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 0,1 mL do inóculo e 0,1 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 0,1 mL de caldo LB e 0,1 mL de óleo de alecrim do campo. Os testes foram realizados em triplicata. Os tubos foram incubados a 37°C por 18 horas e então as diluições foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a 37°C por 18-24 horas e a CBM foi determinada na menor concentração dos óleos essenciais de alecrim do campo onde não foram observadas colônias nas placas.

De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo. Neste estudo, o contato dos óleos essenciais de alecrim do campo com o caldo LB deixou a solução diluída com aspecto leitoso e, portanto, com elevada turbidez. Assim o método convencional de leitura da turbidez a 625 nm, após incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano foi inviabilizada nos testes com os óleos essenciais de alecrim do campo.

Então, a metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević et al. (2018). Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano, o método colorimétrico da resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 20 µL da solução de resazurina em 100 µL de cada teste, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias. Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos óleos essenciais de alecrim do campo que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina (Figura 1). A resazurina é um indicador de óxido-redução usado na avaliação da viabilidade celular. Esse reagente apresenta cor azul e se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas (Sarker et al., 2007) (Figura 2).

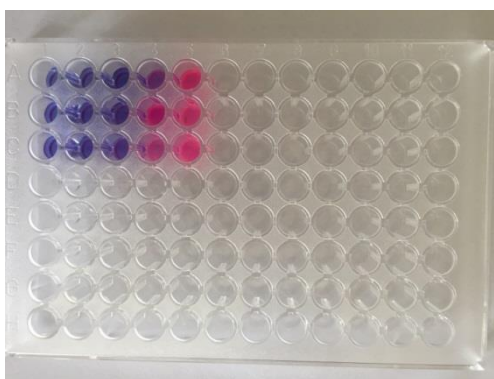


Figura 1. Determinação de CIM para o óleo de alecrim do campo utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular

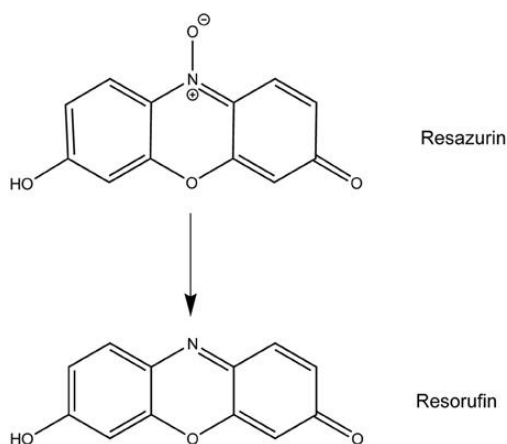


Figura 2. Redução da resazurina em resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas FONTE: Schmitt et al. 2013

5.5. Determinação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de alecrim do campo

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912). A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (KIM et al., 2002) e ABTS (RE et al., 1999).

5.5.1. Teor de Compostos fenólicos pelo método de Folin-Denis

O método de Folin-Denis é um método espectrofotométrico para quantificação de compostos fenólicos, não específico, pois determina todos os fenólicos presentes. Este método é baseado na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve comprimentos de onda entre 620 e 740 nm. A solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada para este tipo de reação, que deve ocorrer em meio alcalino (ANGELO & JORGE, 2007). Para a realização do teste foi utilizado 0,4 mL de óleo diluído, mais 7,9 mL de água e 1,0 mL de carbonato de sódio e 0,5 mL de de fólin, após 30 minutos foi realizada a leitura no espectrofotômetro. O branco foi preparado utilizando 8,5 mL de água, mais 0,5 mL de fólin e 1,0 mL de carbonato. Em seguida foi feita uma curva padrão para calcular o teor de ácido tânico e teor de ácido gálico.

5.5.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

Para verificar a atividade antioxidante através do método de captura do radical ABTS (2,2 azinobis-3-etilbenzolina-6-ácido sulfônico), foi realizado o preparo do radical ABTS utilizando a solução aquosa de ABTS previamente preparada. Para o preparo do radical foi feita uma diluição de 255 µL da solução aquosa de ABTS em 10 mL de etanol para resultar em uma absorbância de 0,700 nm medida a 754 nm. Após, foi realizado o preparo do óleo a ser analisado, utilizando uma alíquota de 145 µL de óleo essencial de alecrim do campo diluído em 20 mL de etanol. Em seguida 20 µL da diluição do óleo essencial foram colocados em tubos de ensaio e adicionados a 980 µL do radical ABTS e deixados por 6 minutos no escuro. A absorbância foi lida a 754 nm através de um espectrofotômetro utilizando etanol como branco. Os resultados

são expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox ou TEAC (mM Trolox) (RE et al., 1999).

5.5.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

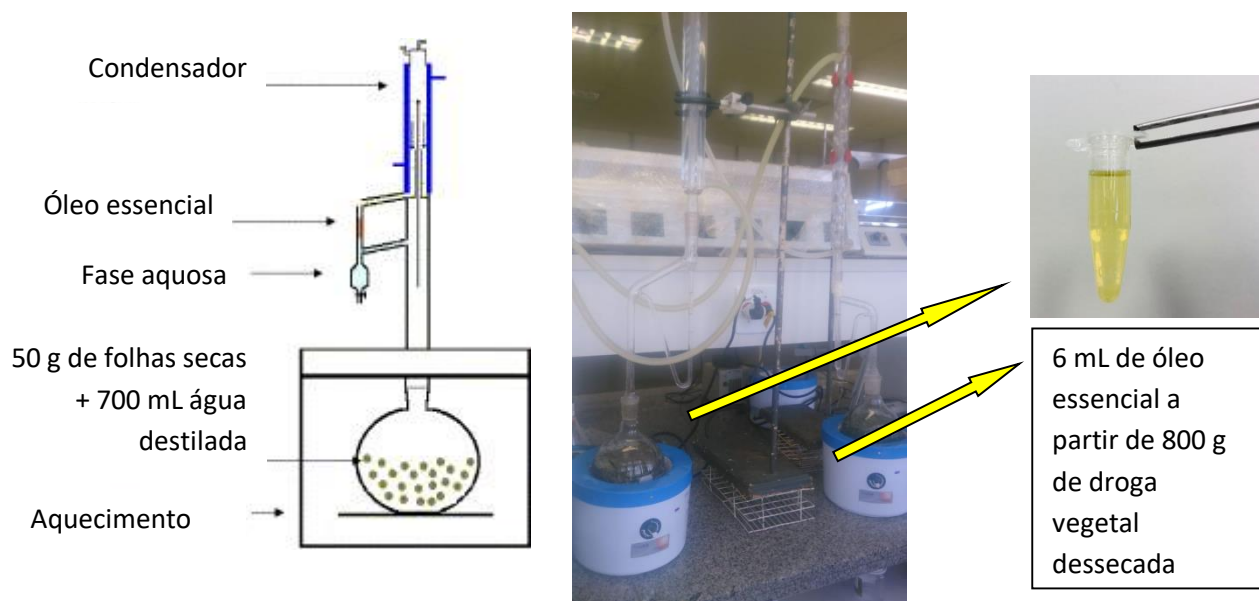
Inicialmente foi preparado o DPPH a 0,1 mM, onde foi pesado 0,03943 g, dissolvido em 1 L de etanol. Utilizando a metodologia segundo Kim et al. (2002), pipetou-se 2,9 mL do radical em tubos, adicionou 0,1 mL da amostra, e em seguida deixou por repouso em 30 minutos no escuro. A absorvância foi medida sem a amostra e após a adição da amostra. Foram realizadas as leituras das absorvâncias do radical antes de adicionar a amostra (A_0) e depois de 30 minutos de reação (A_t), no comprimento de onda de 517 nm. O espectrofotômetro foi zerado com água ou etanol para realização da leitura. A amostra diluída não apresentou valores satisfatórios, portanto foi utilizado o óleo puro sem diluição. Os resultados são expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox ou TEAC (mM Trolox).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Rendimento do óleo essencial de alecrim do campo

A extração do óleo essencial de alecrim do campo em aparelho tipo *Clevenger* ocorreu conforme esquema ilustrado na Figura 3. O rendimento do óleo foi de 6 mL utilizando-se 800 g de folhas secas (rendimento de 0,75%). O processo de extração foi repetido por 8 vezes com tempo de extração do óleo de 3-4 horas.

Figura 3. Esquema do processo de obtenção do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC.



O rendimento de 0,75% do óleo essencial de alecrim do campo deste estudo foi maior que o rendimento relatado no estudo de Salazar et al. (2018) de 0,43%, que também utilizaram folhas secas de alecrim do campo coletadas numa reserva de Mata Atlântica no estado do Paraná, região Sul do Brasil. No estudo de Barbosa et al. (2015) o rendimento do óleo essencial de alecrim do campo obtido a partir das folhas de *B. dracunculifolia* coletadas no município de Botucatu (região Sudeste do Brasil) foi de apenas 0,31%.

O rendimento do óleo essencial da *B. dracunculifolia* pode variar e depende da região geográfica e da época de coleta das folhas (FERRONATTO et al., 2007). A coleta das folhas de alecrim do campo deste estudo foi feita na época de seca na região Centro Oeste do Brasil (bioma do Cerrado) e isto pode ter contribuído para o aumento de rendimento do óleo.

6.2. Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos óleos essenciais de alecrim do campo

A Tabela 1 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana (ensaio de difusão em disco) para os óleos de alecrim do campo, onde foram aplicados 10 μ L de

óleo nos discos de papel. Foi observada atividade antimicrobiana para as bactérias gram positivas *S. aureus*, *B. cereus*, *S. mutans* e *E. faecalis* (halos de 19,4-32,0 mm). No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos gram negativos testados.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco para os óleos de alecrim do campo

Microrganismos Testados	Diâmetro dos halos em milímetros	
	Óleo do Centro Oeste	Óleo do Sudeste
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24,0 ± 0,20	19,4 ± 0,57
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	32,0 ± 0,15	21,0 ± 0,11
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	21,7 ± 0,43	23,0 ± 0,10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	22,3 ± 0,60	20,7 ± 0,57
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	NI	NI
<i>S. enteritidis</i> ATCC 14028	NI	NI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	NI	NI

NI = não houve inibição do crescimento microbiano. Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições

Geralmente as bactérias gram negativas apresentam menor sensibilidade aos óleos essenciais do que as bactérias gram positivas, devido à presença da camada de lipopolissacarídeos na parede celular (SILVA et al., 2009). Porém alguns óleos essenciais podem conter em sua composição substâncias que facilitam sua penetração nessa camada, por isso a distribuição intracelular dos constituintes dos óleos essenciais pode influenciar no modo de difusão e ação desses sobre as bactérias. Desta forma a atuação dos óleos essenciais pode variar em relação a diferentes microrganismos (VALERIANO et al., 2012).

Outro ponto importante a ser considerado é que os óleos essenciais apresentam dificuldade de se difundir uniformemente pelo meio de cultura devido à

sua natureza hidrofóbica, tornando o método de difusão em ágar questionável na determinação da sua atividade antimicrobiana (INOUE et al., 2006).

6.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim do campo

A Tabela 2 apresenta a CBM e a CIM dos óleos essenciais de alecrim do campo.

Tabela 2 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim do campo

Microrganismos Testados	Óleo do Centro Oeste (mg/mL)		Óleo do Sudeste (mg/mL)	
	CBM	CIM	CBM	CIM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,10	0,05	0,20	0,10
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	0,03	0,03	0,10	0,10
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0,10	0,05	0,20	0,10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,10	0,05	0,20	0,15
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,08	0,05	0,20	0,10
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	0,08	0,05	0,20	0,05
<i>S. enteritidis</i> ATCC 14028	0,08	0,05	0,15	0,10
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,10	0,08	0,10	0,10

Na literatura é relatado o que o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* apresenta atividade inibitória sobre o crescimento microbiano de diferentes espécies bacterianas, tanto bactérias gram-positivas como bactérias gram-negativas (BARBOSA et al., 2015; CAZELLA et al., 2019; FERRONATO et al., 2007; LUCHESI, 2017; SALAZAR et al., 2018). Os resultados encontrados no presente estudo vão de encontro a literatura, pois mostraram que os óleos essenciais de alecrim do campo apresentaram atividade antibacteriana através de inibição do crescimento bacteriano das diferentes cepas testadas (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* e *E. coli*).

Os resultados de CIM deste estudo para a bactéria *S. aureus* (0,10-0,05 mg/mL) foram similares aos valores reportados no estudo de Salazar et al. (2018) que encontraram CIM de 0,10 mg/mL para a cepa *S. aureus* utilizando óleo essencial de alecrim do campo proveniente de uma reserva de Mata Atlântica no estado do Paraná, região Sul do Brasil. Veiga et al. (2017) reportaram valores de CBM de 0,30 mg/mL para *S. aureus* utilizando extrato etanólico de alecrim do campo, comprovando que os extratos obtidos a partir das folhas de alecrim do campo também tem atividade antimicrobiana.

Neste estudo os valores de CBM de 0,03-0,20 mg/mL para as bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram menores que os valores reportados por Cazella et al. (2019), que observaram CBM de: 2,10 mg/mL para *S. aureus*, 1,50 mg/mL para *B. cereus*, 8,43 mg/mL para *E. coli* e 2,10 mg/mL para *P. aeruginosa*, utilizando óleo essencial de alecrim do campo proveniente da região de Cascavel, no estado do Paraná, região Sul do Brasil. O estudo de Barbosa et al. (2015) que utilizaram óleo essencial de canela e obtiveram valores de CBM de 0,25 mg/mL para as bactérias *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli* e 0,80 mg/mL para a bactéria *P. aeruginosa* foram resultados mais similares ao nosso estudo, onde os valores de CBM variaram de 0,08-0,20 mg/mL para as bactérias *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

O óleo da região Centro Oeste apresentou-se mais efetivo sobre todas as cepas testadas, apresentando valores de CIM e CBM menores em relação ao óleo da região Sudeste. As diferenças de CIM e CBM observadas podem ser atribuídas à composição química dos óleos testados, que varia sob vários aspectos (época de colheita, horário, localidade, entre outros fatores) que alteram a produção dos compostos ativos nas plantas (SILVA et al., 2009).

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados e CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Enquanto Webster et al. (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório de 1 mg/mL ou menos. Os resultados deste trabalho obtiveram valores de CIM de 0,03 a 0,15 mg/mL e, portanto, classificam os óleos essenciais de alecrim do campo como inibidores potentes de todas as cepas bacterianas testadas.

6.4. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais dos óleos essenciais de alecrim do campo

A Tabela 3 apresenta a determinação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de alecrim do campo. Neste estudo o óleo essencial de alecrim do campo da região Centro Oeste apresentou maiores valores de compostos fenólicos e atividade antioxidante do que o óleo de alecrim do campo da região Sudeste.

Tabela 3 - Determinação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de alecrim do campo

Óleos essenciais	DPPH TEAC (mM Trolox)	ABTS TEAC (mM Trolox)	Compostos Fenólicos (mg/mL)
Centro Oeste	3,22 ± 0,45	186,83 ± 26,25	2,90 ± 0,01
Sudeste	0,75 ± 0,31	0,67 ± 0,18	1,24 ± 0,05

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão. Os compostos fenólicos foram apresentados em mg de ácido gálico por mL de óleo

No estudo de Veiga et al. (2017) o extrato alcoólico obtido das folhas de alecrim do campo apresentou aproximadamente 2,00 mg/mL de compostos fenólicos, um resultado parecido com o obtido para os óleos deste estudo. Em relação a outros óleos essenciais, no estudo de MAZZARRINO et al. (2015) o óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) apresentou teor de compostos fenólicos de 1,85 mg/mL. E para o óleo essencial obtido dos tubérculos de *C. rotundus* (conhecida popularmente como tiririca) o teor de compostos fenólicos foi menor de 0,80 mg/mL (LIVI, 2015).

Os compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas através de rotas do metabolismo secundário e atuam em mecanismos de defesa da planta contra espécies reativas de oxigênio, a fim de evitar danos oxidativos, logo a quantidade de compostos fenólicos está altamente ligada a capacidade antioxidante da espécie vegetal (SILVEIRA, 2012). O estudo de Silveira (2012) mostrou correlações altamente significativas entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

de extratos hidroalcoólicos de diferentes espécies vegetais, tanto pelo método do sequestro do radical DPPH, quanto pelo radical ABTS.

Os óleos essenciais obtidos de plantas aromáticas são de grande interesse para a indústria alimentícia e de bebidas por agir como um antioxidante natural, e esta atividade antioxidante está particularmente ligada aos compostos que tem a capacidade de parar ou retardar o processo de oxidação (AMIRI, 2012).

Os ensaios do radical DPPH e radical ABTS são regidos por princípios semelhantes, pois radicais livres retardam o processo oxidativo através da perda de coloração e diminuição de absorvância ao serem reduzidos por compostos doadores de hidrogênio e elétrons (BERTOLDI, 2006). Bertoldi (2006) observou que os métodos de DPPH e ABTS foram os mais adequados para avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa, devido a uma maior estabilidade e reprodutibilidade.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou o potencial bactericida e bacteriostático dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* frente as diferentes espécies de bactérias testadas, tanto gram-negativas quanto gram-positivas. Foi possível observar uma diferença nos valores de CIM e CBM para os óleos testados. O óleo da região Centro-Oeste apresentou menores valores de CIM e CBM que o óleo da região Sudeste. E também o óleo da região Centro-Oeste apresentou maiores valores de atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em relação ao óleo da região Sudeste. Possivelmente esta diferença de potencial antibacteriano e atividade antioxidante entre os óleos essenciais da mesma espécie, deve-se às diferentes localidades em que os óleos foram coletados, pois a literatura relata que a constituição química desses óleos varia de acordo com localidade e época de coleta. Para a continuidade dos estudos será determinado a composição química dos óleos através de métodos cromatográficos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 811-815, 2001.

AMIRI, H. Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012.

BANKOVA, V; POPOVA, M; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review, **Chemistry Central Journal**, n. 2, p. 8-28, 2014.

BARBOSA, L. N. et al. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, p. 3-8, 2015.

BELL, B.G; SCHELLEVIS, F; STOBBERINGH, E; GOOSSENS, H; PRINGLE, M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. **BMC Infection Disease**, n. 14, p. 2-25, 2014.

BERTOLDI, M.C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. Tese de mestrado (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos). UFV, Viçosa, MG, 2006.

BARBOSA, L. N. et al. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, p. 3-8, 2015.

CAZELLA, L. N. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) aerial parts at flowering period, **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-9, 2019.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eleventh Edition. CLSI document M02-A1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p. 239-243, 1912.

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L.D.S; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HOLMES, A.H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance, **Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, N.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Japanese Journal of Medical Microbiology**, v.47, n.2, 2006.

KIM, D-O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

LIVI, A. **Atividade antioxidante do óleo essencial das folhas e tubérculos da tiririca (*Cyperus rotundus*)**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

MAZZARRINO, G. et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, v. 50, p. 794-803, 2015.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PEREIRA, C. A. COSTA, A.C; LIPORONI, P.C; REGO, M.A; JORGE, AO. Antibacterial activity of *Baccharis Dracunculifolia* in planktonic culture and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 3, p. 324–330, 2016.

RAMOS, C. F. et al. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved abts radical Cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities, **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 367–379, 2018.

SALAZAR, J. J. T. et al. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops & Products**, v. 122, p. 591–595, 2018.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurina as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**. v. 42, p. 321–324, 2007.

SCHMITT, M. D. et al. The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against *Francisella tularensis*, **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p.1-6, 2013.

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

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal**, Tese (Doutorado em ciência dos alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012

BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; PAL, N. K.; CHATTOPADHYAY, R. R. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 6, p. 352-357, 2012.

BANKOVA, V; POPOVA, M; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review, **Chemistry Central Journal**, n. 2, p. 8-28, 2014.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42f. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.

BELL, B.G; SCHELLEVIS, F; STOBBERINGH, E; GOOSSENS, H; PRINGLE, M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. **BMC Infection Disease**, n. 14, p. 2-25, 2014.

BEN-DAVID, D. et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections, **Clinical Microbiological Infection**, v. 18, p. 54–60, 2011.

BENOIT, S. R. Community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n.8. p. 1216-1222, 2008.

BERGAMASCHI, K. B. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010

BERNARDES, C. T. V. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Pinnus elliottii* Engelm.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, 2014.

BOIX, Y. F. et al. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p.255-257, 2010.

BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BREVES, A. et al. Methicillin- and vancomycin- resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 143-152, 2015.

CANNON, J. B. et al. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 214-220, 2013.

COSTA, A.L.P. **Resistência bacteriana aos antibióticos: uma perspectiva do fenômeno biológico, suas consequências e estratégias de contenção**. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COX, S. D. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

DANNENBERG, G.S. et al. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA BRASILEIRA (*Shinus terebinthifolius* Raddi). Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) Gramado, RS, 2016

ECDC/EMEA. Technical report: the bacterial challenge: time to react. **European Centre for Disease Prevention and Control/ European Medicines Agency Joint Working Group**. Stockolm, 42 p, 2009.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 170-174, 2006.

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L.D.S; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HOLMES, A.H.et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance, **Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

HUSSEIN, M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops & Products*, 44, 437–445. 2013

JYOTHI, K.; SESHAGIRI, M. In-vitro activity of saponins of *Bauhinia Purpurea*, *Madhuca Longifolia*, *Celastrus Paniculatus* and *Semecarpus Anacardium* on selected oral pathogens. **Journal of Dentistry**, Tehran, Iran, v. 9, n. 4, p. 216, 2012.

LUCHESI, L. A. **Atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante de óleos essenciais**. 89 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

LUCIANO, F.; HOLLEY, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 240-245, 2009.

MACHADO, R. R. P. et al. Screening antimycobacterial activity of *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* and *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.17, n.4, supl. II, p.891-899, 2015.

MEDEIROS, F. C. M. **Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do cerrado contra fungos xilófagos.** 2014. 71200 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Florestais, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2014.

MOUSSAOUI, F.; ALAOUI, T. Avaliação da atividade antibacteriana e efeito sinérgico entre o antibiótico e os óleos essenciais de algumas plantas medicinais. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v. 6, n.1, p.32-37, 2016.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of essential oil steam distillation by microwave pretreatment. **I&EC Research,** v. 50, p. 4667-4671, 2011

OLIVEIRA, C. B. S. et al. Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella spp.* em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** v. 47, n. 6, p. 589-594, 2011.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity,** v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PEREIRA, C. A. COSTA, A.C; LIPORONI, P.C; REGO, M.A; JORGE, AO. Antibacterial activity of *Baccharis Dracunculifolia* in planktonic culture sand biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health,** v. 9, n. 3, p. 324–330, 2016.

RAMOS, C. F. et al. *Baccharis (Asteraceae):* chemical constituents and biological activities. **Chemistry & Biodiversity,** v. 13, n. 1, p. 1–17, 2016.

SALAZAR, J. J. T. et al. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops & Products,** v. 122, p. 591–595, 2018.

SANTOS, R. F. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, p.224-234, 2012.

SCHOSSLER, P. et al. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 277-87, 2009.

SFORCIN, J. M. et al. ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Unesp, 2012. 103 p.

SILVA, M. L. C., et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010

SILVA, S. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. 2013. 113 f., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SILVA, M. G. F. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**, 70 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Pato Branco – PR, 2011.

SILVEIRA, J.C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.2038-2052, 2012.

SOARES, K. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de alecrim-do-campo (*Baccharis Dracunculifolia*) sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. Anhanguera Educacional Ltda., v. 17. n.4. p. 17-28, 2014.

SOUSA et al. Seasonal variation of the (e)- nerolidol and other volatile compounds within ten different cultivated populations of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (*Asteraceae*). **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.308-14, 2009.

UDWADIA, Z.F. et al. Totally drug resistant tuberculosis in India. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, p. 579-581, 2011.

VALERIANO, C. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

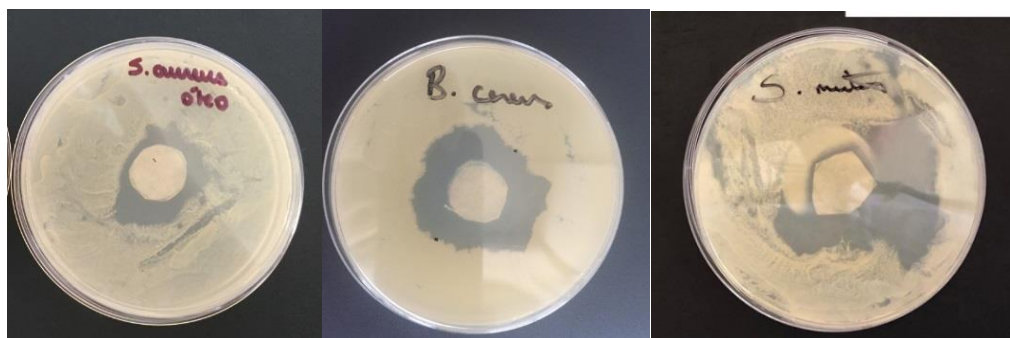
VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC, *Journal of Applied Microbiology*, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**, fact sheet 194. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

ZUO, G.; WANG, G.; ZHAO, Y.; XU, G.; HAO, X.; HAN, J.; ZHAO, Q. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 287-290, 2008.

10. ANEXOS

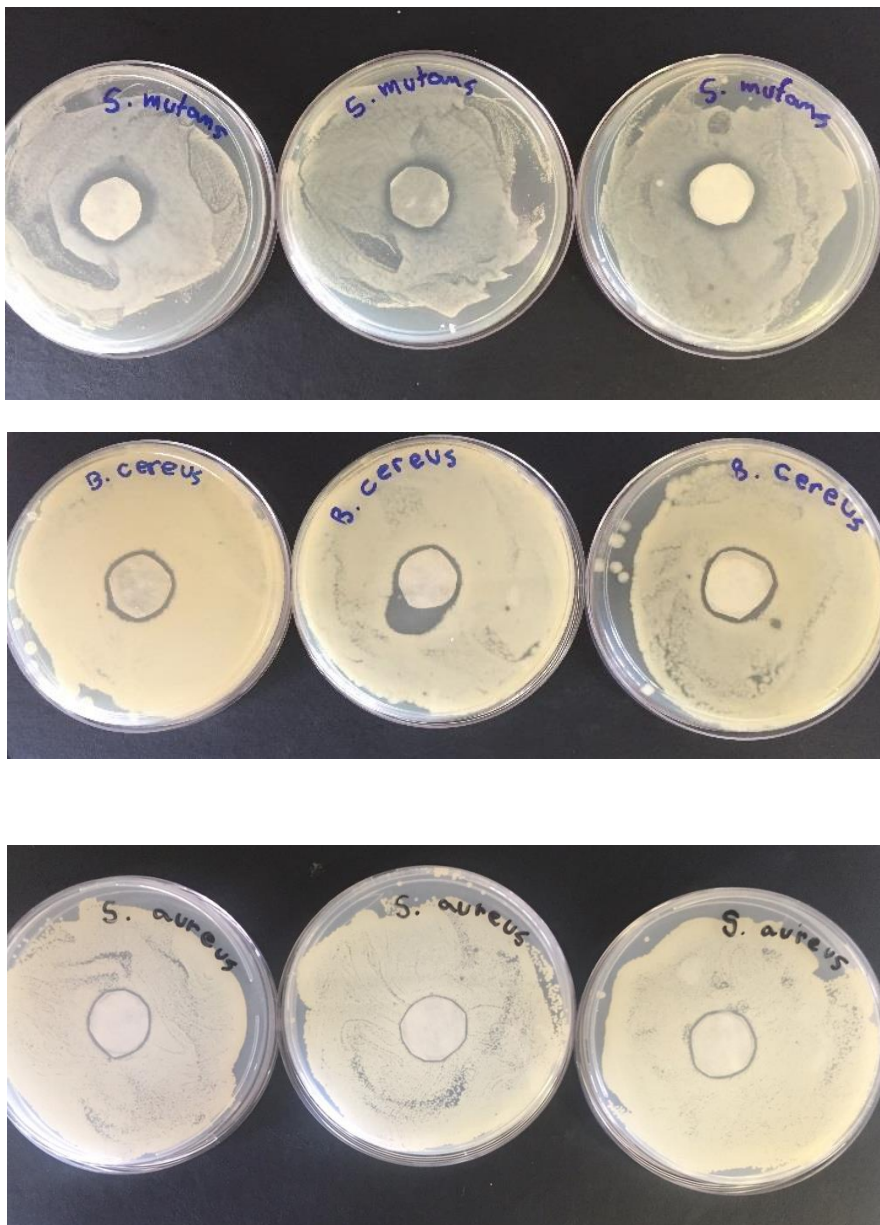
ANEXO 1 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos óleos essenciais de alecrim do campo



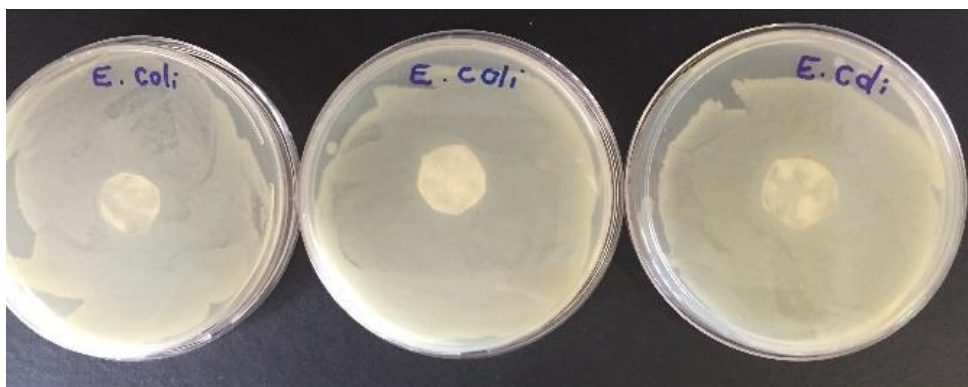
ANEXO 1.1. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Centro Oeste com as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*



ANEXO 1.2. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Centro Oeste com as bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*

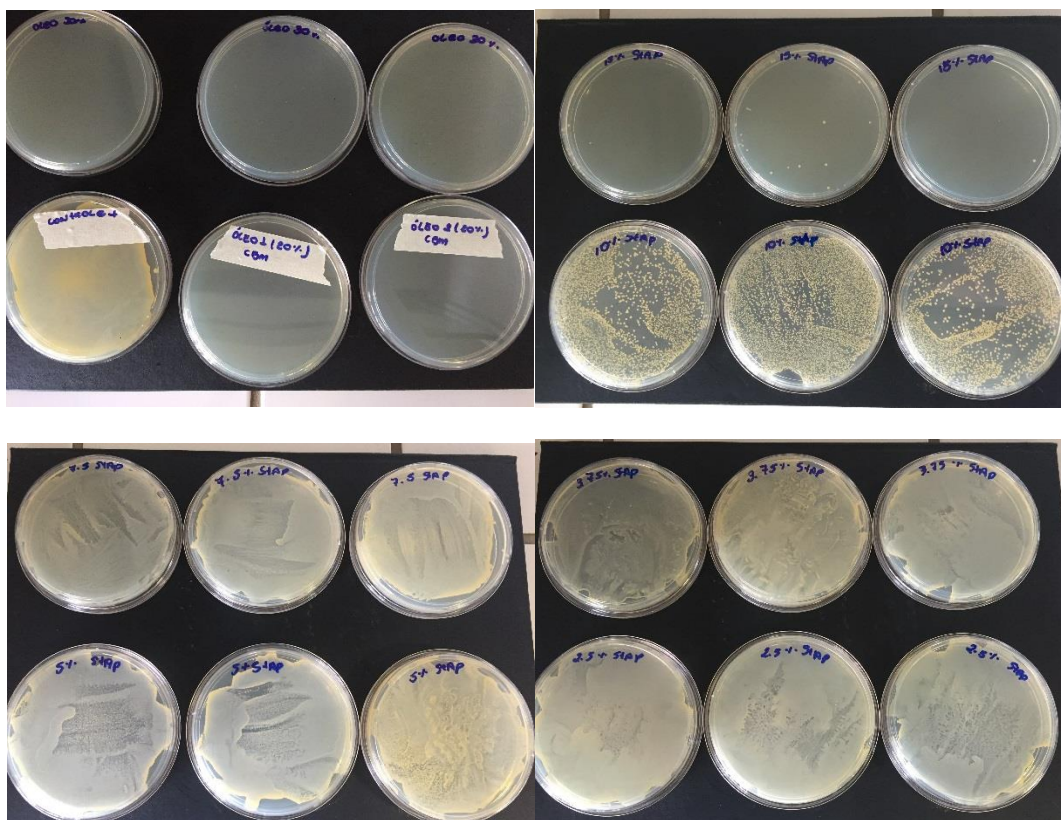


ANEXO 1.3. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Sudeste com as bactérias *S. aureus*, *S mutans* e *B. cereus*

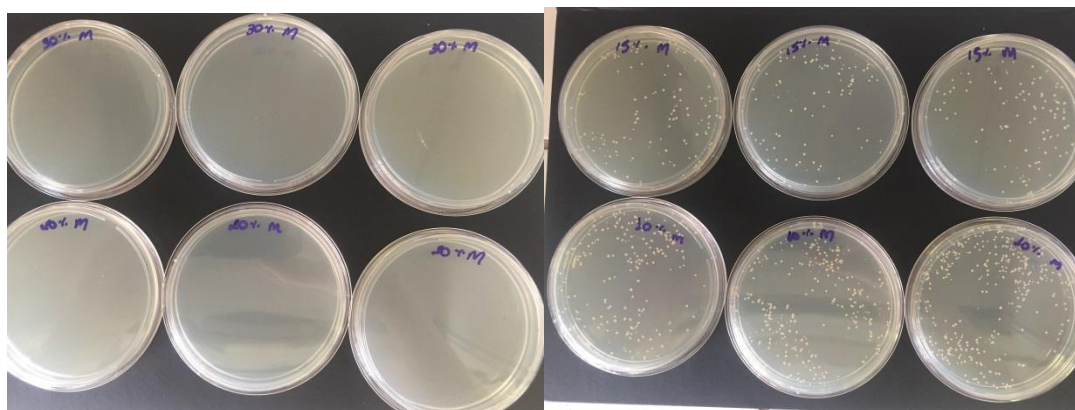


ANEXO 1.4. Imagens das placas disco difusão do óleo da região Sudeste com as bactérias *E. coli*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa*

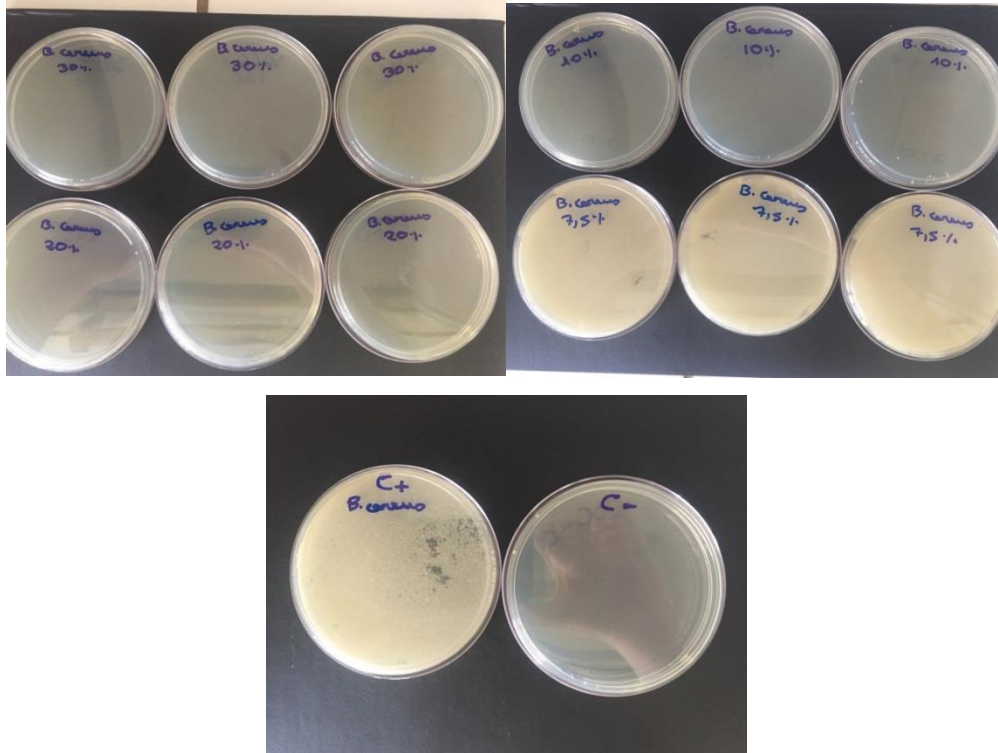
ANEXO 2- Testes de CMB dos óleos essenciais de alecrim do campo



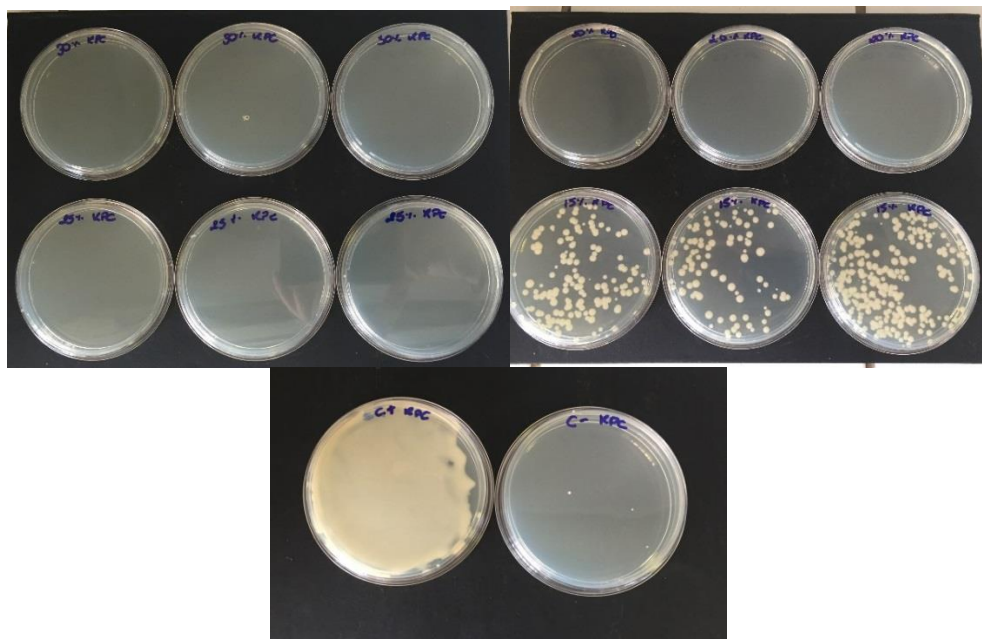
ANEXO 2.1 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; (+) = controle positivo; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL 6- 0,05 mg/mL; 7- 0,04 mg/mL e 8- 0,03 mg/mL



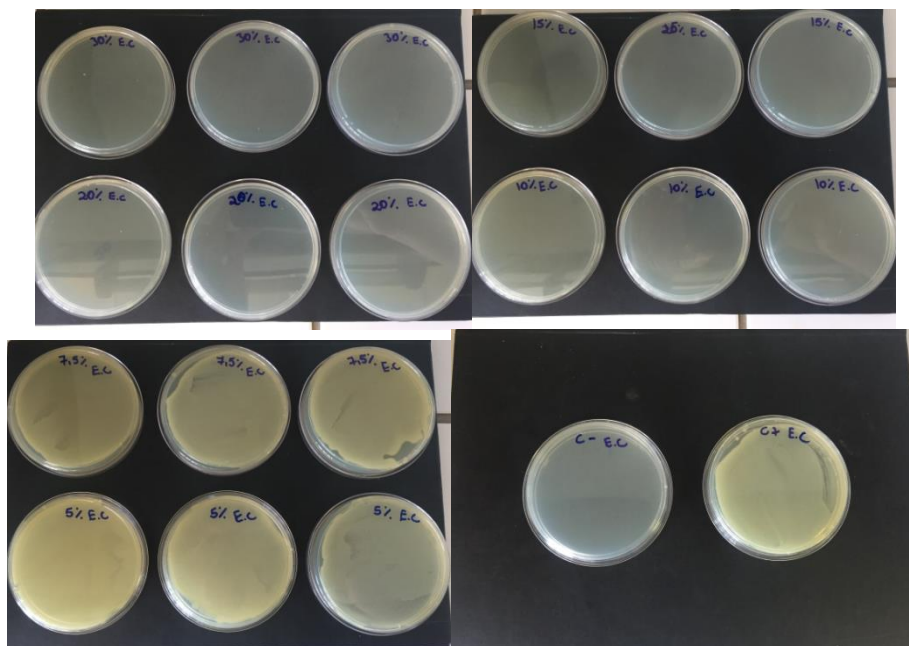
ANEXO 2.2 – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL, 4- 0,10 mg/mL



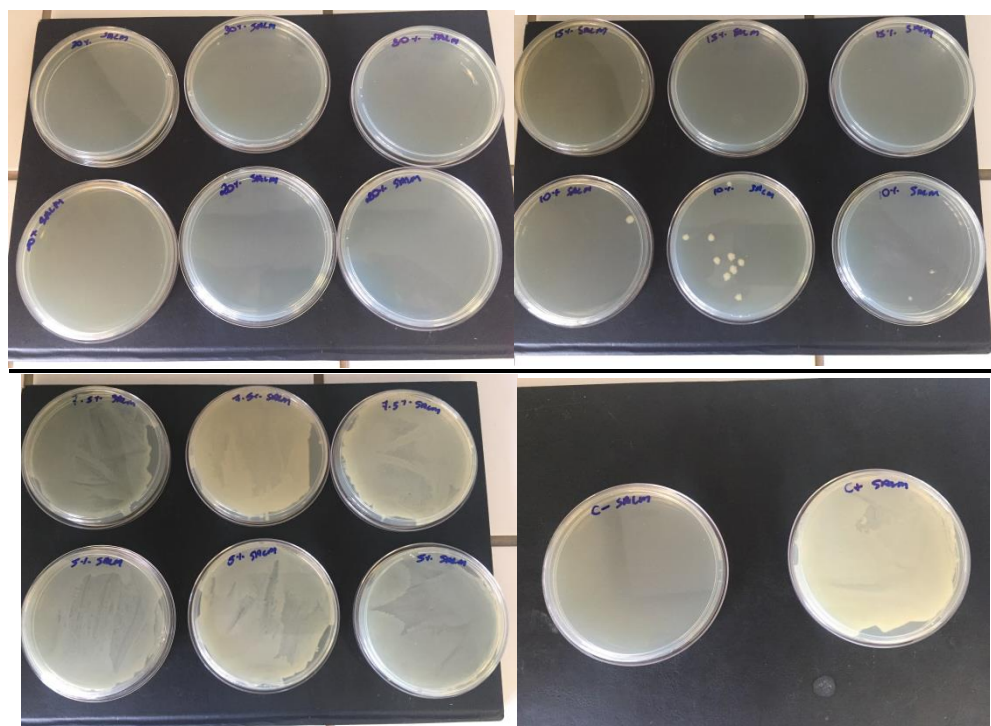
ANEXO 2.3 – Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,10 mg/mL; 4- 0,08 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



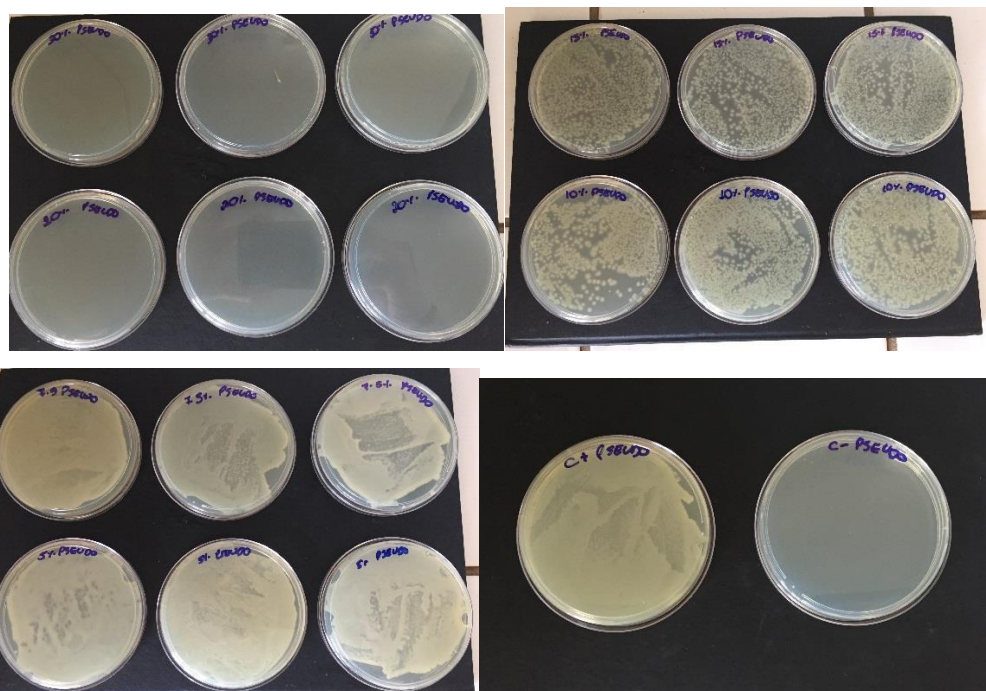
ANEXO 2.4 – Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,25 mg/mL; 3- 0,20 mg/mL; 4- 0,15 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



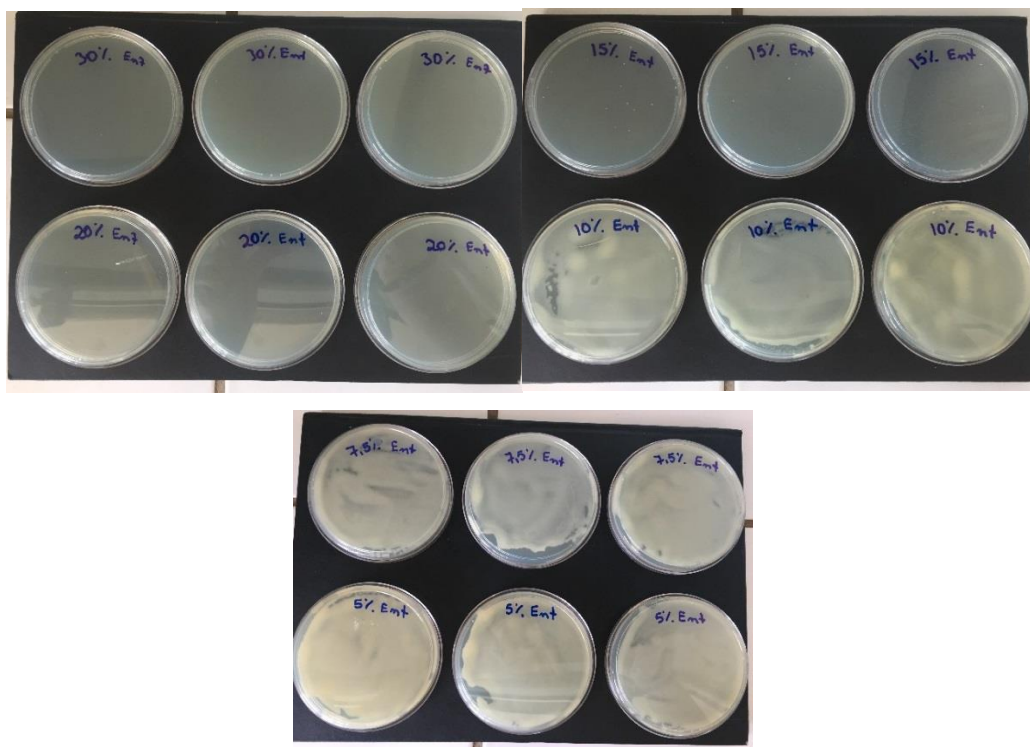
ANEXO 2.5 – Imagens das placas com *E. coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



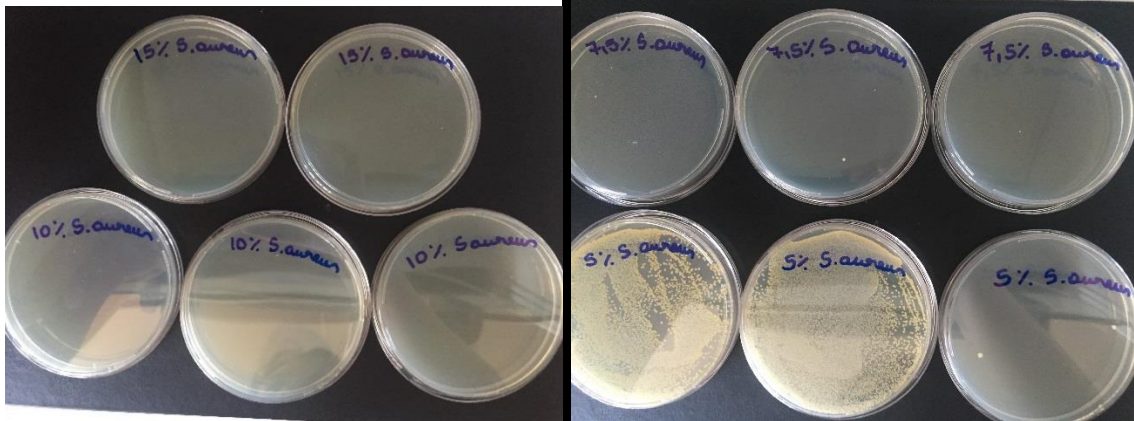
ANEXO 2.6 – Imagens das placas com *S. enteritidis* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



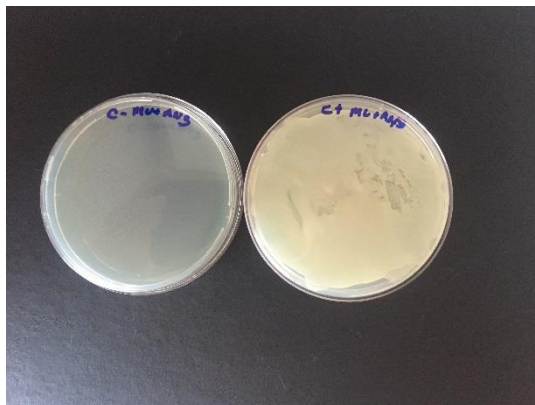
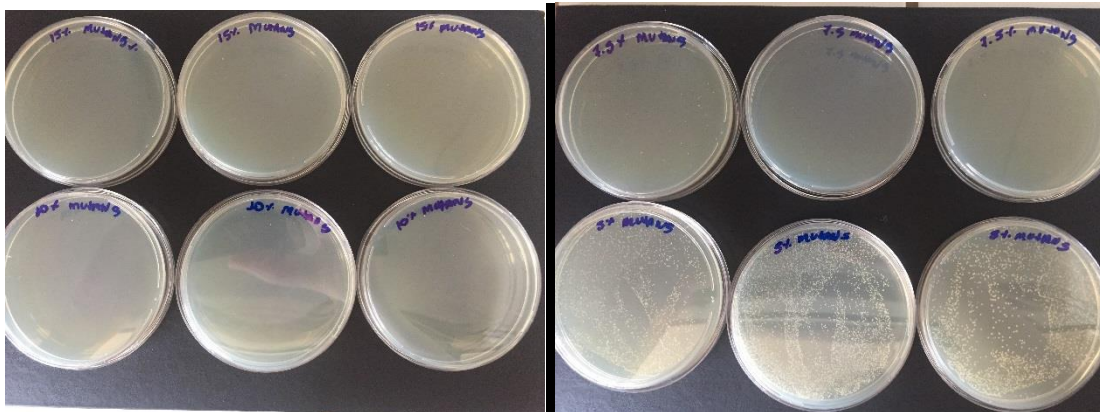
ANEXO 2.7 – Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



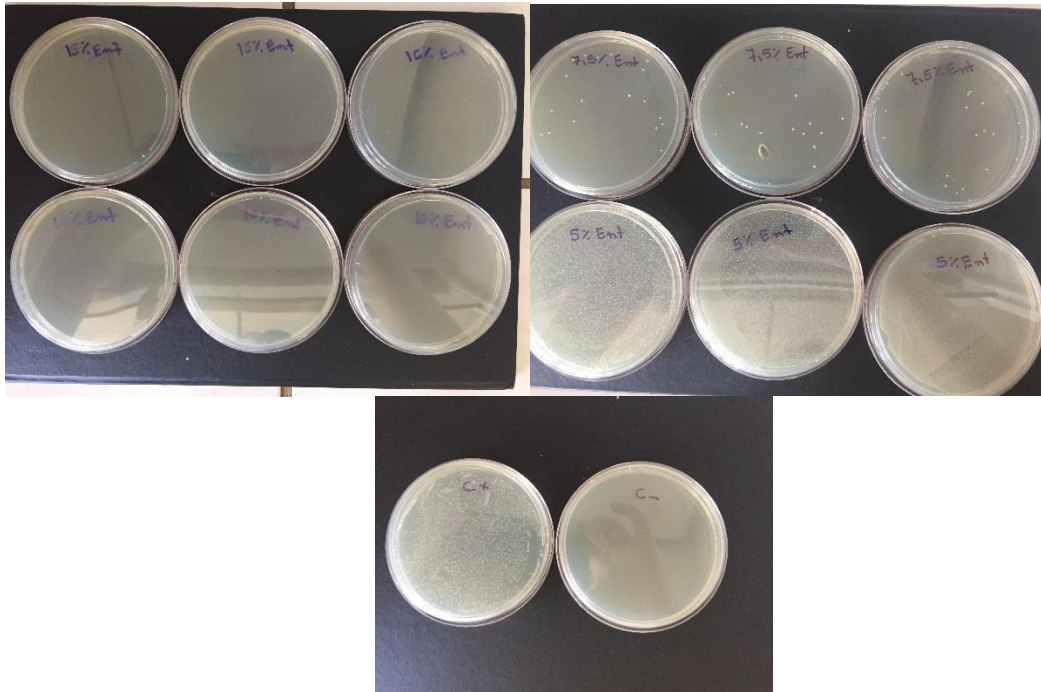
ANEXO 2.8 – Imagens das placas com *S. faecalis* ATCC 29212 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Sudeste: 1- 0,30 mg/mL; 2- 0,20 mg/mL; 3- 0,15 mg/mL; 4- 0,10 mg/mL; 5- 0,08 mg/mL; 6- 0,05 mg/mL



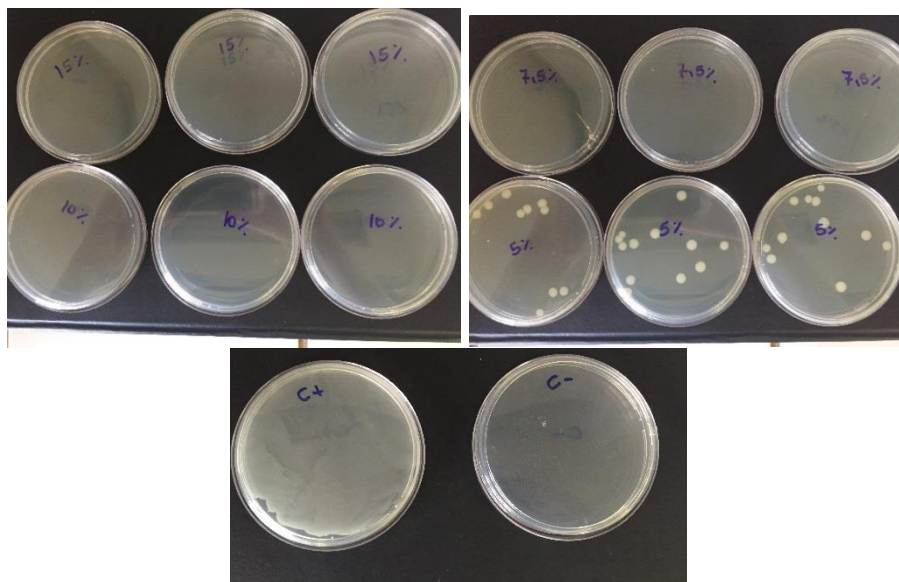
ANEXO 2.9 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL



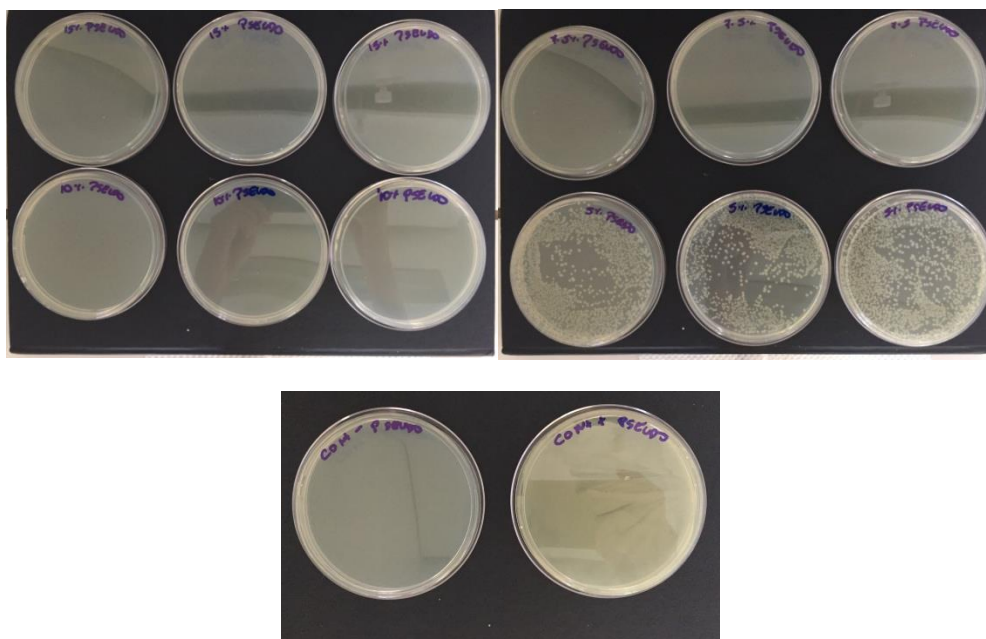
ANEXO 2.10 – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



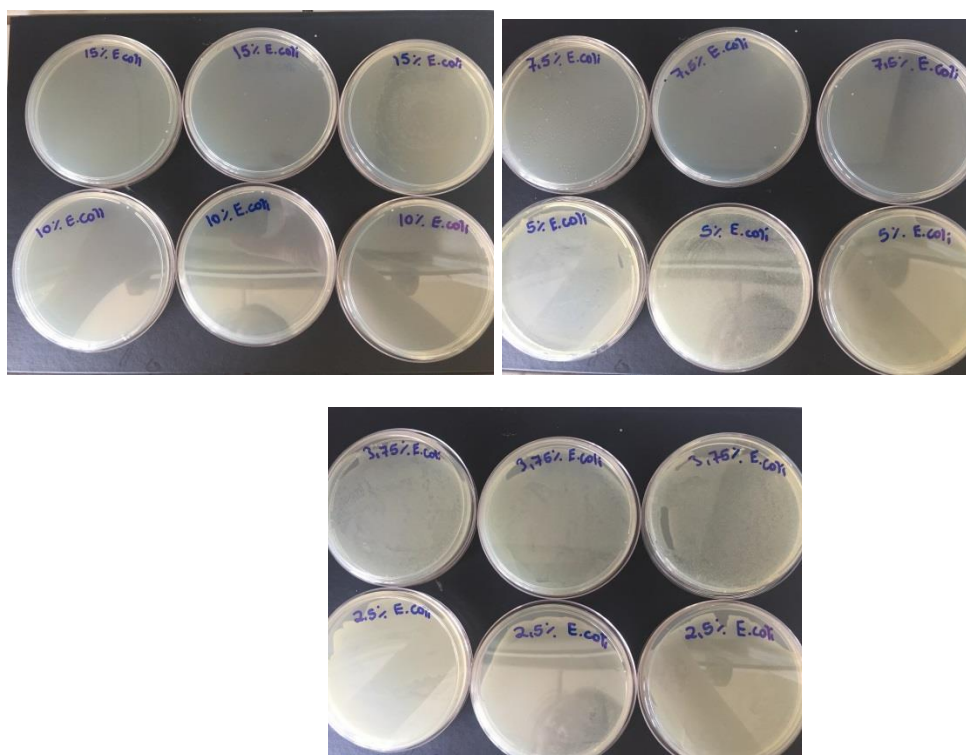
ANEXO 2.11 – Imagens das placas com *S. faecalis* ATCC 29212 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



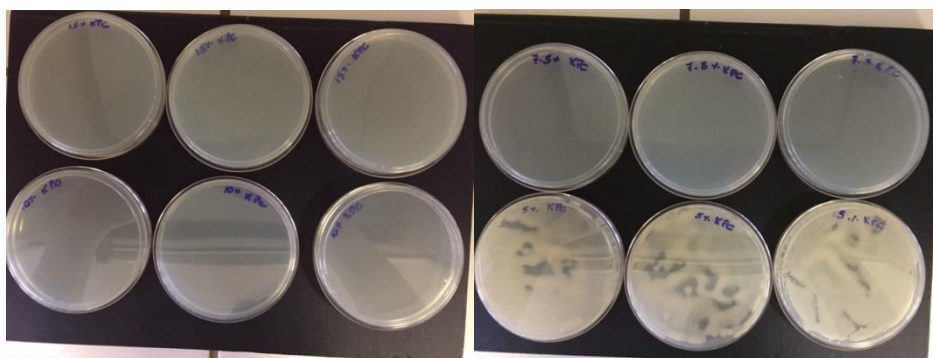
ANEXO 2.12 – Imagens das placas com *S. enteritidis* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



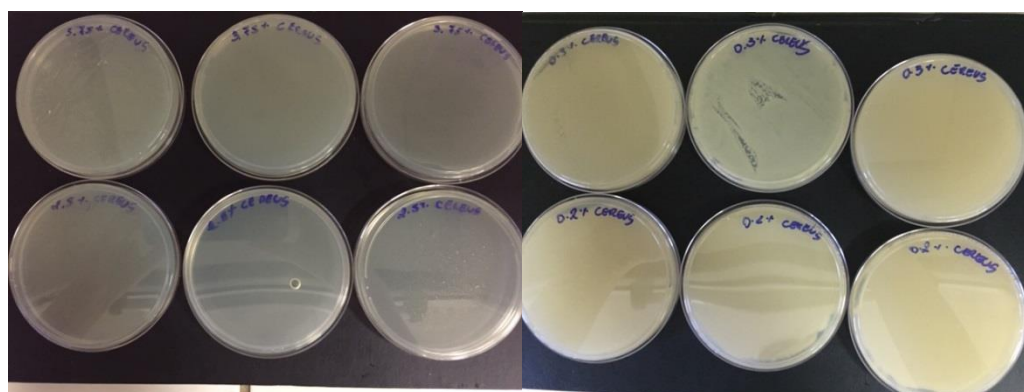
ANEXO 2.13 – Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; (C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



ANEXO 2.14 – Imagens das placas com *E. coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; 5- 0,04 mg/mL e 6- 0,03 mg/mL



ANEXO 2.15 – Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,15 mg/mL; 2- 0,10 mg/mL; 3- 0,08 mg/mL; 4-0,05 mg/mL; C+) = controle positivo e (C-) = controle negativo



ANEXO 2.16 – Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do óleo da região Centro Oeste: 1- 0,04 mg/mL; 2- 0,03 mg/mL; 3- 0,02 mg/mL; 4-0,01 mg/mL

ANEXO 3. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

Arquivos do Instituto Biológico aims to publish original high quality scientific articles, which contribute significantly to the development of the Agricultural Sciences, in the field of animal and vegetal sanity, related to agribusiness and its implication in the agri-environment, including quality and food safety. It is also accepted papers on urban pests. The journal supports and follows the principles and standards recommended by COPE (Committee on Publication Ethics), an international organization reference on integrity and ethics in scientific publishing. Thus, the entire process, selection criteria and journal publication follow the conduct rules and ethics in accordance with http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf.

It is mandatory to include the ORCID of the corresponding author at the time of submission of the manuscript. After acceptance, the inclusion of ORCID of all authors will be required.

A cover letter should come along with the manuscript describing the importance of the work in the field, qualifying it for publication in **Arquivos do Instituto Biológico**. In addition, a statement signed by the corresponding author on behalf of all authors, must be attached as a supplementary document in the designated area in the online system where the authors state that:

a) the data contained in the manuscript is original and authentic, so there is no fraud and/or plagiarism derivations (all received manuscripts are subjected to a software to detect plagiarism); b) the manuscript was not submitted for publication in any other printed or electronic vehicle; c) the manuscript content is authors' responsibility, who assume they have contributed significantly to research and must provide retractions or correct mistakes if necessary. In case of doubt, see the [Singapore Statement](#); d) in case of conflicts of interest, they will be manifesting, which will subsequently be examined by the Editorial Committee.

Additional

information:

Studies involving: 1- animal experimentation and/or genetically modified organisms must be approved by the Ethics and Biosafety Committee, mentioning the process number in the paper and a copy of the approval provided by the correspondent responsible Committee of the author's home institution must be forwarded; 2- plants must have the prior registration and deposit of this material (vouchers) in registered collections and accessible to the public, with the inclusion of its identification number on the manuscript. 3- DNA sequences must have the accession number in enabled databases informed in the manuscript.

The manuscripts submitted to **Arquivos do Instituto Biológico** are preliminarily analysed by the Editorial Committee. During the pre-analysis, the Committee checks if it fits in the scope and merit for publication. The manuscripts that do not match the editorial requirements or that need to be redrafted will be rejected without a review. The preselected manuscripts will be submitted to critical analysis of at least 2 Scientific Consultants (ad hoc) chosen by specialists in the field of the submitted article. The Scientific Consultant also fills an evaluation form. The acceptance of the article is in agreement with the Editor-in-chief of the Editorial Committee. In case the article is rejected by part of the Scientific Consultants, the Associate-Editor will issue his conclusive technical opinion. The reviews and the conclusive technical opinion will be forwarded to the authors for corrections, justifications and presentation of the new version of the draft, which is compared to the original version by the Editor-in-chief of the Editorial Committee. Once it is accepted, the article is forwarded to reference, abstract and vernacular review. After the layout change, the text is submitted to final corrections by the authors and by the Editorial Committee. All articles are published following the approval order.

The fare for publication in the journal **Arquivos do Instituto Biológico** is R\$ 80,00 (eighty Brazilian reals) per diagrammed page.

After the work is accepted, as communicated by the editor-in-chief, the authors must deposit the total amount of this fee to the account Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ

50.276.237/0001-78) [Banco do Brasil (001), bank branch 4328-1, bank account 30.200-7 or Banco Santander (033), bank branch 0637, bank account 13-001316-9]. A copy of the proof of deposit must be sent by e-mail, mentioning the paper's publication ID number: arquivos@biologico.sp.gov.br

Form and preparation of manuscripts

To be considered for publication, the work must be either a scientific article or scientific communication, although the Editorial Committee will also accept review articles, at its discretion.

Scientific article: consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments and references.

Scientific communication: consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the text without subdivisions, acknowledgments and references. Scientific publication is a brief report, its publication is immediate as this is an relevant original fact but its content is insufficient for a scientific article.

Review article: consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the text without subdivisions, and references.

Presentation: the works must be submitted in Microsoft WORD format (.doc or .docx), page-size A4, margins 2.5 cm, size 12 Times New Roman font, double spaced, with continuous page numbering using the Layout tool in the Page Setup or Page Layout menu item. The maximum number of pages is 25 for review articles, 20 for scientific articles and 10 for scientific communications, including tables and figures.

Language: the paper can be written and submitted in Portuguese or English. After the acceptance, the article submitted in Portuguese should be translated into English, with an abstract in Portuguese.

Title: although brief, the title should tell precisely what the article is about, focusing on its main purpose.

Name (s) and Address (es) of the author(s): should not be included in the manuscript body because *Arquivos do Instituto Biológico* uses double blind peer review. This information should be inserted in the specific field of the online submission system.

Abstract: should concisely present the aim of the work, the materials and methods and conclusions, in a single paragraph. The length must not exceed 250 words.

Keywords: under the abstract and separated by a space, provide at most five keywords separated by commas. Avoid terms that appear in the title.

Translation of title, abstract and keywords: Manuscript in English must provide a translation of the title, abstract and keywords in Portuguese. The length of the abstract must not exceed 250 words.

Introduction: describe the nature and the purpose of the work, its relation with other research studies in the context of existing knowledge, along with the reason why the present study was carried out.

Material and methods: present a description that is brief yet sufficient to allow for the repetition of the work. Previously published techniques and processes, except when modified, should be merely cited. Scientific names of species and of drugs should be cited in accordance with international standards.

Results: accompanied by tables and/or figures when necessary. The tables and figures should be inserted after the references.

Discussion: discuss the results obtained, comparing them with those of other published works (results and discussion may be combined within a single section).

Tables and figures: include a clear and concise title that allows the table or figure to be understood without consulting the text. The tables should not contain vertical lines. In the text, use the abbreviated word (e.g.: Fig. 3). The figures must be in the format jpg (photos) or gif (graphics and diagrams), of a size less than 500 Kb. The original or higher-definition figures will be requested after the submission is approved for publication. These should be sent in individual files and named according to the number of the figure, for example Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusions: presented in their order of importance. They can be given in a separate section or as part of the discussion.

Acknowledgments: these may refer to people and/or institutions. In case of funding agency, the financing process number must be included.

References and citations in the text: the citations in the text and references are directly linked. It is recommended around 25 references to articles and scientific communications. All of the authors cited should be included in the references. The citation of authors should be presented in the format of author's last name and the year of the publication, and should be in uppercase, for example: one author ALLAN (1979) or (ALLAN, 1979); two authors – LOPES; MACEDO (1982) or (LOPES; MACEDO, 1982); more than two authors – BESSE et al. (1990) or (BESSE et al., 1990); coincidences of authors or year of publication – (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) or (CURI, 1998a, 1998b). The references should be formatted according to NBR 6023/2018, of the Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), and be in alphabetical order by first author, as in the examples in the following link:

The following examples will serve as a guideline for the formatting and presentation of references:

a) Periodical article

ANDRÉA, M.M. ; PETTINELLII JÚNIOR, A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.67, n.2, p.223-228, 2000.

b) Article in periodical published on Internet

FELÍCIO, J.D.; SANTOS, R. da S.; GONÇALES, E. Componentes químicos de *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.47-50, 2001. Available from:http://www.biologico.br/arquivos/v68_1/9. Access on: 5 mar. 2002.

c) Entire books, brochures, etc.

BECKMANN, N. (ed.). *Carbon-13 NMR spectroscopy of biological systems*. San Diego: Academic Press, 1995. 334p.

d) Part of a book (chapter, passage, fragment, etc.)

Chapter or part without specific authorship – author of the part is the same author as the overall work

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: _____. *Molecular biology of the cell*. 3th.ed. New York: Garland Publications, 1994. 1294p. Chap. 19.

Part with specific authorship

BANIJAMALI, A. Thyroid function and thyroid drugs. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. (ed). *Principles of medicinal chemistry*. 4th. Ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 1995. chap.30, p.688-704.

Send of the manuscripts

The original should be submitted only in electronic form at the address <https://mc04.manuscriptcentral.com/aib-scielo>.

Submission fee

The submission fee is R\$60.00 (sixty Brazilian reais), and a copy of the proof of deposit must be attached in the system as a Supplemental File NOT for Review. Only articles with a paid submission fee will be evaluated. The deposit of the submission fee must be made on behalf of the Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) [Banco do Brasil (001), bank branch 4328-1, bank account 30.200-7 or Banco Santander (033), bank branch 0637, bank account 13-001316-9].