



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA

**EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Lippia alba* NA
ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILME DE *Salmonella typhi* e
Shigella dysenteriae E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2019

ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA

EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Lippia alba*: NA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILME DE *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Biologia para saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B1e BATISTA, ANDRESSA HELLEN DE MORAIS.
EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Lippia alba* NA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILME DE *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS ; EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Lippia alba* NA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILME DE *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* / ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA. – 2019.
133 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.
1. *Lippia alba*. 2. *Salmonella typhi*. 3. *Shigella dysenteriae*. 4. biofilme. 5. inflamação. I. Título.
-

CDD 615

ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA

**EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Lippia alba*: NA
ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILME DE *Salmonella typhi* e
Shigella dysenteriae E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Biologia para saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade Federal de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Francisco Esmail de Sales Lima
Universidade Federal de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Andréa Bessa Teixeira
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

Dedico este trabalho ao meu pai, Antonio José
Morais Batista (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Antonio Jose Morais Batista (*in memorian*) que sempre foi um exemplo de força, coragem, superação e fé. Obrigada por me inspirar sempre. Tenho certeza que hoje seu sorriso é imenso por essa conquista. Que saudade! ...Te amo eternamente!

À minha mãe, Filomena de Morais Batista pelo amor incondicional, que sempre me fortaleceu para realização de todos os sonhos.

A minha vó Francisca, que sempre me mostrou o que é ser uma fortaleza e a minha vó Lindalva (*in memorian*), que sempre me mostrou como a fé move montanhas.

Aos meus irmãos, Anderson e Andréa, pelo carinho e apoio. A todos meus familiares queridos, Elzenir, Paulo Neto, Camilinha, tia Herlinda, tia Jacinta, Fernanda, Wesley, Diego, Luan, Neném e Vanessa. Eu amo muito vocês.

Em especial, ao Toninho (Antonio Neto), meu sobrinho, que chegou para trazer amor e esperança para os nossos corações. Além de provar pra mim, que a vida é sempre o nosso melhor presente.

À Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira, minha orientadora, pela oportunidade concedida, por sempre estar disponível para ajudar, pela compreensão, dedicação, amizade e sabedoria. A minha gratidão não se mede. Meu muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Roberto César e sua aluna de doutorado Lívia pela colaboração e pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos, desejo manifestar os meus agradecimentos pela pronta disponibilidade, pela atenção e presteza. Vocês são exemplos de profissionais. Muito obrigada por terem me acolhido de forma tão receptiva.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira, Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes, Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira, Profa. Dra. Andréa Bessa Teixeira e Prof.Dr. Francisco Esmail de Sales Lima por terem assumido a tarefa de avaliar e contribuírem na importante fase de conclusão do meu trabalho.

Ao Alessandro, que me deu apoio durante muitos momentos dessa caminhada. Obrigada por toda sua compreensão, apoio, incentivo, paciência e amizade.

Ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LABMICRO) e a todos os bolsistas e amigos... Valéria, Gleilton, Suelen, Matheus, Pedro e Rosueti por tornarem os dias de experimento menos difíceis, pela amizade e companheirismo. Agradecimento especial a

Valéria, amiga que ganhei durante a pós-graduação e que sempre contribuiu de forma valiosa com ajuda e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

A Danila, Carol, Naty, Jonas, Aline, Geirlane, Bruno, Edu, Jackson, e Tiago, meus amigos de ontem hoje e sempre.

A minha querida amiga, Kaline, que tantas vezes foi meu apoio e sempre me incentivou para que esse projeto se concretizasse! Muito obrigada!!!

Aos amigos que fiz no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), que resistiram comigo durante tantos plantões. O meu muito obrigada a Lhaís, Evandro, Patricia, Manu, Ricardo, Berna, Alba, Barbara, Vivi, Dora, Denilton, Germana.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Medicina Diagnóstica LABLUZ, que me acolheram e me mostraram o quanto podemos transformar a vida das pessoas. Agradecimento especial ao Dr. Sullivan, Alexandre, Adriana, André, Priscila, Suliano, Silke, Eli, Salete e Mayke. Obrigada pela força e torcida.

Aos meus queridos amigos do Vinil, Renner, Mayron, Raphael, Lauro, Avelino e Elton. Obrigada por tornar a vida mais alegre e descontraída ... “Sim, já é outra viagem e o meu coração selvagem, tem essa pressa de viver. Amo vocês!

A Universidade Federal do Ceará pelo suporte científico e técnico.

Ao secretário William pelo valioso auxílio, paciência e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, muito obrigada pelo estímulo e carinho.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

O óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*) apresentam grande potencial farmacológico, como analgésico, antiespasmódico e antimicrobiano. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito modulador do óleo essencial de *Lippia alba* (OELa I) na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* e na inflamação. A Concentração Inibitória Mínima do OELa I foi determinada pelo método de microdiluição e o efeito do OELa I na atividade dos antimicrobianos de uso clínico foi avaliado pelo método *Checkboard*. Os valores obtidos de $CIM_{OELa I}$ e de ciprofloxacina foram utilizados para avaliar o efeito do tempo de exposição na viabilidade celular. Na atividade antibiofilme, a inibição de formação do biofilme foi determinada pela quantificação da massa de biofilme formado e a erradicação de biofilme foi pela contagem de células viáveis. O efeito modulador do OELa I sobre a peritonite induzida por carragenina em camundongos foi avaliada. O OELa I apresentou como componente majoritário o geranial (34,2%), o neral (25,9%) e o mirceno (12,5%). As concentrações de $CIM_{OELa I}$ para as cepas em estudo foi de 1 mg/mL. O OELa I modulou positivamente a ação da ciprofoxacina, cefepime e ceftriaxona. Após a primeira hora de tratamento com a $CIM_{OELa I}$, a viabilidade celular das cepas foi reduzida em $5 \log_{10}$ UFC/ml e a associação OELa I–CIP foi capaz de inibir o crescimento durante as 6 primeiras horas testadas. Na atividade antibiofilme, a $CIM_{OELa I}$ foi capaz de reduzir em 61,2% a massa de biofilme de *Salmonella typhi* e 38,9 % de *Shigella dysenteriae*. A $CIM_{OELa I}$ não foi capaz de erradicar o biofilme já formado, no entanto, houve redução da viabilidade microbiana no biofilme. A associação $1/16 \times CIM_{OELa I} - 1/16 CIM_{CIP}$ inibiu a formação do biofilme em 67,6 e 77, 2% para *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, respectivamente. Na avaliação do efeito antiinflamatório, a carragenina 1% (500 µg/ 0,05mL) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) no número total de leucócitos para a cavidade peritoneal quando comparado ao grupo veículo (PBS). O tratamento dos animais com a concentração de 10 e 30mg/kg de OELa I reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) a migração de leucócitos polimorfonucleares na cavidade peritoneal. O ensaio de atividade hemolítica sobre eritrócitos revelou uma $EC_{50} = 0,058$ mg/mL. O OELa I tem potencial para aplicação como antimicrobiano e antiinflamatório, pois além de interferir na formação de biofilme, é capaz de reduzir a viabilidade celular em biofilme pré-formado e pode modular de forma sinérgica a atividade de antimicrobianos e diminuir a migração de neutrófilos na inflamação.

Palavras – chave: *Lippia alba*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, biofilme, inflamação.

ABSTRACT

The essential oil of the leaves of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) presents great pharmacological potential, as analgesic, antispasmodic and antimicrobial. The objective of this study was to evaluate the effect of *Lippia alba* (OELa I) essential oil on the antimicrobial activity of clinical use of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* biofilms and inflammation. The Minimal Inhibitory Concentration of OELa I was determined by the microdilution method and by the effect of OELa I on the activity of antimicrobials for clinical use by the Checkboard method. The values obtained from CIM_{OELaI} and ciprofloxacin were used to evaluate the exposure time in the cell pathway. The antibiofilm activity, an inhibition of biofilm formation was determined by the quantification of the biofilm mass and the eradication of the biofilm was by the counting of viable cells. The modulator effect of OELa I on carrageenan-induced peritonitis in mice was evaluated. OELa I presented as major component the geranial (34.2%), the mineral (25.9%) and the myrcene (12.5%). The concentrations of CIM_{OELaI} for the strains under study were 1 mg / mL. OELa I positively modulated the action of ciprofoxacin, cefepime and ceftriaxone. After the first hour of treatment with CIM_{OELaI}, the cell viability of the strains was reduced by 5 log₁₀ CFU / ml and the OELa I-CIP association was able to inhibit growth during the first 6 hours tested. In the antibiofilm activity, CIM_{OELaI} was able to reduce by 61.2% the biofilm mass of *Salmonella typhi* and 38.9% of *Shigella dysenteriae*. CIM_{OELaI} was not able to eradicate the biofilm already formed, however, there was a reduction of microbial viability in the biofilm. The association 1/16 x CIM_{OELaI} - 1/16 CIM_{CIP} inhibited the formation of biofilm in 67.6 and 77.2% for *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae*, respectively. In the evaluation of the anti-inflammatory effect, carrageenan 1% induced a significant increase (p <0.05) in the total number of leukocytes to the peritoneal cavity when compared to the vehicle group (PBS). Treatment of animals with a concentration of 10 and 30 mg / kg OELa I significantly reduced the migration of polymorphonuclear leukocytes into the peritoneal cavity (p <0.05). The hemolytic activity assay on erythrocytes revealed an EC₅₀ = 0.058 mg/mL. OELaI has the potential for application as an antimicrobial and anti-inflammatory agent, since it interferes with biofilm formation and is able to reduce cell viability in preformed biofilm and can synergistically modulate antimicrobial activity and decrease neutrophil migration in inflammation.

Key words: *Lippia alba*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, biofilm and inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas.....	29
Figura 2	- Estrutura química dos constituintes majoritários comumente encontrados em espécies do gênero <i>Lippia</i>	32
Figura 3	- Horto de Plantas Medicinais Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará.....	33
Figura 4	- Folhas e flores do quimiotipo I de <i>Lippia alba</i> (MILL) N.E. BROWN	34
Figura 5	- Número de casos de DDA registrados por ano e região. Brasil, 2007 a 2017.....	39
Figura 6	- Faixa etária dos casos de DDA. Brasil, 2007 a 2017	40
Figura 7	- Relação filogenética da <i>Salmonella</i> spp.....	42
Figura 8	- Mecanismo de patogênese celular da <i>Salmonella</i> spp.....	44
Figura 9	- Biofilme de <i>S. typhi</i> no desenvolvimento do câncer de vesícula biliar.....	45
Figura 10	- Relação filogenética da <i>Shigella</i> spp.....	46
Figura 11	- Mecanismos de patogênese celular da <i>Shigella</i> spp.....	48
Figura 12	- Mecanismos imunológicos que levam à indução de inflamação durante os primeiros estágios de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores.....	50
Figura 13	- Estratégia experimental.....	61
Figura 14	- Determinação da CIM e CBM.....	62
Figura 15	- Determinação do efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade microbiana (<i>Time kill</i>)	63
Figura 16	- Determinação do efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos de uso clínico - método <i>Checkboard</i>	64
Figura 17	- Determinação do efeito do tempo de exposição a associação OELa I -ATB na viabilidade microbiana (<i>Time Kill</i>)	65

Figura 18	- Determinação da aderência das cepas do estudo	67
Figura 19	- Determinação da inibição da formação de biofilme	68
Figura 20	-Determinação da erradicação de biofilme de OELa I sobre biofilme maduro	69
Figura 21	- Determinação do efeito do tempo de exposição do OELa I na viabilidade microbiana em biofilme.....	70
Figura 22	- Detecção de liberação de ácido nucleico e proteína.....	71
Figura 23	- Avaliação do efeito modulador do OELa I na inflamação induzida por carragenina	72
Figura 24	- Ensaio de citotoxicidade sobre hemácias.....	74
Figura 25	-Cromatograma do OELa I realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	77
Figura 26	-Efeito do OELa I sobre a celularidade em peritonite induzida por carragenina em camundongo.....	99

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Determinação da CIM de OELa I para cepa de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749	78
Gráfico 2	- Determinação da CIM de OELa I para cepa de <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC13313	79
Gráfico 3	-Efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749	80
Gráfico 4	-Efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade de <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	80
Gráfico 5	-Isobograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CIP sobre <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i>	82
Gráfico 6	-Isobograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CPM sobre <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i>	82
Gráfico 7	-Isobograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CRO sobre <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i>	83
Gráfico 8	-Efeito do tempo de exposição ao OELa I e a associação OELa I-CIP na viabilidade de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749	84
Gráfico 9	- Efeito do tempo de exposição ao OELa I e a associação OELa I-CIP na viabilidade de <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313.....	85
Gráfico 10	-Quantificação de massa de biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i> pelo OELa I	86
Gráfico 11	-Quantificação de massa de biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i> em função do tempo	86
Gráfico 12	-Inibição da formação do biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i> pelo OELa I	87
Gráfico 13	- Inibição da formação do biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i> pela associação OELa I-CIP	88
Gráfico 14	- Efeito do OELa I na viabilidade celular em biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e <i>Shigella dysenteriae</i>	89

Gráfico 15	-Efeito modulador do OELa I na atividade antimicrobiana da ciprofloxacina sobre biofilme maduro de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	90
Gráfico 16	- Efeito do OELa I na liberação de ácido nucleico pelas cepas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	91
Gráfico 17	- Efeito do OELa I na liberação de proteína pelas cepas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	93
Gráfico 18	- Efeito do OELa I no número total de leucócitos em peritonite induzida por carragenina em camundongos	95
Gráfico 19	-Efeito do OELa I no número total de neutrófilos em peritonite induzida por carragenina em camundongos	96
Gráfico 20	- Efeito do OELa I no número total de linfócito em peritonite induzida por carragenina em camundongos	97
Gráfico 21	- Efeito do OELa I no número total de monócito em peritonite induzida por carragenina em camundongos	98
Gráfico 22	- Efeito do OELa I na liberação de IL-10 em peritonite induzida por carragenina em camundongos	100
Gráfico 23	- Efeito do OELa I na citotoxicidade de hemácias.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Descrição e referência das cepas microbianas do estudo.....	59
Tabela 2	– Descrição e referência dos meios de cultura e reagentes utilizados no estudo	59
Tabela 3	– Componentes químicos do OELa I identificados através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa	76
Tabela 4	–CIM do OELa I e antimicrobianos sobre <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	78
Tabela 5	– Efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	81
Tabela 6	– Classificação das cepas quanto à aderência	85
Tabela 7	– Cinética de liberação de ácidos nucleicos pelas cepas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i> após tratamento com diferentes concentrações de OELaI	92
Tabela 8	– Cinética de liberação de proteínas pelas cepas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i> após tratamento com diferentes concentrações de OELaI.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI Amicacina

ANOVA Análise de Variância

ATB Antibiótico

ATCC American Type Culture Collection

Bap Proteína associada ao biofilme

BHI Brain Heart Infusion

CBM Concentração Bactericida Mínima

CEF Cefepime

CIF Concentração Inibitória Fracionada

CIM Concentração Inibitória Mínima

CIP Ciprofloxacina

CLSI Clinical and Laboratory Standard Institute

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucleico

DO Densidade ótica

DOc Densidade óptica do controle

EPM Erro padrão médio

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz

ICIF Índice da Concentração Inibitória Fracionada

IRAS Infecções relacionadas à assistência à saúde

LabMicro Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada

LogUFC/mL Logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

MER Meropenem

PIA Polissacarídeo intracelular de adesão

TSA Trip Soy Agar

TSB Trip Soy Broth

UFC/mL Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	Plantas Medicinais e Fitoterápicos	24
2.1.1	<i>Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.....</i>	24
2.1.2	<i>Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.....</i>	26
2.1.3	<i>Fitoterapia no SUS</i>	27
2.1.4	<i>Farmácia Viva</i>	30
2.2	<i>Lippia alba (MILL) N.E. BROWN</i>	31
2.2.1	<i>O óleo essencial de Lippia alba (MILL) N.E. BROWN</i>	31
2.2.2	<i>Potencial etnofarmacológico da Lippia alba (MILL) N.E. BROWN.....</i>	34
2.2.3	<i>Potencial antimicrobiano da Lippia alba (MILL) N.E. BROWN</i>	36
2.2.4	<i>Associação de óleos essenciais e antimicrobianos.....</i>	37
2.3	Infecções gastrointestinais	38
2.3.1	<i>Salmonella enterica sorovar Typhi</i>	41
2.3.1.1	<i>Características gerais do gênero Salmonella</i>	41
2.3.1.2	<i>Patogênese da Salmonella enterica sorovar Typhi</i>	43
2.3.2	<i>Shigella dysenteriae</i>	45
2.3.2.1	<i>Características gerais do gênero Shigella</i>	45
2.3.2.2	<i>Patogênese da Shigella dysenteriae</i>	47
2.4	Inflamação	48
2.4.1	<i>Aspectos gerais</i>	48
2.4.2	<i>Efeito modulador da espécie do gênero Lippia na resposta inflamatória</i>	51
3	JUSTIFICATIVA	54
4	OBJETIVOS.....	56
4.1	Objetivo Geral	56
4.2	Objetivos Específicos	56
5	MATERIAIS E MÉTODOS	58
5.1	Aspectos éticos	58
5.2	Material Botânico e Composição Química	58
5.3	Cepas microbianas, meios de cultura, reagentes e antimicrobianos	59
5.4	Animais	60
5.5	Estratégia experimental	60

5.6	Determinação do potencial antimicrobiano do OELa I	61
5.6.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM)</i>	61
5.6.2	<i>Determinação do efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade microbiana (Time Kill)</i>	63
5.7	Determinação do efeito modulador do OELa I sobre antimicrobianos de uso clínico	63
5.7.1	<i>Determinação do efeito do tempo de exposição a associação OELa I - ATB na viabilidade microbiana (Time Kill)</i>	65
5.8	Determinação do potencial anti-biofilme do OELa I	66
5.8.1	<i>Determinação da inibição da formação do biofilme</i>	67
5.8.2	<i>Determinação da erradicação de biofilme</i>	68
5.8.3	<i>Determinação do efeito do tempo de exposição do OELa I na viabilidade microbiana em biofilme</i>	69
5.9	Detecção de alteração na permeabilidade de membrana pela liberação de ácidos nucleicos e proteína	70
5.10	Determinação do efeito modulador do OELa I na inflamação induzida em camundongo	71
5.10.1	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória induzida por carragenina</i>	71
5.10.1.1	<i>Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade peritoneal</i>	72
5.10.1.2	<i>Determinação dos níveis TNF-α e IL-10 no lavado peritoneal</i>	73
5.11	Citotoxicidade	73
5.11.1	<i>Determinação do efeito do OELa I sobre hemácias</i>	73
5.12	Análise estatística.....	74
6	RESULTADOS	76
6.1	Composição química do óleo essencial das folhas do quimiotipo I de <i>Lippia alba</i>	76
6.2	Efeito antimicrobiano do OELa I sobre células planctônicas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	77
6.2.1	<i>Efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade microbiana de Salmonella typhi e de Shigella dysenteriae</i>	79
6.3	Efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	81

6.3.1	Efeito do tempo de exposição às associações OELa I-ATB na viabilidade microbiana de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	83
6.4	Caracterização e cinética de formação de biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	85
6.4.1	Efeito anti-biofilme do OELa I e da associação OELa I-ATB na inibição da formação de biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	87
6.4.2	Efeito anti-biofilme das associações OELa I-ATB na erradicação de biofilme de <i>Salmonella typhi</i> e de <i>Shigella dysenteriae</i>	88
6.5	Alteração na permeabilidade de membrana pela liberação de ácidos nucléicos e proteína	90
6.6	Efeito modulador do OELa I na inflamação induzida em camundongo	94
6.6.1	Efeito modulador do OELa I sobre os leucócitos	97
6.6.2	Efeito modulador do OELa I sobre o perfil de citocinas	100
6.7	Efeito do OELa I sobre a membrana eritrocitária	100
7	DISCUSSÃO	103
8	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXOS	124

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Relatórios da Organização Mundial da Saúde estimam que a cada ano mais de 600 milhões de pessoas ficam doentes depois de consumirem alimentos contaminados, resultando em quase 420.000 mortes (WHO,2015). A diarreia continua a ser uma das principais causas de mortalidade em crianças pequenas, em países de baixa renda (WHO, 2014).

As bactérias envolvidas com infecções gastrointestinais podem causar inflamação do trato digestivo, além de promover sintomas como diarreia, cólicas estomacais e febre. As bactérias mais envolvidas nas gastroenterites são *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus* (FHOGARTAIGH, 2013).

As infecções por *Salmonella* spp correspondem a mais de 25% de todos os surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, de 2007 a 2016 (BRASIL, 2016). Entre os mais de 2500 sorotipos descritos, *S. enteritidis* e *S. typhimurium* são dois dos sorotipos mais prevalentes isolados (CAPALONGA *et al.*, 2014).

O gênero *Shigella*, por sua vez, é composto por quatro espécies diferentes, cada uma com vários sorogrupos, todos apresentando similaridade fenotípica, incluindo patogenicidade invasiva (THANH *et al.*, 2016).

A aderência superficial e a formação de biofilme são dois dos mecanismos importantes que essas cepas utilizam para sobreviver fora das células hospedeiras. A produção de biofilme pode exercer um papel fundamental no apoio à colonização e persistência crônica de *S. typhi*, devido a bile induzir a produção matriz exopolissacarídica que facilita a formação de biofilme em cálculos biliares humanos (CRAWFORD *et al*, 2008). A produção de biofilme aumenta a resistência microbiana às forças físicas, aos antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro (ABDULLAHI *et al.*, 2016; SATPATHY *et al.*, 2016).

Ciprofloxacina e a ceftriaxona são antimicrobianos recomendadas pela OMS para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., no entanto, a emergência de cepas multiresistentes já foi relatada (GARCÍA-FERNÁNDEZ *et al*, 2015; GU *et al*, 2012), mostrando a necessidade de alternativas terapêuticas.

Nesse contexto, as plantas medicinais surgem como promissoras fontes de novas moléculas com potencial antimicrobiano, que devem ser investigadas. *Lippia alba* (Verbenaceae) é uma planta nativa da América do Sul, e seu potencial farmacológico está relacionado com a variação na composição química de seu óleo essencial. Essa variação leva a classificação desta espécie em três quimiotipos já descritos no Ceará, denominados de acordo com o componente químico majoritário presente (BRAGA *et al.*, 2005; JULIÃO *et al.*, 2003).

É uma planta bastante utilizada na medicina popular no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias, além de ser utilizada como antiespasmódico, antipirético, anti-inflamatório, antidiarreico, analgésico e sedativo (CARVALHO *et al.*, 2017; MATOS, 1996; MORAIS *et al.*, 2005; PEIXOTO *et al.*, 2015). O óleo essencial de *Lippia alba* (OELa) apresenta potencial antimicrobiano e interação com ingredientes alimentares (MACHADO *et al.*, 2014). De acordo com estudo de Porfirio *et al.* (2018), o OELa apresenta atividade sobre cepas planctônicas e biofilme de *Staphylococcus aureus*, tais propriedades são devido aos seus constituintes ativos, tais como monoterpenos e compostos fenólicos (TREVISAN *et al.*, 2016).

Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito modulador do óleo essencial de *Lippia alba* na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, e seu efeito modulador na inflamação induzida em camundongos.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas Medicinais e Fitoterápicos

Desde tempos remotos a humanidade se utiliza das propriedades da fitoterapia. Apesar dos avanços na medicina alopática, as baixas condições de acesso hospitalar, exames e tratamento para a população mais carente faz com que o uso de plantas medicinais seja amplamente difundido. Seja em pequenas cidades do país ou em grandes metrópoles, ainda é possível evidenciar o uso de plantas medicinais, tal fato torna relevante e necessária a realização de pesquisas farmacológica, botânica e etnológica desses vegetais (MACIEL et al. 2002).

O medicamento fitoterápico e as plantas medicinais valorizam a cultura e o conhecimento tradicional, além de fortalecer o arranjo produtivo local, para garantir a oferta desses produtos ao usuário do SUS (BRASIL, 2015).

De acordo com a RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, droga vegetal e/ou planta medicinal, ou suas partes, são plantas que contêm substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2014).

Por sua vez, o fitoterápico é um produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014).

Ao total, o SUS oferta doze medicamentos fitoterápicos à população, dentre eles, alguns para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite (BRASIL, 2016). Esses produtos são seguros para a saúde, pois são testados para o conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como os medicamentos convencionais.

2.1.1 Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

No ano de 2006, através do Decreto da Presidência da República nº. 5.813, de 22 de junho, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que estabelece diretrizes e linhas prioritárias voltadas à garantia do acesso seguro e o uso racional de plantas

medicinais e fitoterápicos em nosso país. Também estabelece o desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006).

Ao total são dezessete diretrizes que norteiam todas as atividades desenvolvidas nessa política:

“ 1. Regular o cultivo, o manejo sustentável, a produção, a distribuição e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, considerando as experiências da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização.

2. Promover a formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos.

3. Incentivar a formação e a capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos.

4. Estabelecer estratégias de comunicação para divulgação do setor plantas medicinais e fitoterápicos.

5. Fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população.

6. Promover a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e organizações não governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos.

7. Apoiar a implantação de plataformas tecnológicas piloto para o desenvolvimento integrado de cultivo de plantas medicinais e produção de fitoterápicos.

8. Incentivar a incorporação racional de novas tecnologias no processo de produção de plantas medicinais e fitoterápicos.

9. Garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos.

10. Promover e reconhecer as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros.

11. Promover a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e de manipulação e produção de fitoterápicos, segundo legislação específica.

12. Promover o uso sustentável da biodiversidade e a repartição dos benefícios derivados do uso dos conhecimentos tradicionais associados e do patrimônio genético.

13. Promover a inclusão da agricultura familiar nas cadeias e nos arranjos produtivos das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos.

14. Estimular a produção de fitoterápicos em escala industrial.
15. Estabelecer uma política intersetorial para o desenvolvimento socioeconômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos.
16. Incrementar as exportações de fitoterápicos e insumos relacionados, priorizando aqueles de maior valor agregado.
17. Estabelecer mecanismos de incentivo para a inserção da cadeia produtiva de fitoterápicos no processo de fortalecimento da indústria farmacêutica nacional. ” (BRASIL, 2006).

No mesmo ano, através de portaria do Ministério da Saúde GM/MS nº 971, já havia sido criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), abrangendo, além da fitoterapia, a homeopatia, a medicina tradicional chinesa/acupuntura, o termalismo/crenoterapia e a medicina antroposófica. Essas políticas incrementaram a discussão sobre a oportunidade, a importância, as dificuldades, as facilidades e as vantagens da implementação da Fitoterapia nos serviços de saúde do SUS (BRASIL, 2015).

2.1.2 Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

A Portaria Interministerial nº 2960, de 9 de dezembro de 2008, aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O processo de formulação desse programa teve seus fundamentos na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que definiu como princípios orientadores:

- Ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde (usuários – SUS);
- Uso sustentável da biodiversidade brasileira;
- Valorização e preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais;
- Fortalecimento da agricultura familiar;
- Crescimento com geração de emprego e renda, redutor das desigualdades regionais;
- Desenvolvimento tecnológico e industrial;
- Inclusão social e redução das desigualdades sociais (BRASIL, 2009).

O programa se propõe:

- “A construir e/ou aperfeiçoar marco regulatório em todas as etapas da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos, a partir dos modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países, promovendo a adoção das boas práticas de cultivo, manipulação e produção de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva.
- Desenvolver estratégias de comunicação, formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em consonância com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS.
- Promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros.
- Promover o uso sustentável da biodiversidade e a repartição dos benefícios decorrentes do acesso aos recursos genéticos de plantas medicinais e ao conhecimento tradicional associado.
- Promover a inclusão da agricultura familiar nas cadeias e nos arranjos produtivos das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos.
- Estabelecer mecanismos de incentivo ao desenvolvimento sustentável das cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos, com vistas ao fortalecimento da indústria farmacêutica nacional e das exportações de fitoterápicos e insumos.
- Estabelecer uma política intersetorial para o desenvolvimento socioeconômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos”. (BRASIL, 2009).

2.1.3 Fitoterapia no SUS

As Práticas Integrativas e Complementares se enquadram no que a Organização Mundial de Saúde (OMS) denomina de medicina tradicional e medicina complementar e alternativa (MT/ MCA) e, sobre esse tema, as plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos da MT/ MCA e vêm, há muito, sendo utilizados pela população brasileira. O termo fitoterapia foi dado à terapêutica que utiliza os medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais, e que tem a sua origem no

conhecimento e no uso popular; Essas plantas são tradicionalmente denominadas medicinais (DE PASQUALE, 1984).

A OMS considerando as plantas medicinais como importantes instrumentos da assistência farmacêutica, por meio de vários comunicados e resoluções, expressa sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário ao observar que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento depende delas no que se refere à Atenção Primária à Saúde (WHO, 2011).

Em alguns países industrializados, o uso de produtos da medicina tradicional é igualmente significativa, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de sua população tem usado esses recursos da medicina tradicional sobre a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (WHO, 2011).

As ações com plantas medicinais e fitoterapia, há muito inseridas no SUS, acontecem prioritariamente na Saúde da Família. De forma complementar, as ações da fitoterapia promovem o fortalecimento do vínculo, a participação popular, a autonomia dos usuários e o cuidado integral em saúde (RODRIGUES e DE SIMONI, 2010).

No Brasil, a partir da década de 80, diversas ações e programas de fitoterapia foram implantados, a partir da publicação da Resolução Ciplan, 1988, que regulamentou, a prática da fitoterapia no serviço público. Alguns estados/municípios desenvolveram políticas e legislação específica para o serviço de fitoterapia no SUS e instalaram laboratórios de produção, disponibilizando plantas medicinais e/ou seus derivados. Outros, no entanto, com menor nível de complexidade, possuem hortos com espécies de plantas medicinais que servem como fonte de matéria-prima, produção de mudas e também para educação em saúde e orientações sobre o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (RODRIGUES; SANTOS; DE SIMONI, 2011).

Em 2008, segundo diagnóstico, as ações e serviços da fitoterapia, modalidade das Práticas Integrativas e Complementares mais incidente no SUS, eram ofertados em 350 municípios/Estados, distribuídos em todas as regiões do País. Nestes, os serviços disponibilizam plantas medicinais em uma ou mais das seguintes formas: planta medicinal seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado (BRASIL, 2009). A distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas está representada na FIGURA 1.

Figura 1 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas.



Fonte: Pesquisa Expertise/Ministério da Saúde, 2008.

Conforme dados de 2014 do 2º ciclo do Programa de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica, há registro de 2.160 Unidades Básicas de Saúde que disponibilizam fitoterápicos ou plantas medicinais, sendo que 260 delas disponibilizam planta *in natura*, 188 a droga vegetal, 333 o fitoterápico manipulado e 1.647 disponibilizam o fitoterápico industrializado.

Os dados apresentados também indicam que a Fitoterapia é praticada por 1.457 equipes de saúde e a Farmácia Viva está instalada em oitenta municípios. No ano de 2016 foram registrados 89.037 atendimentos de Fitoterapia, em 1.205 estabelecimentos da Atenção Básica, distribuídos em 822 municípios, segundo dados do Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica (BRASIL, 2018).

2.1.4 Farmácia Viva

O Ceará é berço da “Farmácia Viva”, que possui, desde 1999, lei que institui a Política Estadual de Implantação da Fitoterapia em Saúde Pública, regulamentada pelo Decreto

nº 30.016, de 30 de dezembro de 2009, e conta com programa na capital Fortaleza, com hortos de plantas medicinais, laboratório de produção de fitoterápicos ofertados nas unidades de saúde.

O Projeto Farmácias Vivas é um programa de assistência social farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais e fitoterápicos, idealizado pelo Professor Francisco José de Abreu Matos e organizado sob a influência da OMS. As plantas medicinais incluídas nas Farmácias Vivas possuem eficácia e segurança terapêuticas comprovadas e certificação botânica expedida pelo Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC) (CARDOSO, 2016).

A maioria das experiências se baseia no modelo desenvolvido no Ceará, pelo prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos. Em virtude da importância desse programa no contexto da fitoterapia na rede pública, o Ministério da Saúde, por meio da Portaria GM nº 886, de 20 de abril de 2010, instituiu a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), sob gestão estadual, municipal ou do Distrito Federal. A Farmácia Viva realizará todas as etapas, desde o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos. A portaria traz ainda que não é permitida a comercialização de plantas medicinais e fitoterápicos elaborados a partir das etapas citadas (BRASIL, 2010).

Em 2012, o Secretário de Saúde do Estado do Ceará através da Portaria nº 275/2012, designou a Relação Estadual de Plantas Mediciniais (REPLAME-CE). Foram listadas 30 plantas medicinais regionais selecionadas de modo a garantir a permanente disponibilidade para a população dando suporte a prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças prevalentes no Ceará (BANDEIRA *et al.*, 2015).

No Horto de Plantas Mediciniais Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, é possível entrar em contato com as principais plantas medicinais da flora cearense e que estão na REPLAME. Destaque para a planta popularmente conhecida como erva cidreira (*Lippia alba*).

2.2 *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN

L. alba é integrante do segundo maior gênero da família Verbenaceae, presente em sua maioria ao Brasil, México, Paraguai e Argentina. No Brasil, é popularmente conhecida

como “erva cidreira” ou “falsa melissa” (HENNEBELLE *et al.*, 2008). O gênero *Lippia*, contém cerca de 250 espécies, dentre elas, ervas e arbustos. Essas espécies têm valor econômico por serem usadas como fonte de óleos essenciais e extratos (PASCUAL *et al.*, 2001).

Trata-se de um arbusto com morfologia variável, alcançando até um metro e meio de altura, nativa de quase todo território brasileiro. Seus ramos são finos, longos, esbranquiçados e arqueados. As folhas podem ser ásperas, com ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. Flores reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (CARDOSO, 2016).

Sua importância está associada ao seu uso tradicional na medicina popular para tratamento de infecções respiratórias, cutâneas e gastrintestinais (TEIXEIRA, 2009). Seu OELa é produzido principalmente nas folhas, estando armazenado nos parênquimas paliçádico e lacunoso, bem como nos tricomas secretores (TAVARES; MOMENTÉ; DO NASCIMENTO, 2011).

2.2.1 O óleo essencial de *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN

Os óleos essenciais são produzidos nas três vias do metabolismo secundário: chiquimato (compostos aromáticos), mevalonato (derivados dos terpenoides) e malonato (ácidos graxos saturados e insaturados, os polifenóis e os poliacetilenos). Estes são constituídos principalmente de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) (CASTRO *et al.*, 2004; AMARAL; SANTOS, 2014). Estudos da composição química do óleo essencial da *L. alba* em diferentes regiões reportam variações quantitativa e qualitativa dos constituintes, o que realmente comprova a existência de muitos quimiotipos nesta espécie no Brasil (HENNEBELLE *et al.*, 2008, CASTRO, 2001; MATOS, 1996). No Brasil, há pelo menos três quimiotipos principais denominados tipos citral, carvona e linalol (YAMAMOTO, 2006).

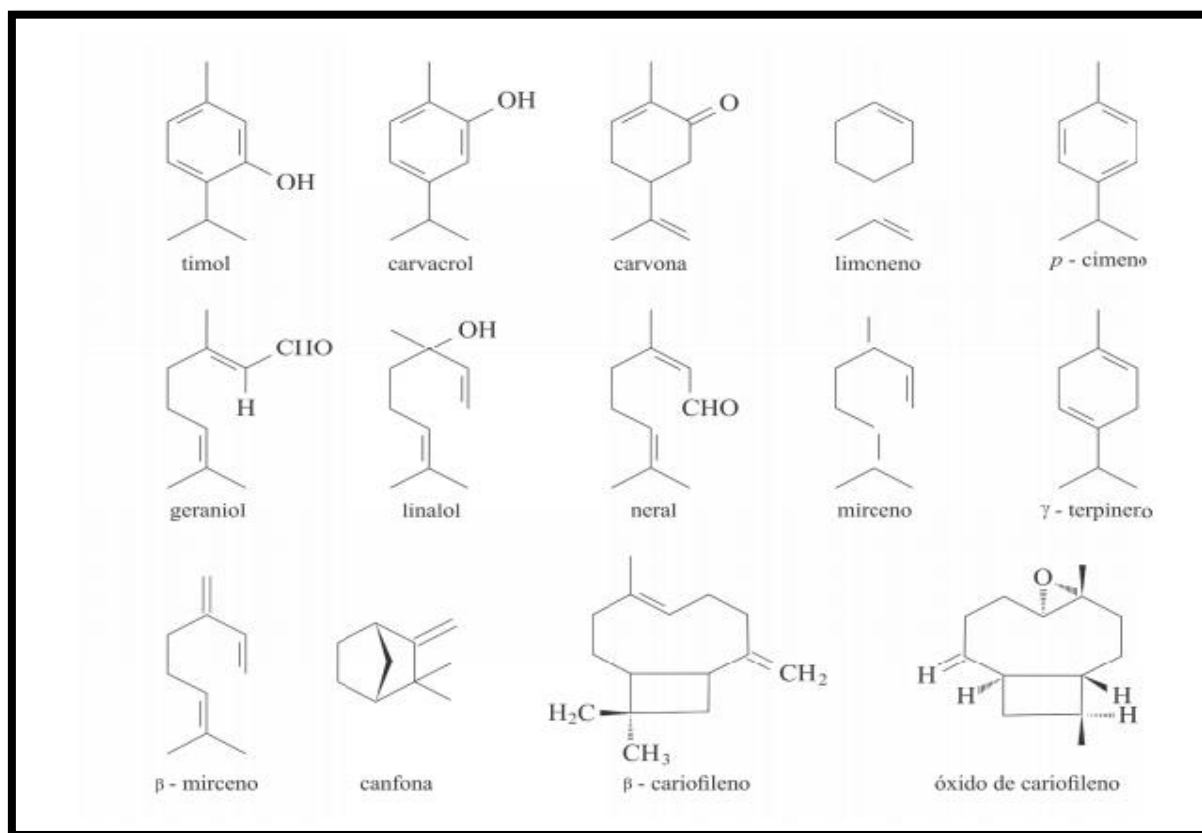
Os metabólitos secundários descritos para *L. alba* incluem flavonóides, taninos, saponinas, iridóides triterpênicos, resinas, mucilagem e óleo essencial. No estudo de Gomes *et al.* (2019) foi realizada análise sazonal dos constituintes, e o acteosídeo foi o principal metabólito detectado de julho a novembro, enquanto o tricín-7-O-diglucuronídeo foi o composto principal em todos os outros meses. Além disso, os fenilpropanóides foram predominantes no inverno e os flavonoides temporada de verão.

Outros fatores também como temperatura, umidade, luminosidade, altitude, pluviometria, radiação ultravioleta, condições de solo e nutrientes, sazonalidade, ciclo

circadiano, método de coleta, secagem e parte da planta utilizada podem influenciar diretamente na composição e, conseqüentemente, nas suas atividades biológicas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PETROPOULOS *et al.*, 2018).

A estrutura química dos constituintes majoritários comumente encontrados em espécies do gênero *Lippia* seguem representados na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química dos constituintes majoritários comumente encontrados em espécies do gênero *Lippia*



Fonte: Costa et al (2017).

De acordo com Pascual et al. (2001), faz parte da composição química do óleo essencial dessa planta, os monoterpenos (borneol, cânfora, 1,8-cineol, citronelol, geraniol, neral, limoneno, mirceno, piperetona, sabineno, 2-undecanona) e os sesquiterpenos (α-muuroleno, β-cariofileno, β-cubebeno, β-elemeno, γ-cadieno, alo-aromadendreno, óxido de cariofileno). No Ceará, foi verificada a ocorrência de três quimiotipos de *Lippia alba*, que apresentam diferenças quanto à composição química dos óleos essenciais e teores de seus componentes majoritários, citral, carvona, mirceno e limoneno.

Os quimiotipos receberam as designações de acordo com os constituintes majoritários encontrados: o quimiotipo I, com mirceno (10,5%) e citral (51,1%), mais raro no Ceará; o quimiotipo II, com limoneno (23,2%) e citral (63%) e o quimiotipo III, com limoneno (12,1%) e carvona (54,7%) e ausência de citral (MATOS; VIANA; BANDEIRA, 2001; TEIXEIRA, 2009; TEIXEIRA, 2016).

No Horto de Plantas Medicinais Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará são cultivadas diversas espécies da flora cearense (FIGURA 3).

Figura 3 - Horto de Plantas Medicinais Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará



Fonte: A autora (2019).

O quimiotipo I de *Lippia alba* também é cultivado e mantido no Horto de Plantas Medicinais Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (FIGURA 4).

Figura 4 – Folhas e flores do quimiotipo I de *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN



Fonte: A autora (2019). Horto de Plantas Medicinais Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos/UFC

2.2.2 Potencial etnofarmacológico da *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN

Trata-se de uma planta bastante utilizada na medicina popular no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias, além de ser utilizada como antiespasmódico, antipirético, anti-inflamatório, antidiarreico, analgésico e sedativo (CARVALHO *et al.*, 2017; PEIXOTO *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2005; MATOS, 1996).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que as preparações a base de *L. alba* podem ser muito diversificadas, podendo ser como extratos alcoólicos (TEIXEIRA DE OLIVEIRA *et al.*, 2018), elixir (CARDOSO, 2016) e principalmente, como óleo essencial (MORENO *et al.*, 2018). Toda importância dessa espécie se deve ao uso em distúrbios estomacais como cólicas, indigestão, dores, náuseas e espasmos (SILVA, 2014; VÁSQUEZ; DE MENDONÇA; NODA, 2014).

No Ceará, o OLEa das plantas com alta concentração de limoneno-carvona (OLEa III) apresentam ação mucolítica, enquanto plantas com alta concentração de limoneno-citral (OLEa II), apresentam ação sedativa, espasmolítica e ansiolítica. As folhas de erva cidreira do quimiotipo mirceno-citral (OLEa I) são utilizadas como chás, apresentando propriedades calmantes e espasmolíticas suaves, em função do citral e analgésica devido à ação do mirceno (VALE *et al.*, 2002).

Atualmente, o elixir de erva-cidreira (*L.alba* quimiotipo II) é um fitoterápico dispensado com prescrição médica, existindo uma demanda importante para o Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) por sua indicação nos quadros de ansiedade (GOMES, 2014; CARDOSO, 2016).

De acordo com KAMPKE et al. (2018), o OLEa apresentou atividade inibitória na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS e baixo efeito genotóxico em peixes e mamíferos. O OELa pode ser usado como anestésico eficaz natural e de baixa toxicidade, contribuindo para a melhoria de produção de alimentos e obedecendo as recomendações do principais agências reguladoras mundiais (KAMPKE et al., 2018).

Estudos mais recentes apontam o efeito do OELa sobre a motilidade do músculo liso e o efeito vasodilator. Os resultados demonstram que o OELa, e seus constituintes majoritários, o citral e o limoneno causaram o relaxamento do músculo liso uterino (PEREIRA-DE-MORAIS et al., 2018). No estudo de Da Silva (2018), o OELa e o citral produziram um efeito vaso relaxante na aorta isolada, potencializado pela presença do endotélio.

Na avaliação do efeito antiespasmódico, o OELa induz um antagonismo não competitivo no receptor muscarínico mediando contrações induzidas pela acetilcolina, o antagonismo contrátil também pode estar associado à produção de óxido nítrico (BLANCO et al, 2013).

A atividade antiparasitária foi evidenciada e descrita no estudo de Moreno et al. (2018), o OELa extraído do quimiotipo de *L. alba* (citral) demonstrou atividade tripanocida significativa nas três formas de *T. cruzi*. Na busca de elucidar os possíveis mecanismos de ação, os constituintes majoritários citral, óxido de cariofileno e limoneno mostraram uma possível indução do apoptose. Quanta a seletividade, o limoneno apresentou melhor atividade no *T.cruzi* (MORENO et al., 2018).

Estudos com outros parasitas, também evidenciaram potencial atividade amebicida de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia*, inclusive a *L.alba*. A atividade sobre trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* foi observada após 24 horas de exposição ao óleo e seus principais compostos rotundifolona, carvona e carvacrol (SANTOS et al., 2016).

2.2.3 Potencial antimicrobiano da *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN

O potencial antimicrobiano das espécies de *Lippia* já é bem descrito, no entanto, estudos que descrevam mecanismos de ação e o efeito sobre biofilme de bacilos Gram-negativo,

ainda é limitado. De todo modo, estudos que avaliem a ação do OELA e corroborem para o conhecimento etnofarmacológico, devem ser estimulados. Além do uso terapêutico do OELA, este pode ser aplicado na indústria de alimentos e no desenvolvimento de saneantes.

Na atividade sobre bactérias Gram-positivo, o estudo de Porfirio et al. (2018) demonstraram a atividade do OELA sobre cepas planctônicas (bactérias em vida livre) e biofilme de *Staphylococcus aureus*, e tais propriedades são devidos aos seus constituintes ativos, como monoterpenos e compostos fenólicos (TREVISAN et al., 2016). De acordo com Teixeira (2015), o OELA (limoneno e citral) apresenta elevada atividade sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, além de ser um agente cicatrizante de feridas cutâneas. Além do OELA, O extrato etanólico e as frações mostraram atividade sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* resistentes a múltiplos fármacos (TEIXEIRA DE OLIVEIRA et al., 2018).

A diversidade de aplicação do OELA é notória. Na odontologia, por exemplo, é possível observar a aplicação desse óleo essencial na prevenção da cárie dentária, pois o OELA apresenta atividade anti-biofilme, com erradicação do biofilme de *Streptococcus mutans* (TOFIÑO-RIVERA et al., 2016).

Na atividade sobre bactérias Gram-negativo, estudos mais recentes mostram que o OELA inibiu a formação do biofilme de *Aeromonas* spp., no entanto, não foi capaz de erradicar o biofilme formado (DE SOUZA, 2017). No biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, o OELA foi capaz de reduzir a viabilidade celular em biofilme pré-formado e modular sinergicamente a atividade da ciprofloxacina (BATISTA et al., 2018).

Todo o potencial antimicrobiano desse óleo, também pode ser utilizado na indústria de alimentos, devido à ação sobre cepas de *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*. O OELA pode apresentar interação com ingredientes alimentares, com atividade potencializada em maiores concentrações de amido e em pH ácido (MACHADO et al., 2014).

Diante dos efeitos descritos, avaliar a atividade do OELA remete a possibilidade de uma alternativa terapêutica eficaz no combate às infecções. As bactérias envolvidas com infecções gastrointestinais podem causar inflamação do trato digestivo, além de promover sintomas como diarreia, cólicas estomacais e febre.

2.2.4 Associação de óleos essenciais e antimicrobianos

Estudos relacionados à ação antimicrobiana de produtos vegetais e a possibilidade

de seus sinergismos com agentes antimicrobianos convencionais tem sido frequente e os resultados apresentados são bastante satisfatórios. O uso de associações de antibióticos com produtos de plantas medicinais sobre linhagens microbianas resistentes, pode ser uma nova estratégia para o tratamento de infecções, possibilitando o uso de agentes antimicrobianos ineficazes quando utilizados isoladamente (BUSH *et al.*, 2011).

Em uma combinação, a interação entre antimicrobianos pode ser sinérgica, aditiva ou antagônica. O sinergismo é obtido pela combinação de dois antimicrobianos compostos que produzem uma atividade antibacteriana superior à soma da atividade antibacteriana dos componentes individuais. Um efeito aditivo é produzido pela combinação de antimicrobianos que produzem um efeito antimicrobiano que é igual à soma dos compostos individuais. Um efeito antagônico resulta em uma diminuição da atividade antimicrobiana de dois compostos em comparação com sua atividade antimicrobiana individual (BUSH *et al.*, 2011).

Para calcular os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (IFIC), é necessário o valor de concentração inibitória mínima (CIM), o IFIC é interpretado como sinérgico se o índice FIC $< 0,5$, aditivo se $0,5 < \text{índice FIC} < 4$, ou antagonista se o índice FIC > 4 (ODDS, 2003).

A distribuição de estudos que apontam o efeito modulador de óleos essenciais sobre antimicrobianos que não são mais utilizados é uma alternativa, pois devido à resistência dos microrganismos, inúmeros antimicrobianos utilizados na clínica estão ficando obsoletos. A atividade antimicrobiana de um determinado óleo essencial pode depender de um ou mais constituintes que compõem o óleo essencial. No estudo de Betoni *et al.* (2006), foi possível observar o efeito do óleo essencial capim limão e cravo da Índia sobre cepas de *S. aureus* quando associados a diferentes antimicrobianos. No estudo de Ushimaru (2007) não foi observado o mesmo perfil de sinergismo quando o mesmo óleo essencial foi utilizado sobre cepas de *E. coli*, tendo obtido casos de antagonismo.

O efeito da combinação de agentes antimicrobianos, também foi estudado por Gallucci *et al.* (2006). Utilizando terpenos como carvona, carvacrol, timol, eugenol e mirceno, em associação com penicilina sobre *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *E. coli*. Para a cepa MRSA verificaram sinergismo apenas para carvona-penicilina e antagonismo para timol-penicilina.

O timol e carvacrol, quando associados a penicilina apresentaram efeito sobre cepas de *E. coli* e *S. typhimurium* (PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010). No estudo de Moon *et al.* (2011) foi relatado que o eugenol exibia sinergismo quando associado a ampicilina sobre bactérias cariogênicas (*S. criceti*, *Streptococcus gordonii*) e quando associado a gentamicina apresentava

efeito sinérgico sobre as cepas de *Streptococcus sanguinis* e *Porphyromonas gingivalis* (MOON *et al.*, 2011).

No estudo de Duarte *et al.* (2012) a combinação de óleo essencial de coentro com gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e tetraciclina sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* mostrou eficácia, com um IFIC de 0,047. O estudo indicou que essa interação poderia melhorar a eficácia antimicrobiana da tetraciclina, ciprofloxacina e gentamicina e pode contribuir para a dessensibilizar *Acinetobacter baumannii* para a ação do cloranfenicol.

Estudos que apresentem a associação do OELa também já foram descritos, como por exemplo no estudo de Rocha, (2012) que avaliou o efeito sinérgico do OELa com a oxacilina no combate a cepas de *S.aureus* multirresistentes. De Sousa *et al.* (2017) apresentaram o efeito sinérgico do OELa (citrál) combinado com o florfenicol na redução da dose mínima do antibiótico e na formação inicial do biofilme de cepas de *Aeromonas spp.*

A aplicação dos estudos de efeito modulador de produtos naturais na atividade de antimicrobianos é uma alternativa viável no combate a microrganismo multirresistentes, na recuperação de antimicrobianos obsoletos e na terapêutica mais acessível à população.

2.3 Infecções gastrointestinais

Gastroenterite aguda, gastroenterocolite aguda, dor de barriga, disenteria, desarranjo, destempero, entre outras, são sinônimas para as Doenças Diarreicas Agudas (DDA). No Brasil, o Ministério da Saúde define DAD quando ocorre diminuição da consistência das fezes, aumento do número de evacuações, com fezes aquosas; em alguns casos, há presença de muco e sangue (disenteria). São autolimitadas, com duração de até 14 dias. Podem ser classificadas em três tipos: diarreia sem desidratação; diarreia com desidratação; e diarreia com desidratação grave. Quando tratadas incorretamente ou não tratadas, podem levar à desidratação grave e ao distúrbio hidroeletrólítico, podendo ocorrer óbito, principalmente quando associadas à desnutrição (BRASIL, 2017).

No ano de 2012, a diarreia foi considerada a segunda maior causa de mortalidade em crianças menores de 5 anos, embora evitável e tratável. Atingindo percentual de 9% do total das 6,6 milhões de mortes no ano, com concentração maior em regiões mais pobres. Em 2014, cerca de 1.400 crianças morreram vítimas de doenças diarreicas desencadeadas por água contaminada, falta de saneamento ou falta de higiene (UNICEF, 2014).

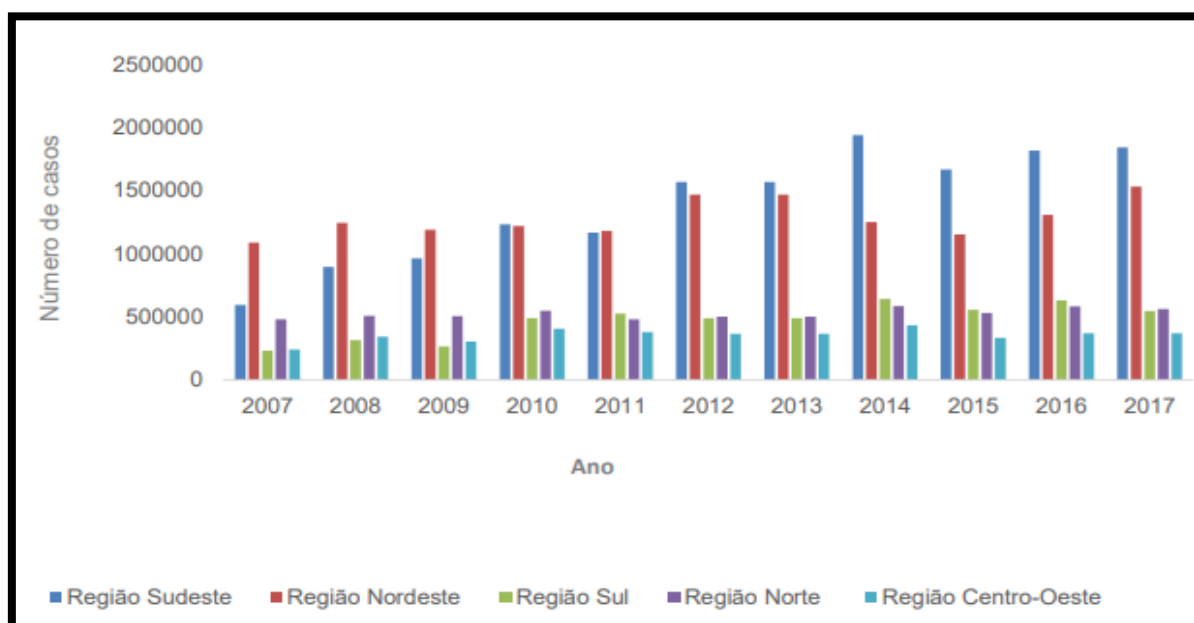
A cada ano, a diarreia mata cerca de 525.000 crianças menores de cinco anos no mundo e é uma das principais causas de desnutrição em crianças menores de cinco anos. Uma

proporção significativa de doenças diarreicas é transmitida pela água e pode ser prevenida através de água potável, saneamento e higiene adequada (BRASIL, 2018).

Os casos individuais de DDA são de notificação compulsória em unidades sentinelas para monitorização das DDA (MDDA). O principal objetivo da Vigilância Epidemiológica das Doenças Diarreicas Agudas (VE-DDA) é monitorar o perfil epidemiológico dos casos, visando detectar precocemente surtos. Os casos de DDA são notificados no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica das DDA (SIVEP_DDA) e o monitoramento é realizado pelo acompanhamento contínuo dos níveis endêmicos.

No Brasil em 2016, 87,3% dos domicílios ligados à rede geral tinham disponibilidade diária de água, percentual que era de 66,6% no Nordeste. Na região, em 16,3% dos domicílios o abastecimento ocorria de uma a três vezes por semana e em 11,2% dos lares de quatro a seis vezes. Foi o que revelaram os resultados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua 2012-2016, divulgada pelo IBGE. Os dados disponíveis sobre o perfil epidemiológico das DDA nos últimos anos, seguem na Figura 5 (BRASIL, 2018).

Figura 5 - Número de casos de DDA registrados por ano e região. Brasil, 2007 a 2017.

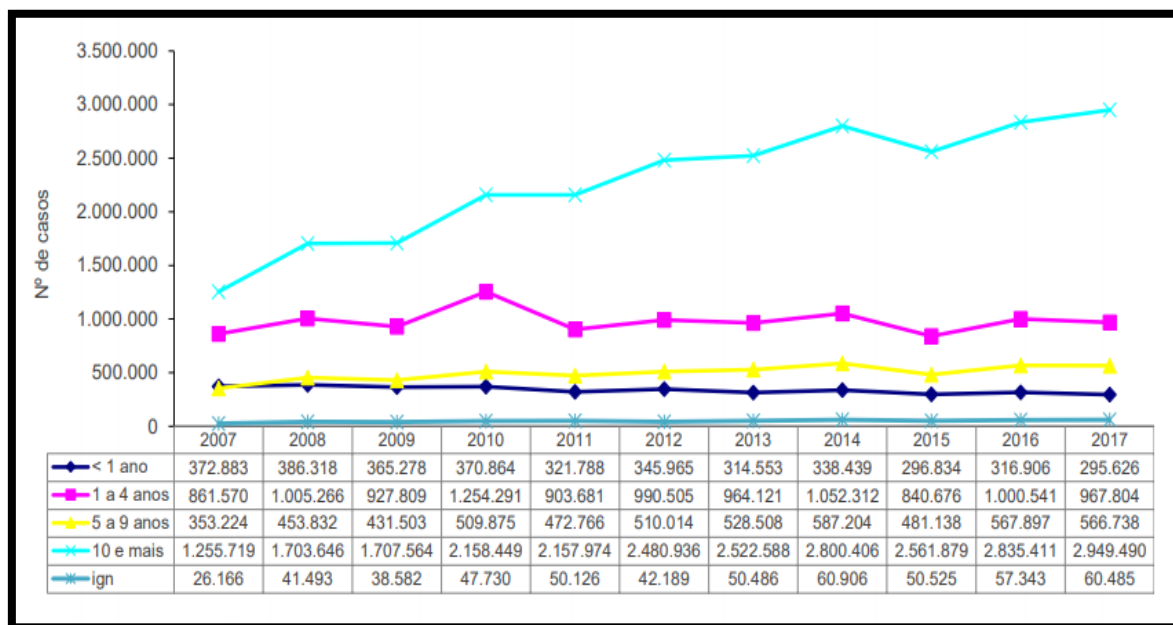


Fonte: SIVEP_DDA/VEDDA/SVS/Ministério da Saúde (2018).

A região Norte apresentava o menor percentual de domicílios em que a principal forma de abastecimento de água era a rede geral de distribuição (59,8%). Por outro lado, a região se destacava quando se tratava de abastecimento através de poço profundo ou artesiano (20,3%); poço raso, freático ou cacimba (12,7%); e fonte ou nascente (3,1%). Os dados

disponíveis sobre a faixa etária das DDA nos últimos anos, aponta que as crianças na faixa etária de dez anos ou mais, foram as mais acometidas (FIGURA 6).

Figura 6 - Faixa etária dos casos de DDA. Brasil, 2007 a 2017



Fonte: SIVEP_DDA/VEDDA/SVS/Ministério da Saúde (2018).

De acordo com BÜHLER et al. (2014), as crianças menores de um ano que residem no Norte e Nordeste do Brasil estão mais expostas ao risco de óbito por diarreia devido ao esgotamento sanitário e abastecimento de água. O modo de transmissão é específico para cada agente etiológico, e pode acontecer transmissão direta (pessoa a pessoa) ou indireta (água e alimentos contaminados). A contaminação pode ocorrer em toda a cadeia de produção alimentar, desde as atividades primárias até o consumo (plantio, transporte, manuseio, cozimento, acondicionamento).

A doença transmitida por alimento (DTA) é considerada uma síndrome constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados. Sintomas digestivos, não são as únicas manifestações dessas doenças, podem ocorrer ainda afecções extra intestinais, em diferentes órgãos e sistemas como: meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido (BRASIL, 2010).

As DTA podem ser causadas por:

- Toxinas: produzidas pelas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Vibrio* spp, etc.
- Bactérias: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, etc.
- Vírus: *Rotavírus*, *Noravírus*, etc.
- Parasitas: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, etc.
- Substâncias tóxicas: metais pesados, agrotóxicos, etc.

A sobrevivência e a multiplicação de um agente etiológico nos alimentos dependem de seus mecanismos de defesa e das condições do meio, expressas principalmente pelos níveis de oxigenação, pH e temperatura, variável de acordo com cada alimento (BRASIL, 2016). Nesse estudo, destacaremos as implicações das bactérias *Salmonella enterica* sorovar Typhi e *Shigella dysenteriae*.

2.3.1 *Salmonella enterica* sorovar Typhi

2.3.1.1 Características gerais do gênero *Salmonella*

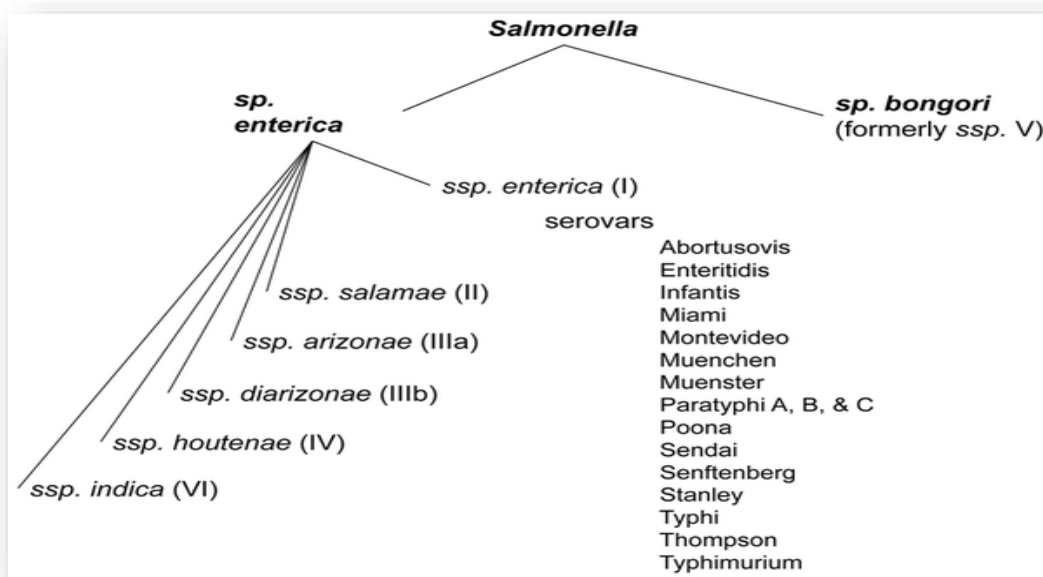
O gênero *Salmonella* é reconhecido como uma das bactérias que mais causam doenças de origem alimentar no mundo (MAJOWICZ *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, a *Salmonella* foi o agente bacteriano mais comum em surtos de origem alimentar e também em casos esporádicos, segundo o *Centers and Disease Control and Prevention* (CDC) em 2014 (CDC, 2015). Na Europa, a *Salmonella* foi reportada como o principal agente causador de surtos de origem alimentar, segundo dados do *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2013 (EFSA, 2015). No Brasil, a *Salmonella* foi reportada como o principal patógeno responsável por surtos de origem alimentar entre 2000 e 2015, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS, 2015).

O gênero foi proposto por Lignieres em 1900, em homenagem ao bacteriologista americano Daniel Elmer Salmon, que foi o primeiro a isolar *Salmonella choleraesuis* de intestino de porco em 1884 (SU; CHIU, 2007). *Salmonella* spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, oxidase negativa, intracelulares facultativos, não formadores de esporos, possuem flagelos e termófilos, São catalase positiva, normalmente, reduzem nitrato a nitrito e são vermelho de metila positiva. A maioria dos sorotipos fermenta a glicose com produção de ácido

e gás, não fermentam a lactose e a sacarose, produzem H₂S, não produzem urease e indol, descarboxilam lisina e ornitina, fermentam o dulcitol e utilizam o citrato (D'AOUST; MAURER, 2007).

A nomenclatura e a taxonomia de *Salmonella* já sofreram diversas alterações. O Centro de Referência e Pesquisa em Salmonella localizado no Instituto Pasteur, Paris, França, da Organização Mundial da Saúde é responsável pela atualização da taxonomia desse gênero. Atualmente, considera-se que o gênero é composto por duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última por sua vez, é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica*, segue representação filogenéticas na Figura 7 (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014).

Figura 7- Relação filogenética da *Salmonella* spp.



Fonte: Swearingen et al (2012).

A classificação sorológica, que divide as salmonelas em sorotipos ou sorovariedades, é baseada na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente, sendo esse esquema de identificação denominado de esquema de Kaufmann & White. Atualmente existem 2.659 sorovariedades, entre as quais 1.586 pertencem a *S. enterica* subespécie entérica (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014).

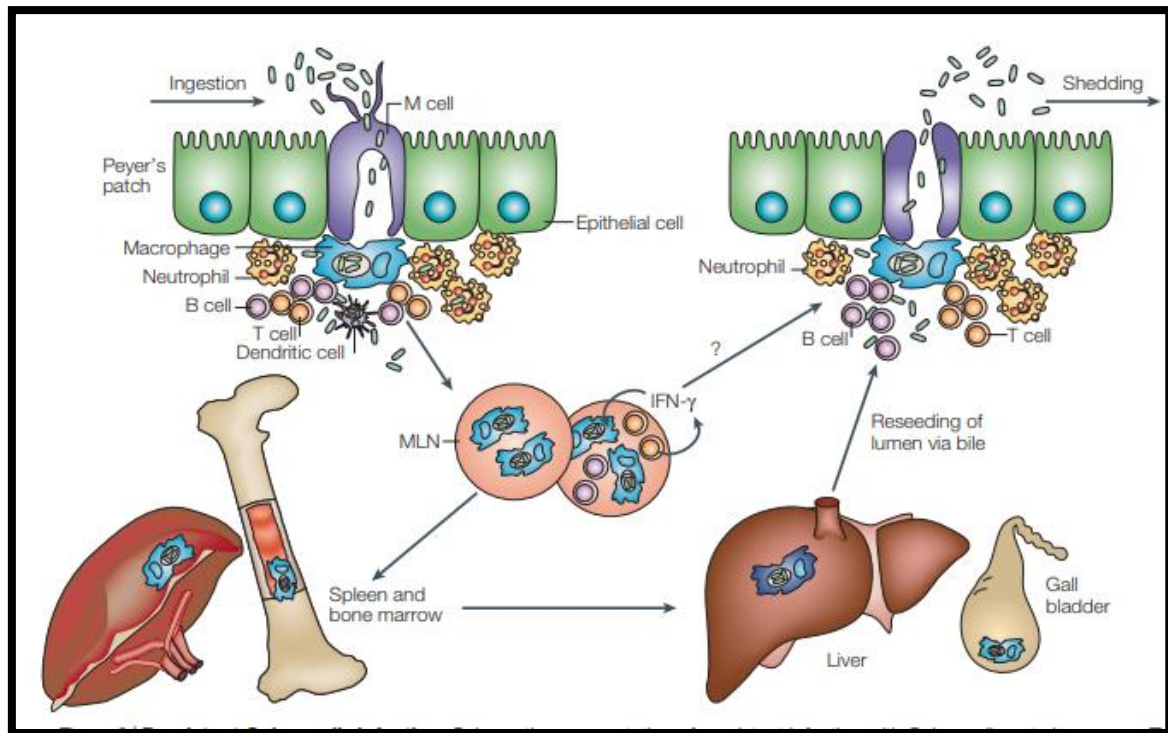
2.3.1.2 Patogênese da *Salmonella enterica* sorovar Typhi

Dentre as espécies e subespécies do gênero *Salmonella*, destaque a *Salmonella enterica* sorovar typhi (*S. typhi*) pois trata-se de um patógeno intracelular, facultativo que causa a febre tifoide em humanos (MWEU; ENGLISH, 2008). A febre tifoide é endêmica, com incidência de mais de 20 milhões de novos casos a cada ano, resultando em mais de 200.000 mortes em todo o mundo (BUCKLE *et al.*, 2012). Embora, a incidência de febre tifoide em países desenvolvidos seja baixa, os viajantes também estão em risco (BHAN; BAHL, BHATNAGAR, 2005). No Brasil, a febre tifoide ocorre sob a forma endêmica, com superposição de epidemias, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, refletindo as condições de vida de suas populações (BRASIL, 2010).

S. typhi é transmitida através da ingestão de alimentos e água, que se espalham no intestino, alcançam a corrente circulatória e se multiplicam nos gânglios linfáticos intestinais, fígado e baço. Podem ser veículos legumes irrigados com água contaminada, produtos do mar malcozidos ou crus, leite e seus derivados não pasteurizados, produtos congelados e enlatados *S. typhi*. A carga bacteriana infectante pode variar de 10^6 a 10^9 bactérias, aproximadamente, porém, infecções subclínicas podem ocorrer com a ingestão de um número menor (BRASIL, 2010).

Após ingestão, ocorre invasão da *S. typhi*, que atravessa e invade a superfície da mucosa intestinal invadindo células M até as placas de Peyer. As proteínas produzidas induzem a morte dos macrófagos infectados através da via dependente de caspase-1 resultando na liberação de IL-1. A liberação de citocinas pró-inflamatórias induz o recrutamento de monócitos do sangue e outras células inflamatórias até o sítio de infecção. As bactérias se replicam nas células de linhagens monocíticas, dentro de órgãos do sistema reticuloendotelial, fígado, baço, medula óssea (MONACK, MUELLER, FALKOW, 2004). Os mecanismos de patogênese celular seguem na figura 8.

Figura 8 - Mecanismo de patogênese celular da *Salmonella* spp.

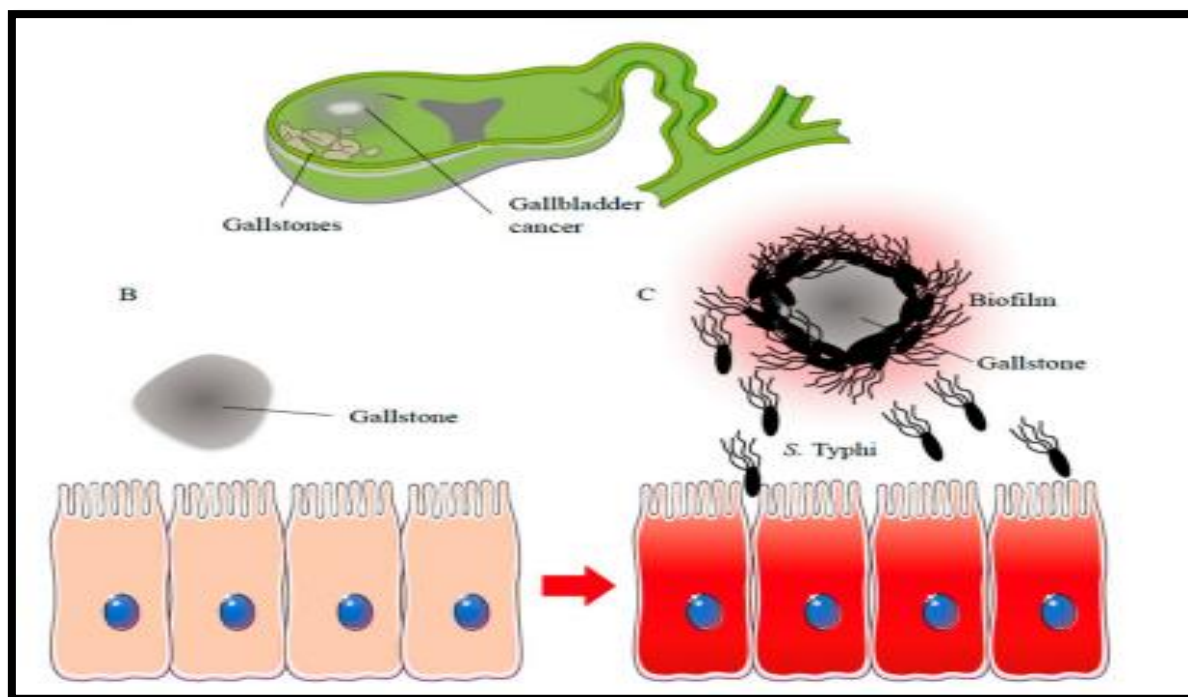


Fonte: Monak, Mueller e Falkow, 2004.

A transmissibilidade ocorre enquanto os bacilos estiverem sendo eliminados nas fezes ou na urina, o que, geralmente, acontece desde a primeira semana da doença até o fim da convalescença (BRASIL, 2010). Após a infecção, de 1 a 4% da população dos indivíduos infectados, podem se tornar portadores assintomáticos de *S. typhi*. Estes são de extrema importância por constituírem o único elo da cadeia de transmissão da doença, pois *S. typhi* pode colonizar a vesícula biliar causando infecção crônica assintomática (CRUMP; MINTZ, 2010; MOGASALE *et al.*, 2014). Os portadores podem espalhar a doença através das fezes, e nesse caso o tratamento antibiótico é ineficaz na resolução de colonização crônica de *S. typhi*, tornando a remoção da vesícula biliar a única terapia efetiva (GUNN *et al.*, 2011; GONZALES *et al.*, 2018).

Estudos epidemiológicos realizados em regiões onde *S. typhi* é endêmico, revelou que a maioria dos portadores também abriga cálculos biliares (GUN *et al.*, 2014). Agora é bem reconhecido, que a toxina tifóide tem alto potencial carcinogênico. Além disso, a produção de biofilme por *S. typhi* pode representar fator chave para a promoção de uma infecção persistente na vesícula biliar, sustentando assim uma resposta inflamatória e exposição do epitélio a danos repetidos (FIGURA 9) (GONZALEZ-ESCOBEDO *et al.*, 2011; Di DOMENICO *et al.*, 2017).

Figura 9 - Biofilme de *S. typhi* no desenvolvimento do câncer de vesícula biliar.



Fonte: Di Domenico et al. (2017).

Com o surgimento de sorotipos *S. typhi* resistente a múltiplas classes de antimicrobianos, a febre tifóide está se tornando cada vez mais difícil diagnosticar e tratar (YANG *et al.*, 2010). *S. typhi* é um problema significativo, uma vez que os antibióticos de baixo custo e disponíveis, como a ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol e estreptomicina são ineficazes. Apesar do aumento da resistência à ciprofloxacina, este ainda é o fármaco recomendado como terapia de primeira linha para crianças e adultos (EFFA *et al.*, 2011).

Na prevenção, utilizam-se 2 tipos de vacina contra a febre tifoide, mas esta não é a principal forma para o controle. Portanto, não é recomendada em situações de surto e de calamidade. As vacinas disponíveis não possuem alto poder imunogênico e a imunidade conferida é de curta duração. São indicadas apenas para militares que compõem o contingente brasileiro das missões de paz em regiões com elevado risco epidemiológico para a ocorrência de febre tifoide (BRASIL, 2010).

2.3.2 *Shigella dysenteriae*

2.3.2.1 Características gerais do gênero *Shigella*

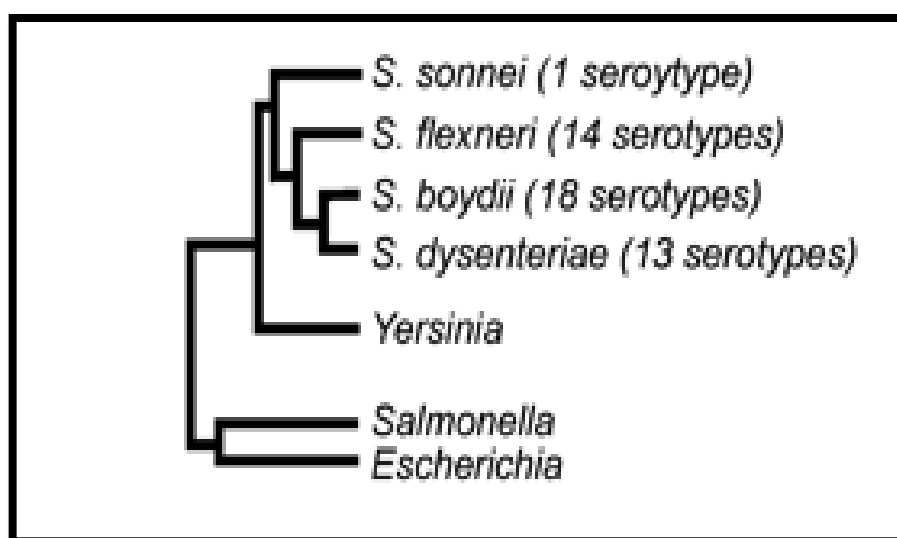
O gênero *Shigella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbico facultativo e imóvel (NATARO *et al.*, 2011). *Shigella* spp. é um importante agente causador de diarreia e disenteria no mundo todo (ANGELINI *et al.*, 2009; ANDERS *et al.*, 2015; KAHSAI; TEKLEMARIAM, 2015).

A shigelose ocorre através de infecção fecal-oral com carga microbiana de 10-100 bactérias. De acordo com CDC, nos Estados Unidos, estima-se que ocorram cerca de 500.000 casos de shigelose anualmente (CDC, 2015). Na África e no Sul da Ásia cerca de 88 milhões de casos de diarreia foram causados por *Shigella* spp. em 2010 (LAMBERTI *et al.*, 2014).

No Brasil, dentre os patógenos causadores de gastroenterite, *Shigella* spp. está entre as quatro bactérias mais isoladas de fezes diarreicas em regiões distintas do país, sendo que crianças são as mais afetadas (SOUSA *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2014).

A classificação sorológica do gênero é realizada pelo antígeno somático (O) encontrado no lipopolissacarídeo presente na membrana externa da parede celular. *S. dysenteriae* subgrupo A é formada por 15 sorogrupos, *S. flexneri* subgrupo B é composta por 8 sorogrupos, *S. boydii* subgrupo C é constituída por 19 sorogrupos e *S. sonnei* subgrupo D apresenta somente um sorogrupo (FIGURA 10) (NIYOGI, 2005; NATARO *et al.*, 2011).

Figura 10 - Relação filogenética da *Shigella* spp.



Fonte: Schroeder e Hilbi (2008).

Os sorogrupos são verificados a partir de uma reação antígeno-anticorpo, conhecida como sorotipagem, onde inicialmente se realiza uma aglutinação com soros polivalentes

somáticos e posteriormente o sorotipo é pesquisado por testes com soros monovalentes (ZHANG *et al.*, 2014).

As espécies de *Shigella* spp. possuem um grande plasmídeo de virulência que transportam os genes necessários para invasão celular, incluindo o sistema de secreção do tipo III (TTSS). O operon *ipat-ipg* codifica importantes proteínas efetoras / translocadoras (IpaA a IpaD) que são injetadas na célula hospedeira pelo TTSS. A *Shigella* entra na célula epitelial, escapa do vacúolo fagocitário e prolifera ativamente dentro do citosol das células infectadas, além de modificar sua composição de lipopolissacarídeos de membrana, a fim de fugir processos de reconhecimento e erradicação de patógenos (PACIELLO *et al.*, 2013).

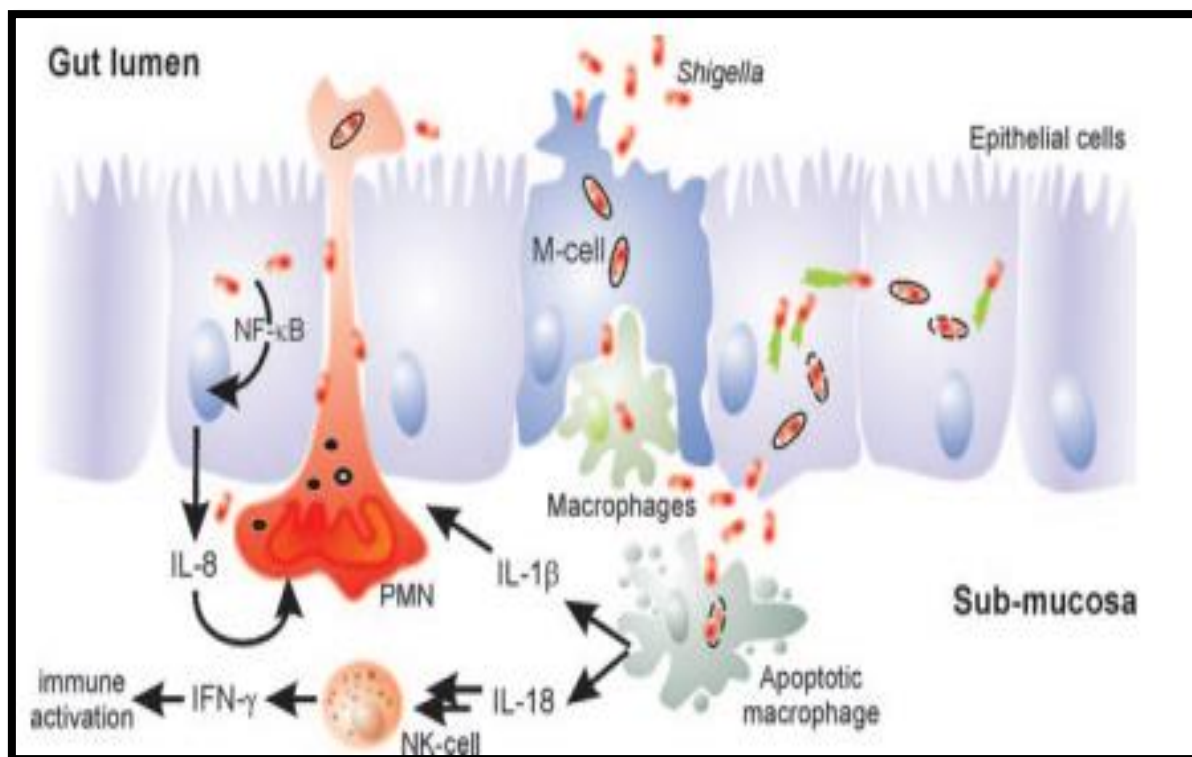
2.3.2.2 Patogênese da *Shigella dysenteriae*

Shigella dysenteriae foi descoberta e posteriormente assim nomeada por um cientista japonês chamado Kiyoshi Shiga em 1897, devido a uma epidemia de disenteria no Japão. Nesse episódio, mais de 91.000 pessoas estavam doentes com fezes sanguinolentas (disenteria) e alta taxa de mortalidade (TROFA *et al.*, 1999; HARDY; KOHLER, 2006). *Shigella dysenteriae* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, adaptado para colonizar e causar doença no cólon e tecido epitelial retal de humanos e primatas (NIE *et al.*, 2006).

Para ganhar acesso à mucosa, a bactéria realiza o processo chamado transcitose através das células M (JENNISON; VERMA, 2004). Após a transcitose, enfrenta os macrófagos residentes, e sua sobrevivência é garantida devido a indução da morte do macrófago por apoptose pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-18 e o início de uma massiva resposta inflamatória aguda (SCHROEDER; HILBI, 2008).

Após o escape do fagossomo, a bactéria está livre para iniciar a invasão das células epiteliais pelo lado basolateral e se multiplicar no citoplasma. A movimentação dentro do citoplasma das células é feita através da polimerização de uma cauda de actina, que propulsiona a bactéria através da célula (FIGURA 11) (SCHROEDER; HILBI, 2008).

Figura 11 – Mecanismos de patogênese celular da *Shigella* spp.



Fonte: Schroeder e Hilbi (2008).

Na Ásia e África, o número de cepas resistentes é dez vezes maior que a taxa na Europa e na América. Na América Latina, a maioria das cepas permanece totalmente suscetível a fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração. A ciprofloxacina e a ceftriaxona são atualmente recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento de cepas de *Shigella* multirresistentes (WHO, 2005).

2.4 Inflamação

2.4.1 Aspectos gerais

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas, foi descrita há mais de 2.000 anos atrás por Cornelius Celsius, que observou os quatro sinais cardinais da inflamação: dor, rubor (hiperemia), calor (aumento da temperatura local) e tumor (edema). A estes sinais, Galeno, acrescentou um quinto sinal cardinal, a perda de função da área afetada (WANNMACHER; FERREIRA, 2004; ROCK; KONO, 2008). Em 1793, John Hunter, um cirurgião escocês, observou que a inflamação não é uma doença, e sim uma

resposta inespecífica (ROCHA; GARCIA, 2006).

A inflamação é vista como o fator determinante em muitas doenças, incluindo a aterosclerose, câncer, autoimunidade e infecções (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011) e é um dos principais contribuintes para as condições relacionadas à idade (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). Funcionalmente, a inflamação é amplamente definida como uma resposta protetora do organismo a estimulação por patógenos invasores ou sinais endógenos, como células danificadas, resultando na eliminação da causa inicial de lesão, o clearance de células necróticas e reparo tecidual (NETEA *et al.*, 2017).

A inflamação é induzida quando as células hospedeiras evolutivamente conservam receptores de reconhecimento de padrões codificados por linha germinativa (PRRs) essas estruturas sinalizam a presença de patógenos (padrões moleculares associados a patógenos) ou sinais endógenos (padrões moleculares associados ao estresse) (AKIRA *et al.*, 2006). PRRs são principalmente expressos por células mielóides, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, mas são também expressos por linfócitos, fibroblastos e células epiteliais (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

Os gatilhos de estimulação celular nos processos inflamatórios ocorrem através da liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. As citocinas TNF e IL-1b têm efeito autócrino e parácrino que levam à ativação local de macrófagos e neutrófilos, mas quando essas citocinas são liberadas em grandes quantidades, eles podem exercer efeitos endócrinos, como a indução da produção de proteínas de fase aguda no fígado, a ativação plaquetária, febre, fadiga e anorexia. As citocinas aumentam a permeabilidade vascular e facilitam a entrada de células imunes nos tecidos no local da infecção, mas eles também podem levar a extravasamento capilar, vasodilatação e hipotensão. A principal função das quimiocinas é recrutar células imunes adicionais para o local da infecção; estas células incluem neutrófilos, que exercem um papel crucial na fagocitose e morte de patógenos (DINARELLO, 2007).

A citocina IFN- γ , derivada de células T auxiliares tipo 1 (células TH1), ativa neutrófilos, enquanto a citocina IL-22 atua sobre as células epiteliais e subsequentemente estimula a produção e liberação de peptídeos antimicrobiano incluindo defensinas (SCAPIN *et al.*, 2016). Na corrente sanguínea, os monócitos ativados e os neutrófilos liberam citocinas, que por sua vez, estimulam a liberação de prostaglandinas, que são moléculas que medeiam os sinais e sintomas de doença (sonolência, fadiga e febre) agindo sobre o hipotálamo (SHATTUCK; MUEHLENBEIN, 2015).

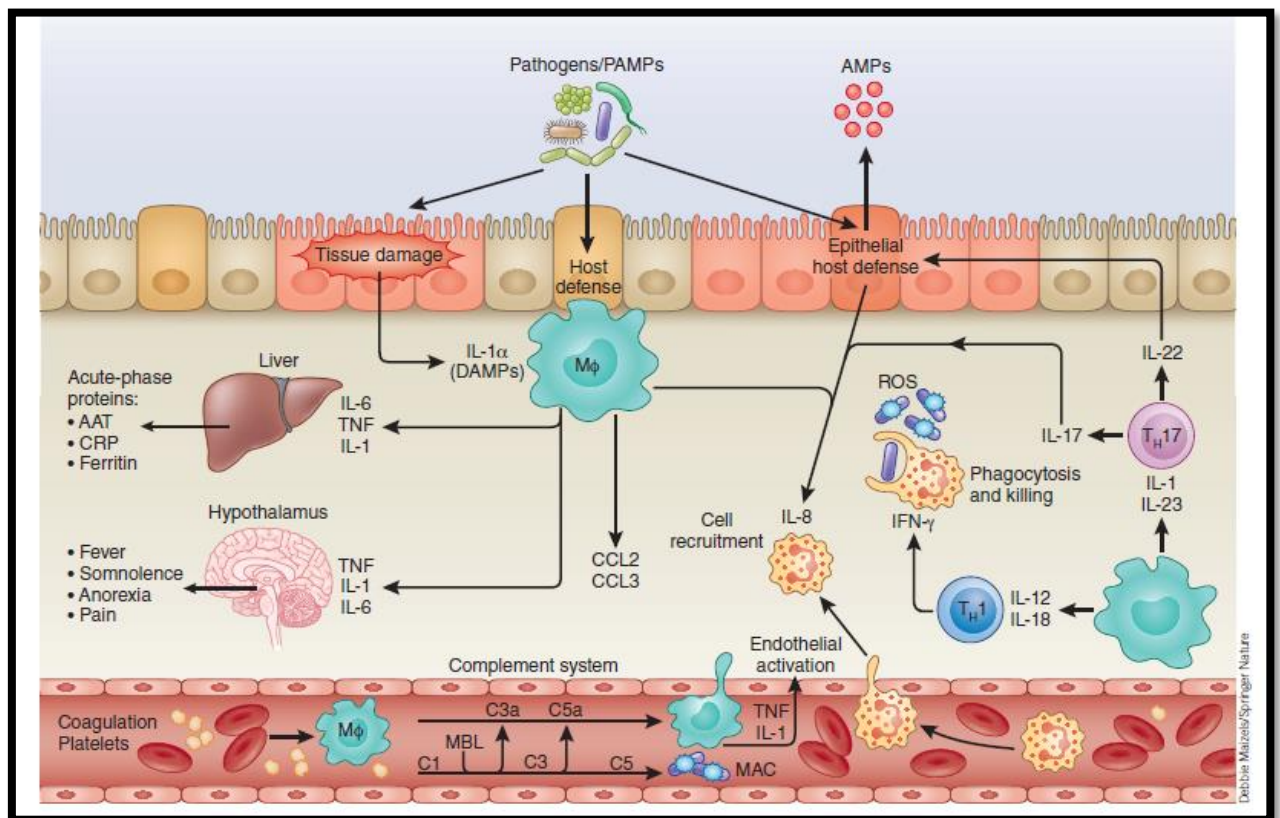
Um importante aspecto dos mediadores da inflamação é a ativação do sistema complemento, que medeia a opsonização microbiana levando à morte do patógeno e a liberação

de peptídios tais como C3a e C5a (WARD, 2010).

Mecanismos que desligam a resposta inflamatória tem importância primordial no retorno à homeostase. Resolução não é simplesmente a eliminação do agente, mas em vez disso é um processo ativo que envolve reprogramação funcional de células através de produção de mediadores (NETEA *et al.*, 2017).

Vários mecanismos inibem a inflamação. A citocina IL-10 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias e é principalmente derivada de células T reguladoras. IL-37, é um membro da família IL-1, que suprime amplamente a inflamação, assim como a citocina TGF- β , que é liberada de monócitos e plaquetas. Inibidores de complemento também modulam a inflamação, as prostaglandinas, os mediadores lipídicos, com feedback negativo suprime a transcrição e liberação de citocinas. Proteínas de fase aguda induzidas durante a inflamação, como a antitripsina α -1, têm ampla propriedades anti-inflamatórias. Mecanismos anti-inflamatórios adicionais envolvem particularmente corticosteróides e catecolaminas (FIGURA 12) (BLOM, 2017; JOOSTEN *et al.*, 2016).

Figura 12 – Mecanismos imunológicos que levam à indução de inflamação durante os primeiros estágios de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores.



Fonte: NETEA *et al.*, 2017.

No caso da inflamação intestinal aguda, trata-se de uma resposta protetora eliminando doenças infecciosas, tóxicas e outros agentes, enquanto inicia o processo de reparo. A inflamação crônica no trato gastrointestinal resulta de lesão aguda repetida e /ou resolução prejudicada da inflamação, levando a condições como gastrite crônica, úlcera péptica, pancreatite crônica, doença celíaca e doença inflamatória intestinal (NETEA *et al.*, 2017).

Na doença de Crohn e colite ulcerativa, embora a etiologia exata seja desconhecida, o tratamento visa atenuar a inflamação e suas consequências. Os corticosteróides diminuem as crises inflamatórias, mas na maioria dos casos não mantem a remissão. Os imunossupressores são também eficazes, mas não representa uma cura. Tais imunossupressores incluem azatioprina, metotrexato, e anticorpos monoclonais contra TNF, IL-12 ou IL-23, além dos anticorpos monoclonais contra a integrina $\alpha 4\beta 7$, um complexo proteico que promove tráfego de leucócitos especificamente para o trato gastrointestinal (BAMIAS *et al.*, 2016; NETEA *et al.*, 2017).

2.4.2 Efeito modulador da espécie do gênero *Lippia* na reposta inflamatória

Diversas espécies do gênero *Lippia* apresentam estudo de atividade moduladora na inflamação induzida, no entanto, para a espécie *Lippia alba*, estudos nessa área são limitados. A descrição dos estudos mais recentes envolvendo espécies do gênero de *Lippia* em processos inflamatórios segue nos próximos parágrafos.

No estudo de De Oliveira et al. (2014), os testes de irritação da pele mostraram que a aplicação tópica de óleo de *Lippia sidoides* promoveu inflamação cutânea em vários graus, o que foi demonstrado pelo aumento da espessura da pele e formação de edema cutâneo e eritema. A administração tópica do óleo em altas concentrações apresentou uma resposta irritante à pele, mas essa irritação é mais leve quando baixas concentrações desse óleo foram utilizadas. A avaliação histológica confirmou o resultado desses modelos, que revelaram presença acentuada de infiltração de células inflamatórias. No processo de cicatrização das feridas, as lesões tratadas mostraram intenso edema e exsudação até o 5º dia, mas não houve diferenças significativas na contração da ferida.

Nos resultados utilizando extratos de *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* foi confirmado o potencial farmacológico no tratamento de doenças inflamatórias, e essa atividade foi mediada por polifenóis e terpenos. Os extratos fenólicos e terpênicos exibiram efeito inibitório significativo sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), óxido nítrico (NO) e na atividade mitocondrial na inflamação induzida por LPS em células de macrófagos

RAW 264.7(LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

O tratamento com óleo essencial de *Lippia alba* e com formulações a base desse óleo foram utilizados no estudo de Teixeira, (2015). O OELa teve importante papel nas fases individuais inflamatória e proliferativa da cicatrização de ferida, contribuindo, dessa forma, para o menor tempo do processo de reparação da ferida. Nos grupos tratados com o óleo foi evidenciada uma intensa proliferação de fibroblastos, neo-angiogênese, indicando o surgimento de um tecido de granulação vascular, fibras de colágenos e reorganização do tecido conjuntivo, quando comparado ao grupo sem tratamento, resultando uma antecipação do fechamento das feridas.

A importância da comprovação do uso etnofarmacológico utilizando diversos modelos de indução de processos inflamatórios, se faz necessária, bem como a avaliação de diversos mediadores envolvidos nesse processo.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de plantas medicinais e a fitoterapia encontram-se em expansão no mundo todo, como terapêutica alternativa, diante da desistência das indústrias na busca e desenvolvimento de novos fármacos, principalmente antimicrobianos. Nesse contexto, o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LABMICRO) da Universidade Federal do Ceará vem executando pesquisas com intuito de comprovar o potencial farmacêutico de diferentes plantas do Ceará, inclusive do OELa e de seus constituintes majoritários (citrinal, limoneno, mirceno e carvona). Através de nossos estudos, já foi possível determinar a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do OELa sobre *S. aureus*, além de seu efeito modulador sobre antimicrobianos de uso clínico, sua atividade cicatrizante sobre feridas cutâneas, dentre outros.

O conhecimento etnofarmacológico sobre o potencial terapêutico do OELa, relata o uso da espécie *Lippia alba* no combate às infecções gastrointestinais. Sabendo que as doenças infecciosas de origem alimentar são consideradas um preocupante problema de saúde pública, exacerbado pelo aumento da virulência e da resistência aos antimicrobianos, torna-se essencial esforço multidisciplinar para prevenção, controle e detecção laboratorial eficiente destas infecções, além de busca e desenvolvimento de novos fármacos eficazes, principalmente sobre espécies de *Salmonella sp* e *Shigella sp*, que são responsáveis pela maioria dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (BRASIL, 2018).

Nesse contexto, o estudo buscou avaliar o efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre cepas planctônicas e biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, e seu efeito modulador na inflamação induzida em camundongos, visando fornecer evidência científica para o uso dessa planta na terapia de doenças gastrointestinais e para o desenvolvimento de nova alternativa terapêutica eficaz.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito modulador do óleo essencial de *Lippia alba* na atividade de antimicrobianos sobre biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* e na inflamação induzida em camundongos.

4.2 Objetivos Específicos

✓ Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia alba* sobre células planctônicas e biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*;

✓ Avaliar o efeito modulador do óleo essencial de *Lippia alba* na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre células planctônicas e biofilme *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*;

✓ Avaliar o efeito modulador do óleo essencial de *Lippia alba* na atividade inflamatória induzida em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo CEUA nº 9876180618, seguindo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO A).

5.2 Material Botânico e Composição Química

As amostras das folhas do quimiotipo I de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown foram coletadas do Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará. Exsicata da espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, UFC, sob o número 24150.

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com número de cadastro A5E434F, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos (ANEXO B).

O óleo essencial das folhas do quimiotipo I de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (OELa I) foi extraído no Laboratório de Produtos Naturais- LPN/UFC pela técnica de destilação com arraste de vapor d'água (MATOS, 1996). O rendimento do OELa I extraído foi medido por peso das folhas secas, utilizando a seguinte fórmula: Porcentagem de rendimento = volume de óleo (mL) / (Peso das folhas (g) – Umidade (g)) x 100.

A análise da composição do óleo essencial foi realizada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC/UFC). A análise foi realizada através de um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) (QP 2010 SHIMADZU) sob as seguintes condições: coluna capilar OV-5 (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano) com dimensões 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme, fluxo total de 50mL/min de hélio como gás de arraste, e gradiente de temperatura, de 25°C/min (50-180°C) e de 50°C/min (180-300°C), com a temperatura do injetor de 230°C (ADAMS, 2007).

5.3 Cepas microbianas, meios de cultura, reagentes e antimicrobianos

Foram utilizadas cepas microbianas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) armazenadas na coleção de culturas microbianas do LabMicro (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição e referência das cepas microbianas do estudo

Cepas	Referência
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC® 13313™
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi</i>	ATCC® 10749™

Fonte: A autora (2019). ATCC- *American Type Culture Collection*

Os meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos foram obtidos de diferentes marcas, seguem as descrições dos produtos utilizados na Tabela 2. O OELa I foi diluído em solução contendo 1% Tween 80 em NaCl 0,9% como veículo.

Tabela 2 - Descrição e referência dos meios de cultura e reagentes utilizados no estudo

Meios de cultura	Referência	Reagentes	Referência
<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)	Himedia	Glicose	Proquimios
<i>Tripsine Soy Broth</i> (TSB)	Himedia	NaCl	Synth
Caldo Nutriente	Himedia	Cristal violeta	Synth
Agar bacteriológico	Merck	Metanol	Dinamica
Agar Plate-Count	Himedia	Ácido acético	Dinamica
<i>Tripsine Soy Agar</i> (TSA)	Himedia	Tween 80	Amresco
		Carragenina	Sigma
		Xilazina	Syntec
		Cetamina	Syntec
		Triacel	Fresenius
		Trinton X-100	Merck

Fonte: A autora (2019).

Os antimicrobianos utilizados amicacina (AMI), ciprofloxacina (CIP), cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

5.4 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss (25 a 30g), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos (n=8 por grupo, total de 40 animais). Os camundongos foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia em ciclos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatação. Aos animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*. A carcaça dos animais foi acondicionada em sacos plásticos em freezer -20°C situado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia para posterior incineração por empresa terceirizada pela UFC (Transágua LTDA).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer com a supervisão do Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior, que foi responsável pelo acompanhamento dos ensaios do efeito modulador do OELa I na inflamação induzida em camundongos.

5.5 Estratégia experimental

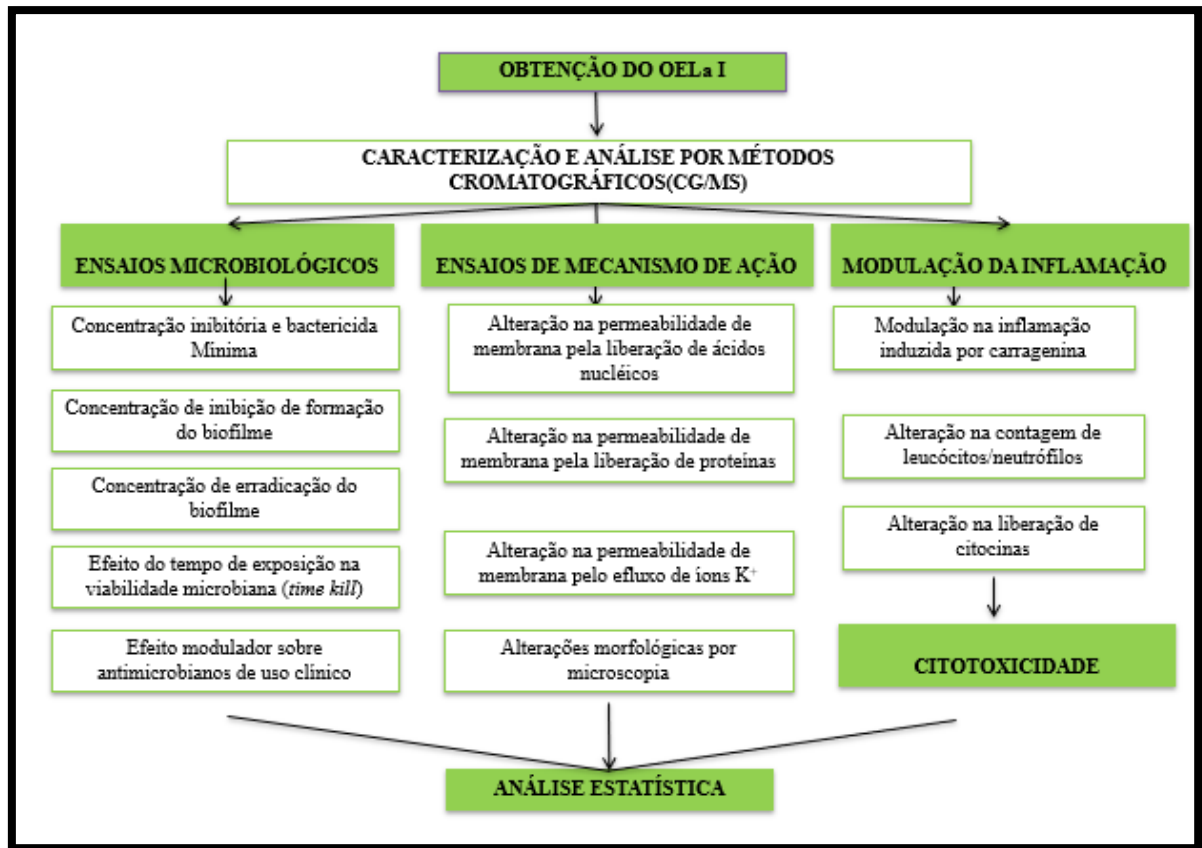
Este projeto foi executado em três etapas: na primeira etapa, foi realizada a coleta das folhas e, por conseguinte, extração e caracterização química do OELa I.

Na segunda etapa, foram realizados os ensaios microbiológicos, determinando as concentrações inibitória e bactericida mínima do OELa I para cepas de *S. typhi* e *S.dysenteriae*. Com intuito de determinar a cinética de ação do OELa I, foram realizados estudos de viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações do OELa I. Foram também determinadas a concentração de inibição e erradicação do biofilme formado pelas cepas testadas. No estudo, também foram avaliados o efeito do OELa na atividade de diferentes antimicrobianos sobre células planctônicas e biofilme de *S. typhi* e *S.dysenteriae*.

Na terceira etapa, foram avaliados os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Foi investigado o efeito do OELa I na permeabilidade da membrana.

Na quarta etapa, foi investigado o potencial modulador do OELa I na inflamação induzida por carragenina em camundongos. E por fim, foram realizados os estudos para avaliar a citotoxicidade do OELa I sobre hemácias (FIGURA13).

Figura 13 - Estratégia experimental



Fonte: A autora (2019).

5.6 Determinação do potencial antimicrobiano do OELa I

5.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM)

A CIM do OELa I para as cepas em estudo foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de cultura BHI de acordo com a Norma M07-A10 (CLSI, 2015) utilizando-se, para isso, microplacas (Kasvi ®) com 96 poços, estéreis e com tampas apropriadas.

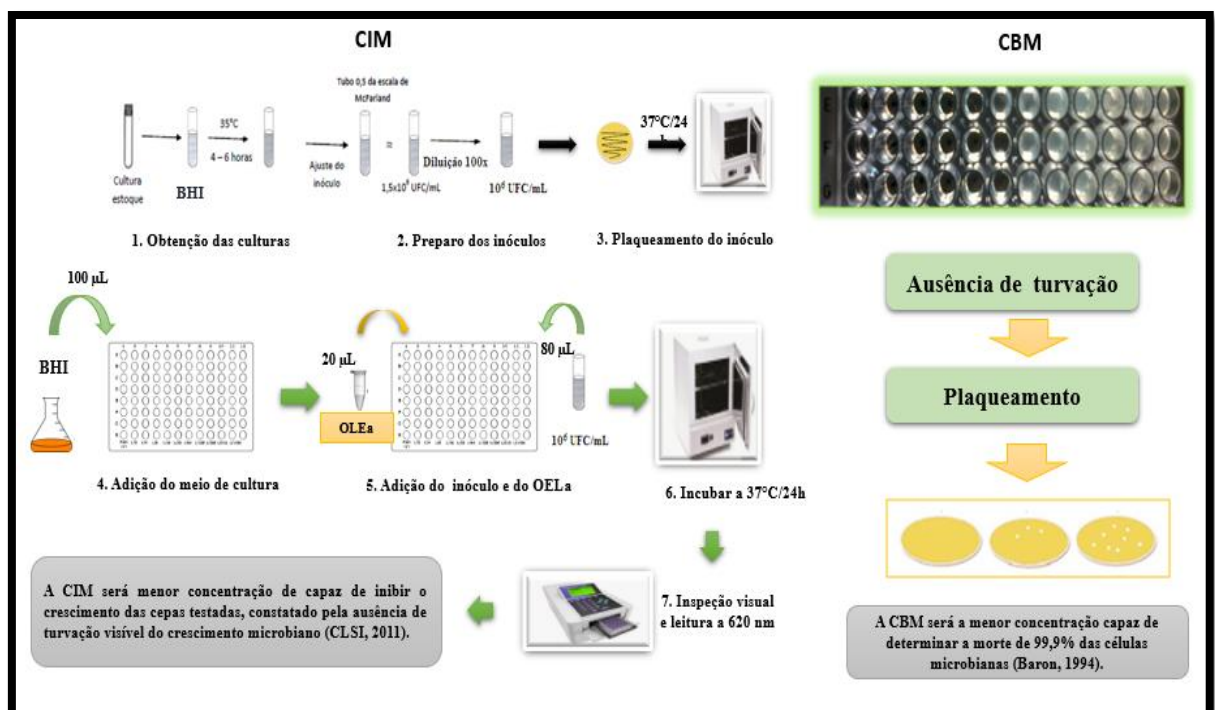
Colônias isoladas de cada cepa foram ativadas por incubação a 37°C, *overnight*, em caldo BHI. Após esse período, a densidade celular foi ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A suspensão obtida foi diluída 100 vezes em meio BHI estéril, resultando em uma cultura com aproximadamente 10^6 UFC/ml, que foi utilizada nos demais ensaios.

Aos poços da microplaca foram adicionados 100 μL de caldo BHI, 20 μL de OELa I em diferentes concentrações (0,125 a 4 mg/mL) e 80 μL da suspensão microbiana (10^6 UFC/mL). As microplacas foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C . Após esse período, foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorvâncias a 620nm, em leitora de placas (Bio-Tek).

A determinação da população microbiana presente no inóculo inicial foi realizada por contagem de colônias em ágar Plate-Count (ROMEIRO, 2007) e utilizada para determinação da Concentração Bactericida Mínima (BARON; FINEGOLD, 1994). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

De forma asséptica, foram depositados inóculos de 5 μL obtidos a partir dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM, que não apresentaram crescimento microbiano visível, na superfície do ágar Plate-Count. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e após 24h, foi realizada a contagem das colônias crescidas na superfície do ágar (ROMEIRO, 2007). A menor concentração de OELa I capaz de determinar uma redução de 99,9% do crescimento microbiano na superfície do ágar foi considerada a CBM (BARON; FINEGOLD, 1994; ROMEIRO, 2007) (FIGURA 14). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

Figura 14 - Determinação da CIM e CBM

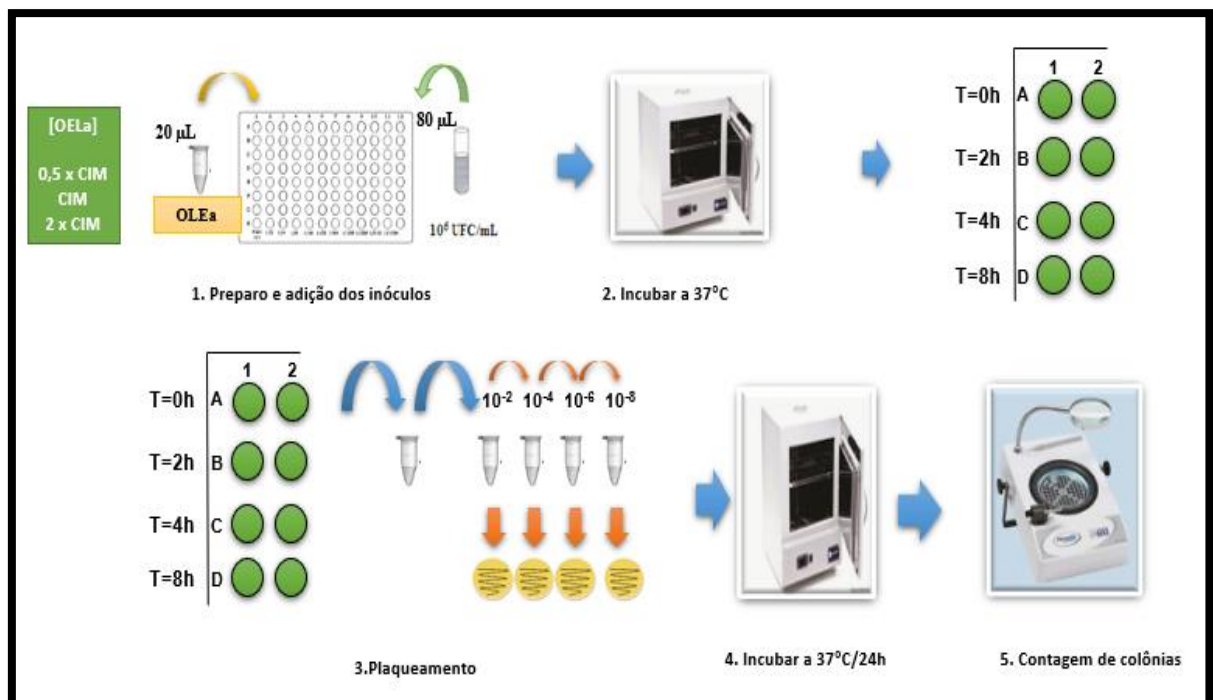


5.6.2 Determinação do efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade microbiana (Time Kill)

Alíquotas de 20µL de OELa I, em concentrações iguais a 0,5x CIM, CIM e 2xCIM foram adicionadas aos poços das microplacas contendo 100µL de caldo BHI e 80µL de suspensão microbiana (10^6 UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 37°C e alíquotas de 5µL foram retiradas em diferentes tempos (0,2,4, 6, 8, 10 e 12 horas) diluídas em solução salina 0,85% estéril, e em seguida, semeadas em ágar Plate-Count pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007).

A contagem das colônias crescidas foi realizada após 24 horas de incubação e os resultados foram expressos em UFC/mL (MITIC-CULAFIC *et al.*, 2007) (FIGURA 15). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

Figura 15 -Determinação do efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade microbiana (Time kill)



Fonte: A autora (2019).

5.7 Determinação do efeito modulador do OELa I sobre antimicrobianos de uso clínico

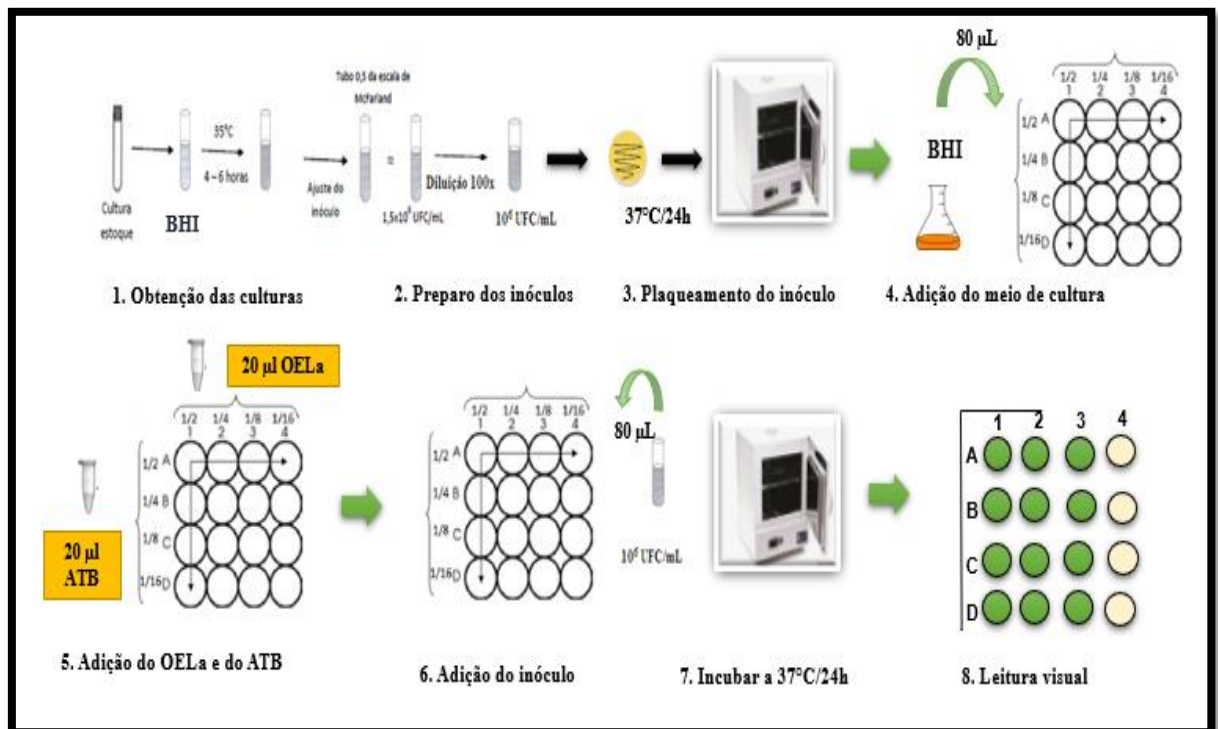
O efeito do OELa I na atividade dos antimicrobianos de uso clínico foi avaliado pelo método *Checkboard* (CLEELAND; SQUIRES, 1991). Aos poços das microplacas foram

adicionadas alíquotas de 80µL das culturas microbianas, 80µL de caldo BHI, 20µL de OELa I e 20µL dos ATB (amicacina -AMI, ciprofloxacina -CIP, cefepime-CPM, ceftazidima-CAZ e ceftriaxona-CRO). As concentrações finais de OELa I e dos ATB foram iguais a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 x CIM. Após incubação das microplacas por 24 horas a 37°C, foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano. Para avaliar o efeito das associações foram calculados os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), conforme Shin e Lin (2004):

$$ICIF = CIF_{OELaI} + CIF_{ATB} = [OELaI] / CIM_{OELaI} + [ATB] / CIM_{ATB}$$

Onde: [OELa I] e [ATB] foram as menores concentrações da OELa I e do ATB, respectivamente, na associação, com atividade antimicrobiana; CIM_{OELaI} e CIM_{ATB} é a CIM da OELa I e da ATB; CIF_{OELaI} e CIF_{ATB} foi a Concentração Inibitória Fracionada da OELa I e da ATB. O Índice CIF foi interpretado como: efeito sinérgico para $ICIF \leq 0,5$, aditivo ou indiferente para $ICIF > 0,5$ e $< 1,0$, e antagônico para $ICIF \geq 1,0$ (EUCAST, 2003) (FIGURA 16). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

Figura 16- Determinação do efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos de uso clínico - método *Checkboard*



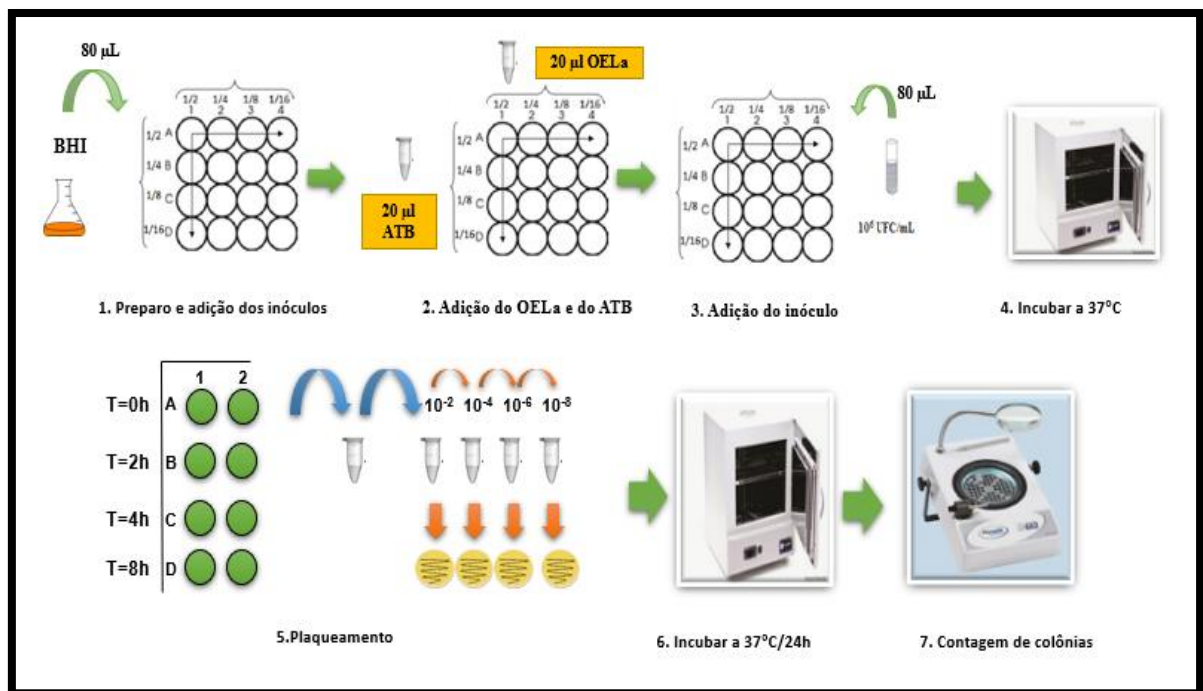
Fonte: A autora (2019).

Os resultados obtidos para as associações foram representados graficamente pela aplicação de método isoblograma (HALL;MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983; KROGSTAD; MOELLERING, 1986).

5.7.1 Determinação do efeito do tempo de exposição a associação OELa I - ATB na viabilidade microbiana (*Time Kill*)

As melhores concentrações em associação foram submetidas aos ensaios de *time kill*, para isso foram adicionadas 20µL de OELa I e 20µL de ATB, 80µL de caldo BHI e 80µL de suspensão microbiana (10^6 UFC/mL) (DODOU *et al.*, 2017). As microplacas foram incubadas a 37°C e a partir da adição do OELa I, alíquotas de 5µL foram retiradas a cada uma hora (0,1,2,3,4,5 e 6 horas), diluídas em solução salina 0,85% estéril, e em seguida, semeadas em ágar Plate-Count pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007). A contagem das colônias crescidas foi realizada após 24 horas de incubação e os resultados foram expressos em UFC/mL (MITIC-CULAFIC *et al.*, 2007) (FIGURA 17). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

Figura 17- Determinação do efeito do tempo de exposição a associação OELa I – ATB na viabilidade microbiana (*Time Kill*)



Fonte: A autora (2019).

5.8 Determinação do potencial anti-biofilme do OELa I

Inicialmente, as cepas em estudo foram analisadas quanto à capacidade de aderir e formar biofilme, como descrito por Stepanovic et al. (2000). Para isso, foram utilizadas microplacas estéreis de fundo plano com 96 poços.

As cepas foram semeadas por esgotamento em *Tripsine Soy Agar* (TSA) e incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, as colônias foram repicadas para tubos contendo *Tripsine Soy Broth* (TSB) suplementado com 1% (p/v) de glicose e incubadas por 24 h. As culturas foram diluídas em TSB de forma a obter um inóculo de 10^6 UFC/mL. Foram adicionados 200µL do inóculo às microplacas, que foram incubadas por 24 h a 37°C.

A massa de biofilme foi quantificada pela técnica do cristal violeta: os poços foram lavados com solução salina 0,85% estéril. Para a fixação das células aderidas, 200 µL de metanol a 99% foram adicionados a cada poço. Alíquotas de 200 µL de solução de cristal violeta (CV) a 2% (v/v) foram adicionadas aos poços e após 20 minutos, o excesso de CV foi removido. Finalmente, o CV foi liberado após adição de 160 µL de ácido acético e a leitura da densidade óptica (DO) foi realizada, após 15 min, em leitora de placas (Bio-Tek), no comprimento de onda de 570 nm. As amostras foram classificadas, segundo Stepanovic et al. (2000), como:

$DO \leq DO_C$ (não ADERENTE);

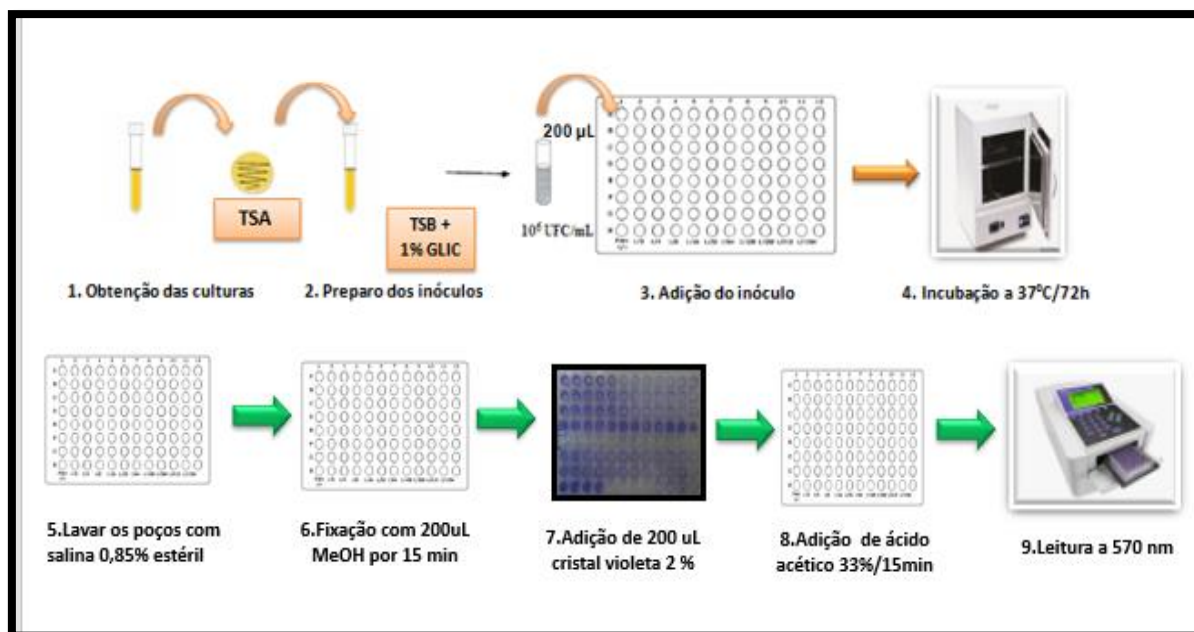
$DO_C < DO \leq 2x DO_C$ (fracamente ADERENTE);

$2x DO_C < DO \leq 4x DO_C$ (moderadamente ADERENTE);

$4x DO_C < DO$ (fortemente ADERENTE).

Onde: DO corresponde a densidade ótica das cepas testadas e DO_C corresponde a do controle (contendo apenas meio de cultura TSB). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata (FIGURA 18).

Figura 18 - Determinação da aderência das cepas do estudo



Fonte: A autora (2019).

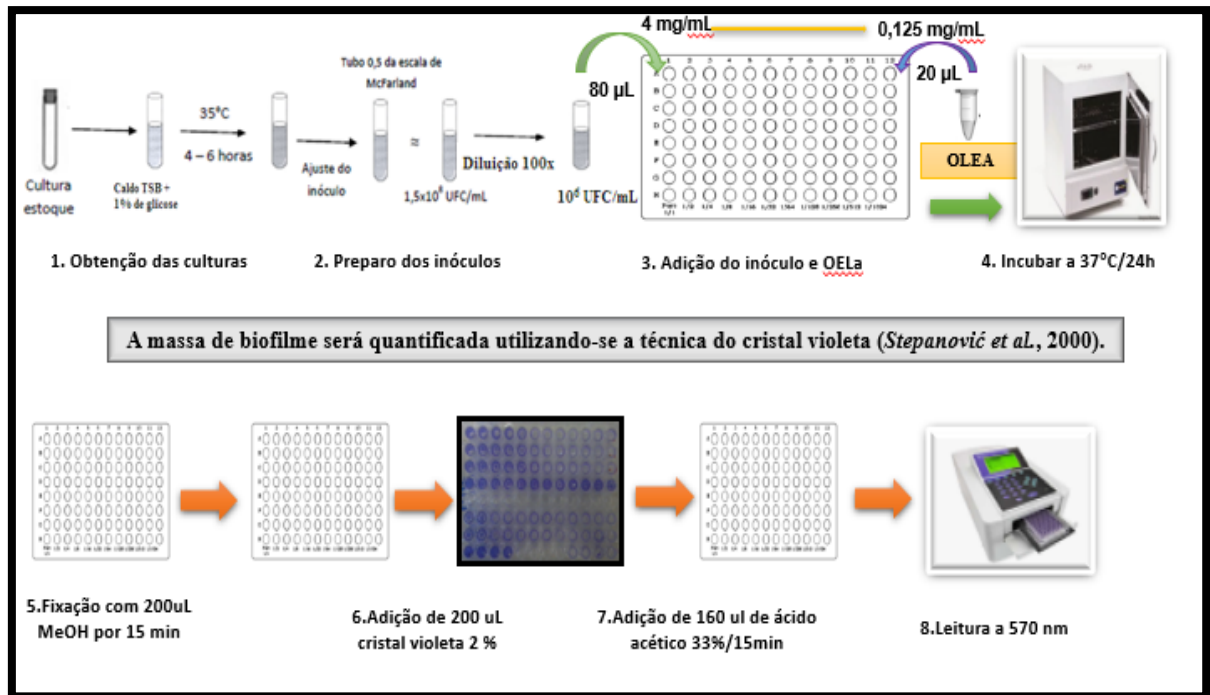
5.8.1 Determinação da inibição da formação do biofilme

A determinação inibição de formação do biofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por NOSTRO *et al.*, (2007) e a massa de biofilme foi quantificada utilizando-se a técnica do cristal violeta (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

As cepas analisadas foram cultivadas em TSB, suplementado com 1% (p/v) de glicose e incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, alíquotas de 180 µL da cultura microbiana e 20 µL de cada concentração de OELa I (0,125 a 4 mg/mL) foram adicionadas aos poços de microplacas. Após 24h de incubação a 37°C a massa de biofilme foi quantificada pela técnica do cristal violeta (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

Das melhores concentrações em associação obtidas no ensaio de *Checkboard* foram adicionadas aos poços das microplacas (DODOU *et al.*, 2017). Como controle negativo do experimento foram utilizados poços contendo apenas TSB e como controle positivo, poços contendo TSB e inóculo, sem adição da OELa I (FIGURA 19). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

Figura 19 - Determinação da inibição da formação de biofilme



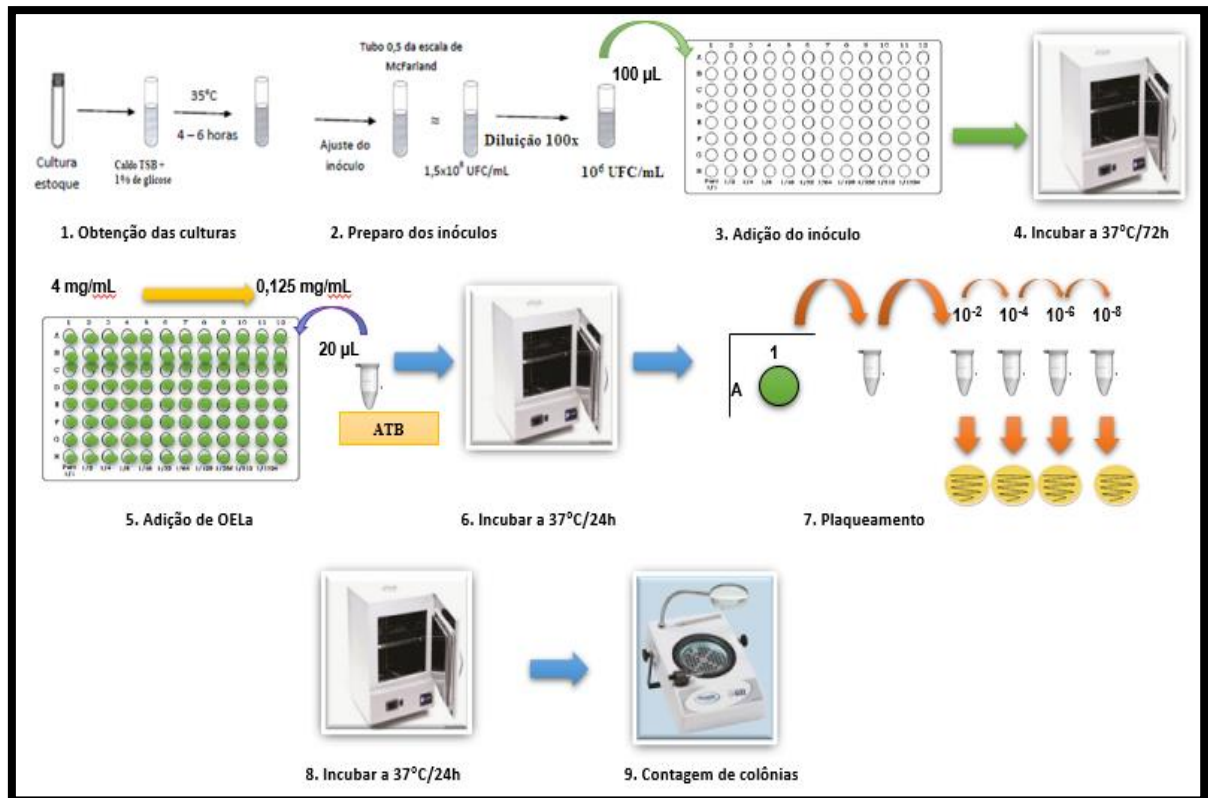
Fonte: A autora (2019).

5.8.2 Determinação da erradicação de biofilme

A determinação da erradicação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por KWIECÍŃSKI et al. (2009), utilizando-se microplacas de 96 poços. As cepas analisadas foram cultivadas em TSB suplementado com 1% (p/v) de glicose e incubadas por 24 a 37° C. Aliquotas de 100 µL de cultura foram transferidas para microplacas e incubadas por 48h a 37°C. Depois de formado, o biofilme foi lavado com 200 µL de água ultrapura e o meio de cultura foi descartado. Para cada poço contendo biofilme foram adicionados 20 µL de OELa I e 80 µL de TSB. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C. Das melhores concentrações em associação obtidas no ensaio de *Checkboard* foram adicionadas aos poços das microplacas (DODOU et al., 2017).

Biofilmes não tratados foram utilizados como controle positivo. E como controle negativo, biofilmes tratados com antimicrobianos. A viabilidade do biofilme remanescente foi avaliada pela contagem de células viáveis após tratamento (PETIT, 2002) (FIGURA 20). Os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata.

Figura 20- Determinação da erradicação de biofilme de OELa I sobre biofilme maduro



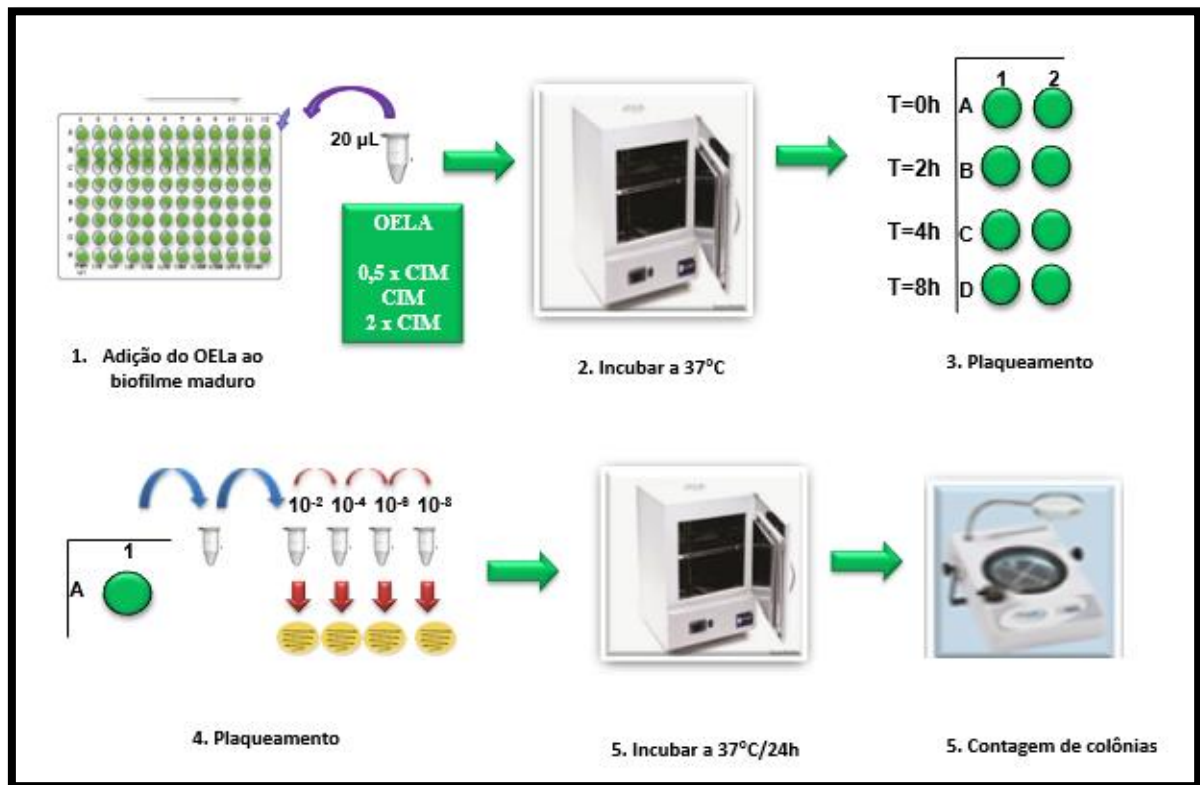
Fonte: A autora (2019).

5.8.3 Determinação do efeito do tempo de exposição do OELa I na viabilidade microbiana em biofilme

Alíquotas de 20 µL de OELa I, nas concentrações 0,5xCIM, CIM e 2xCIM foram adicionadas a poços de microplacas de 96 poços contendo 100 µL de caldo TSB e biofilme maduro, formado de acordo com o item 5.8.2. A microplaca foi incubada a 37°C por 24h.

A viabilidade do biofilme remanescente foi avaliada pela contagem de colônias, em intervalos de tempo predefinidos (0, 30, 60, 90, 120 e 150 min), após adição do OELa I. Para isso, o biofilme de cada poço foi ressuspensão em solução salina 0,85% estéril e a partir das diluições seriadas, foram coletadas alíquotas de 5 µL que foram gotejadas na superfície do ágar Plate-Count. A contagem das colônias crescidas nas placas foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C (FIGURA 21) (KWIECIŃSKI *et al.*, 2009).

Figura 21- Determinação do efeito do tempo de exposição do OELa I na viabilidade microbiana em biofilme.



Fonte: A autora (2019).

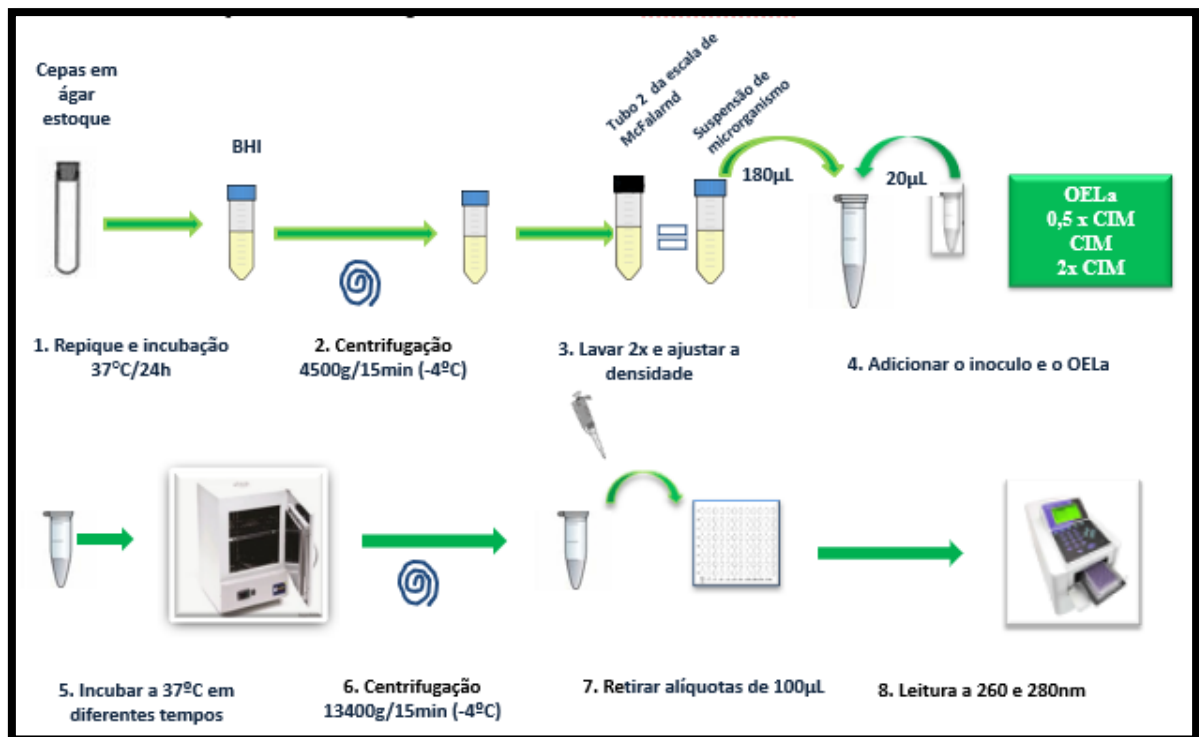
5.9 Detecção de alteração na permeabilidade de membrana pela liberação de ácidos nucléicos e proteína

A cinética de liberação de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e proteína foi mensurada pela leitura de densidade ótica a 260 nm (D.O._{260nm}) e 280 nm (D.O._{280nm}), respectivamente (ZHOU *et al.*, 2008).

As culturas foram incubadas *overnight* em caldo BHI e tiveram sua densidade celular ajustada com PBS (pH 7,4) para uma D.O._{620nm} igual a 2. As células foram coletadas por centrifugação a 4500 x g durante 15 min, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* lavado duas vezes e depois ressuspensão em PBS (pH 7,4).

As suspensões celulares foram adicionadas as respectivas concentrações de 0,5x CIM, CIM e 2 x CIM de OELa I e amicacina. Culturas microbianas sem tratamento foram utilizadas como controle. Todas as culturas foram incubadas a 37 °C por 0, 30, 60, 120 e 150 min, em seguida foram centrifugadas a 13400 × g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e realizada a leitura de D.O._{260nm} e D.O._{280nm} (Figura 21).

Figura 22- Detecção de liberação de ácido nucleico e proteína



Fonte: A autora (2019).

5.10 Determinação do efeito modulador do OELa I na inflamação induzida em camundongo

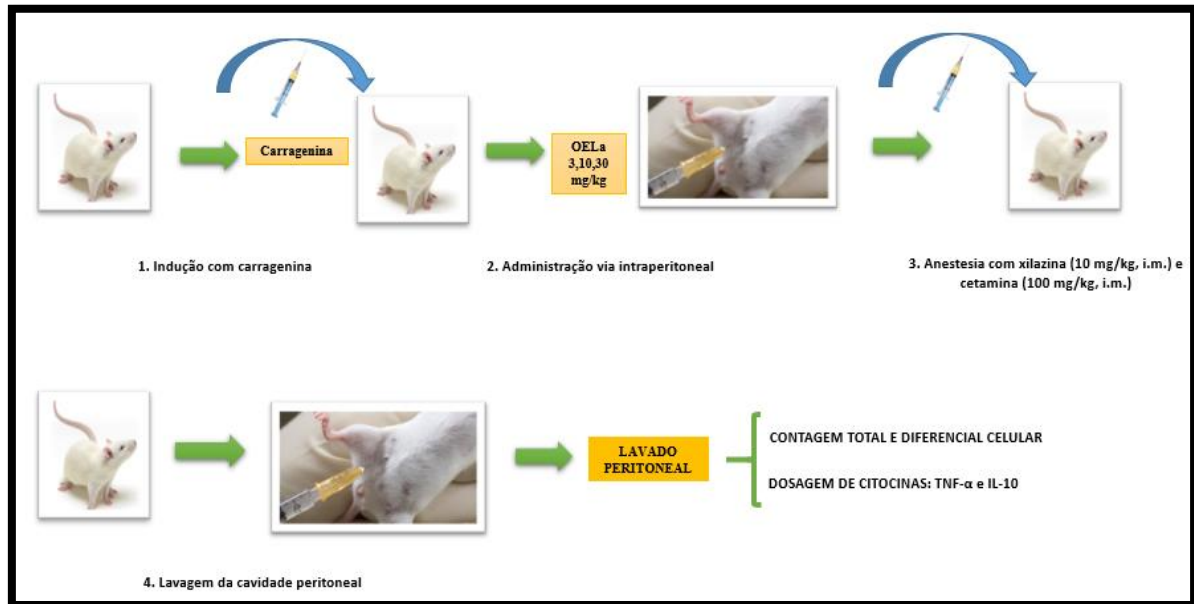
5.10.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória induzida por carragenina

No dia dos experimentos, os animais foram separados em grupos (5 grupos de 8 animais cada, total de 40 camundongos) e alocados em caixas de polipropileno de acordo com cada protocolo experimental. O agente flogístico (carragenina) foi preparado na concentração de 1%, utilizando-se soro fisiológico 0,85% como diluente, aproximadamente 30 min antes do procedimento. Os animais receberam diferentes doses (3, 10 e 30 mg/kg) do OELa I por via intraperitoneal, uma hora antes da administração do estímulo inflamatório (carragenina 500ug/cavidade, i.p.). Um grupo controle recebeu somente PBS (0,5 ml/cavidade, i.p.). Transcorridos 4 h após a administração, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilasina (10 mg/kg, i.m.) e cetamina (100 mg/kg, i.m.) (VINEGAR *et al.*, 1973).

Em seguida, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS), heparinizado com 5 UI/ml. Após a massagem do abdômen, as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas, alíquotadas em tubos para contagem total e diferencial

celular, bem como para dosagem de citocinas por ELISA (SOUSA; FERREIRA, 1985). As amostras coletadas dos animais foram armazenadas em freezer -80°C (FIGURA 23).

Figura 23- Avaliação do efeito modulador do OELa I na inflamação induzida por carragenina



Fonte: A autora (2019).

5.10.1.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade peritoneal

Para a avaliação do número total de leucócitos presentes no lavado peritoneal, alíquotas de diferentes amostras (20 μl) foram diluídas na proporção de 1:20 em líquido de Turk e deixadas em repouso por 5 minutos. A seguir, com auxílio de uma pipeta automática, as amostras foram colocadas em câmara de Neubauer e a contagem total foi realizada utilizando-se microscópio óptico comum em aumento de 100 vezes.

Para a contagem diferencial, 50 μL das alíquotas dos lavados peritoneais foram utilizados para a confecção da impressão celular em lâminas histológicas utilizando uma citocentrífuga (Cytopro® citocentrífuga modelo: 7620, Wescor, Logan, Utah, EUA) e corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa.

A seguir, foi realizada a contagem total de leucócitos em aparelho automatizado de hematologia (Marca ABX modelo pentra 60). Na contagem diferencial de leucócitos foram confeccionados esfregaços sanguíneos que, após secagem, foram observados em microscópio óptico comum (aumento de 100 x), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em percentual de leucócitos.

5.10.1.2 Determinação dos níveis TNF- α e IL-10 no lavado peritoneal

Os níveis de TNF- α e IL-10 no exsudato peritoneal foram determinados pela técnica de ELISA utilizando-se kits reagentes (R&D System). Alíquotas de 100 μ L do anticorpo de captura específico foram adicionadas à placa de 96 poços e incubadas a 4 ° C overnight. Após esse tempo, foi feita a aspiração da suspensão e a lavagem da placa com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween-20), por 5 vezes. Posteriormente, a placa foi bloqueada com 200 μ L da solução de bloqueio (BSA 1%) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Na sequência, foram adicionados 100 μ L das amostras (exsudato peritoneal) em cada poço, e a placa foi então incubada por um período de 2 horas em temperatura ambiente.

Como etapa seguinte, após sucessivas lavagens, foram adicionados 100 μ L do anticorpo específico de detecção em cada poço e a placa então foi novamente incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a retirada do excesso do anticorpo de detecção e lavagens sucessivas da placa com tampão de lavagem. Sendo assim, 100 μ L da diluição de trabalho (1/200) de Streptoavidina-HRP foi aplicada por poço, e a placa foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente.

Na sequência foram adicionados 100 μ L de solução substrato (10 mg de OPD + 10 μ L de H₂O₂+10 mL de tampão citrato) e após 30 minutos a reação foi bloqueada com solução STOP (H₂SO₄). Após 30 minutos, a absorbância das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices), em comprimento de onda de 450 nm e as concentrações foram estimadas utilizando-se uma curva padrão específica com concentrações em pg/mL (2000-31 pg/mL).

5.11 Citotoxicidade

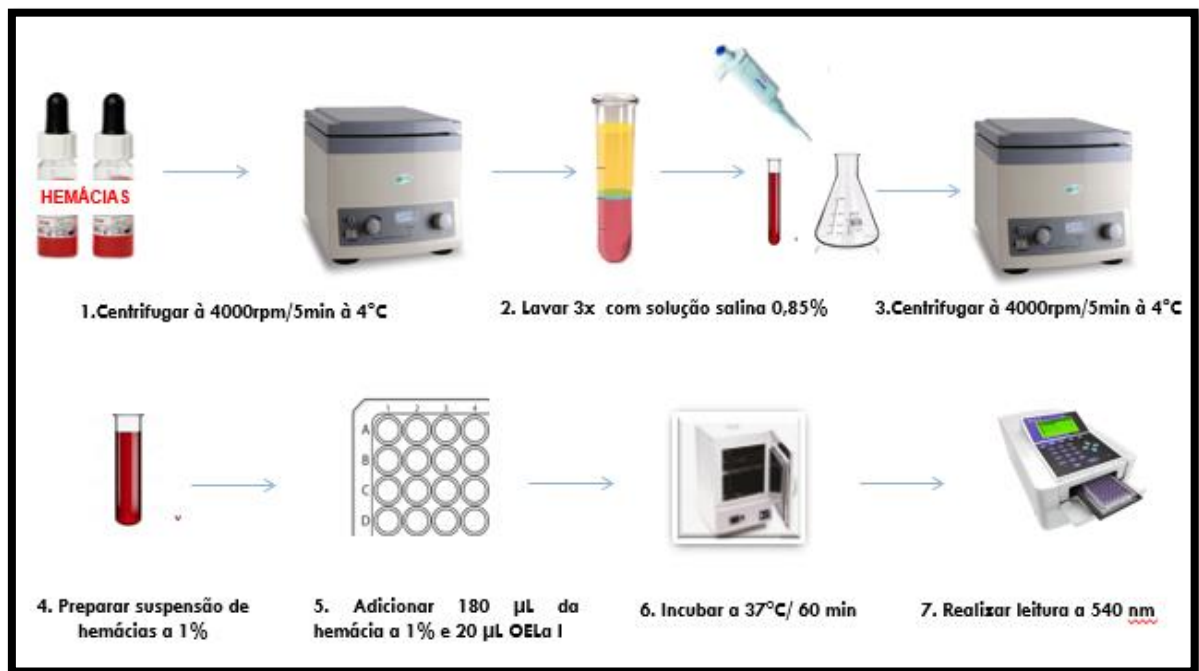
5.11.1 Determinação do efeito do OELa I sobre hemácias

A fim de obter uma concentração inicial de eritrócitos com hematócrito de aproximadamente 1%, hemácias reagentes TRIACEL (Fresenius-Kabi) foram ressuspensas em soro fisiológico 0,85%. Alíquotas de 180 μ L da suspensão de eritrócitos foram incubadas com 20 μ L de OELa I na faixa de concentração (0,125 a 2 mg/mL). O controle positivo constituiu de 100% de hemólise, a qual foi produzida com uma solução de 0.1% (v/v) Triton X-100. O controle negativo foi obtido apenas com soro fisiológico e eritrócitos. A microplaca contendo

a suspensão de eritrócitos e OELa I foi incubada a 37°C por 60 minutos (HARRIS; PHOENIX, 1997).

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas 2000 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para leitura da absorbância da hemoglobina livre no comprimento de onda de 540nm utilizando-se leitor ELISA (Bio-Tek). Os níveis de hemólise foram determinados em porcentagem em relação ao controle positivo (FIGURA 24).

Figura 24- Ensaio de citotoxicidade sobre hemácias



Fonte: A autora (2019).

5.12 Análise estatística

Os ensaios serão realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média. As médias dos diferentes tratamentos (grupo sem tratamento, tratado com OELa I e tratado com ATB) foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet ou pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 e os resultados foram representados por meio de gráficos e tabelas.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Composição química do óleo essencial das folhas do quimiotipo I de *Lippia alba*

As folhas foram coletadas no mês de abril de 2017 às 9 horas da manhã, no horto de plantas medicinais da UFC (Latitude: -3.7484821 e Longitude: -38.5766456). Ao total, foram coletadas 1.400g de folhas frescas, do qual foram obtidos 2,5 mL de óleo essencial das folhas do quimiotipo I de *Lippia alba* (OELa I). A densidade do OELa I foi de 0,320 g/mL, e o rendimento de OELa I a partir do peso das folhas frescas foi de 0,057 %. A análise cromatográfica e a espectrometria de massa (CG/EM) realizada para a caracterização do OELa I revelou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, totalizando 20 componentes (TABELA 3).

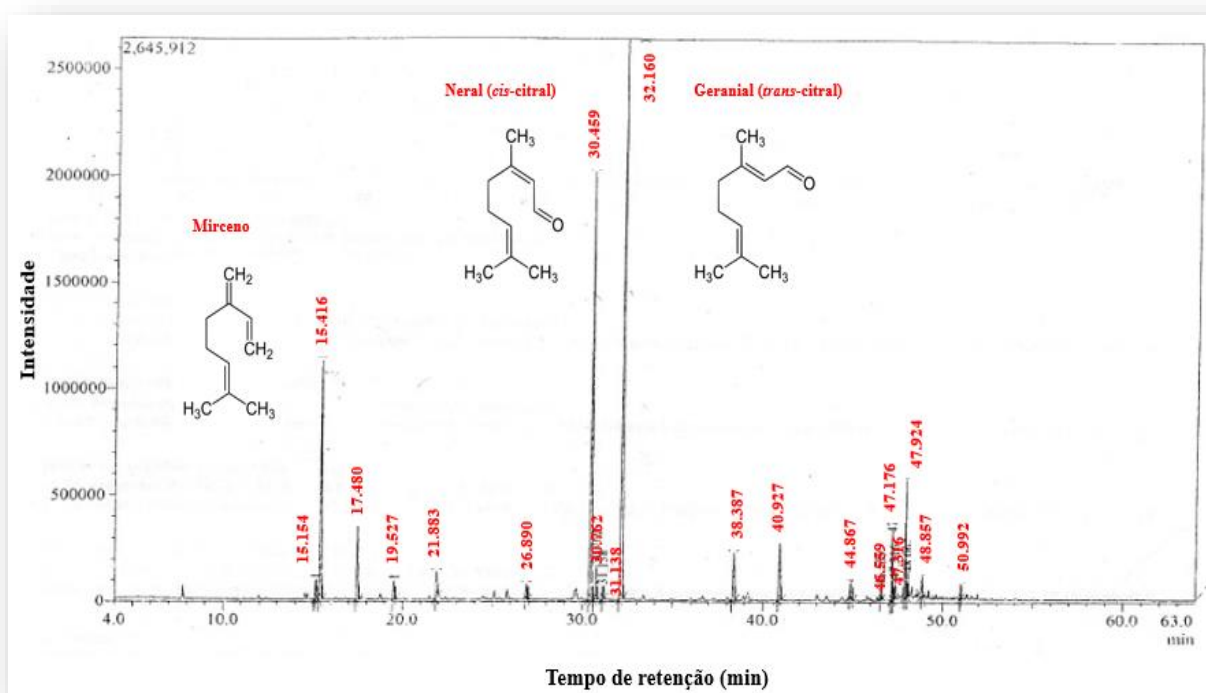
Tabela 3 – Componentes químicos do OELa I identificados através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Nº do pico	Tempo de retenção (min)	Fórmula	Constituinte	% área
1	15.154	C8H14O	Sulcatone	0,95
2	15.416	C10H16	Mirceno	12,56
3	17.480	C10H14	p-cimeno	4,06
4	19.527	C10H16	γ -Terpineno	0,97
5	21.883	C10H18O	Linalol	1,45
6	26.890	C10H16O	canfora	0,74
7	30.459	C10H16O	Neral (<i>cis</i> -citral)	25,90
8	30.762	C10H14O	Carvona	2,06
9	31.138	C10H18O	Nerol	0,74
10	32.160	C10H16O	Geranial (<i>trans</i> -citral)	34,16
11	38.387	C15H24	α -copaeno	3,13
12	40.927	C15H24	<i>trans</i> - cariofileno	4,03
13	44.867	C15H24	Germacreno	1,08
14	46.559	C15H24	γ - muuroleno	0,41
15	47.176	C15H26O	Elemol	1,88
16	47.316	C15H26O	Nerolidol	0,70
17	47.924	C15H24O	Óxido de cariofileno	3,47
18	48.062	C15H26O	Guaiol	0,58
19	48.857	C15H26O	β -Eudesmol	0,75
20	50.992	C15H26O	hedicariol	0,38
Monoterpeno				17,59
Monoterpeno oxigenado				39,15
Sesquiterpeno				34,55
Sesquiterpeno oxigenado				7,76
Cetona				0,95

Fonte: PADETEC/UFC (2017).

Os constituintes majoritários foram o geranial (34,16%), seguido do neral (25,90%) e do mirceno (12,56%). Os outros constituintes do óleo apresentaram concentrações variando de 0,38% a 4,06%. De acordo com Matos (1996), a presença majoritária de citral (cis-citral e trans-citral) e mirceno neste óleo, permitem classificá-lo como quimiotipo I de *L. alba* (OELa I) (Tabela 1). Os diferentes componentes químicos do OELa I identificados através da cromatogramas, seguem na Figura 25.

Figura 25 – Cromatograma do OELa I realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.



Fonte: PADETEC/UFC (2017).

6.2 Efeito antimicrobiano do OELa I sobre células planctônicas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

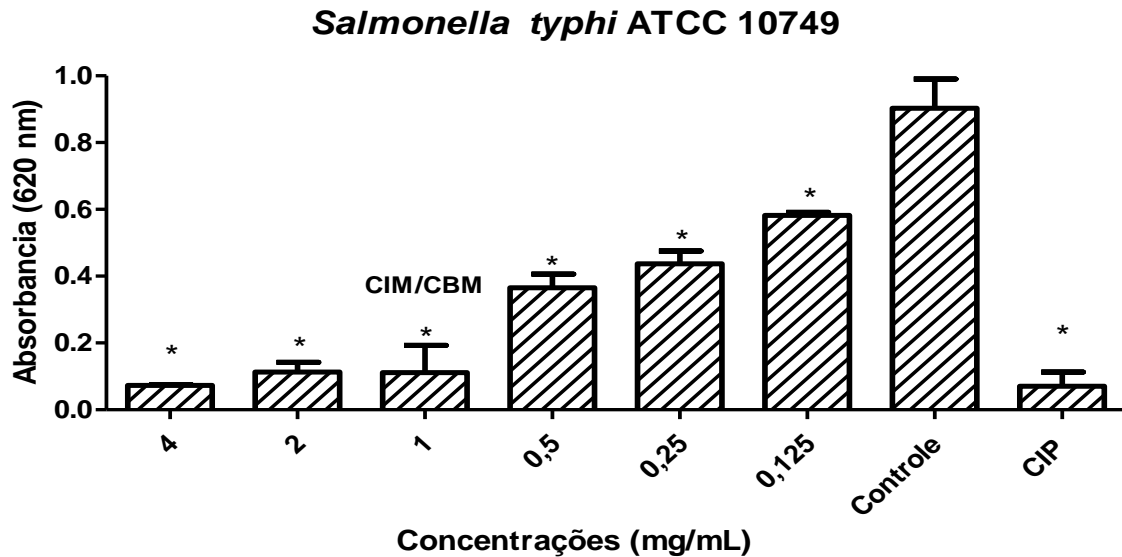
O OELa I foi testado nas concentrações de 4 a 0,125mg/mL (diluição binária) com as cepas de *Salmonella typhi* ATCC 10749 e *Shigella dysenteriae* ATCC 13313. A concentrações de CIM e a CBM do OELa I para as cepas em estudo foi de 1 mg/mL. Para os estudos do efeito do OELa I na atividade dos antimicrobianos de uso clínico, foram também determinadas as CIM dos antimicrobianos selecionados para o estudo (TABELA 4).

Tabela 4 - CIM do OELa I e antimicrobianos sobre *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

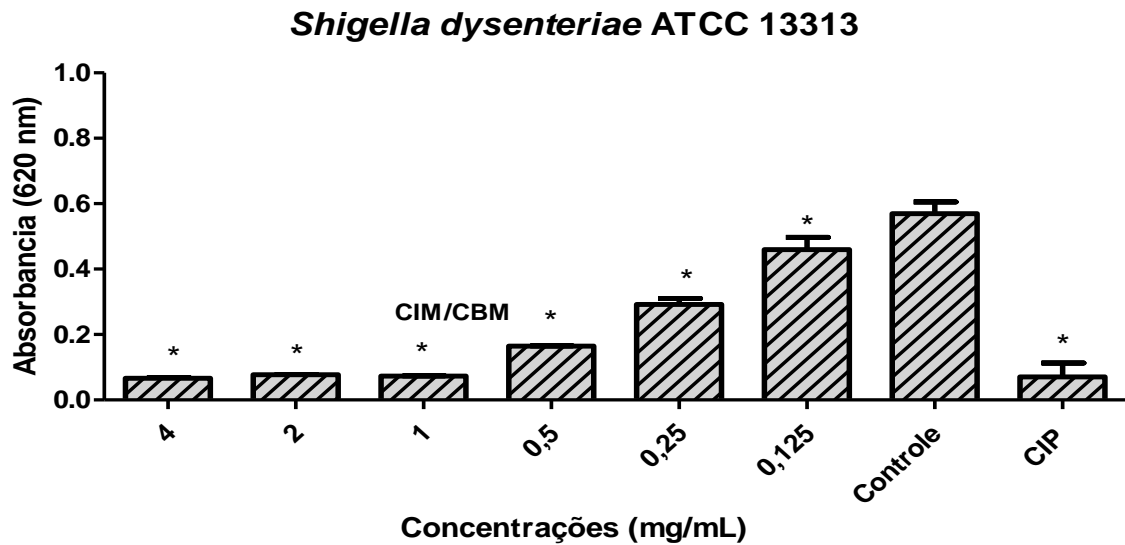
Cepas	OELa I	Antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$)				
		CIP	CPM	CRO	AMI	CAZ
<i>Salmonella typhi</i>	1 mg/mL	0,25	1,0	1,0	2,0	2,0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1 mg/mL	0,25	1,0	1,0	2,0	2,0

OELa I: óleo essencial das folhas do quimiotipo I; CIP: ciprofloxacina, CPM: cefepime, CRO: ceftriaxona; AMI: ampicilina, CAZ: ceftazidima.

As leituras de densidade ótica das placas de microdiluição foram realizadas para confirmar os valores obtidos pela inspeção visual de crescimento na placa, de forma a evitar erros de interpretação determinados pela turvação observada nos poços onde o OELa I foi adicionado nas maiores concentrações (GRÁFICO 1 e 2).

Gráfico 1 - Determinação da CIM de OELa I para cepa de *Salmonella typhi* ATCC 10749

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; os valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios, em triplicata cada. Controle: meio de cultura + microrganismo. CIP: ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g/mL}$. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Gráfico 2 - Determinação da CIM de OELa I para cepa de *Shigella dysenteriae* ATCC 13313

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; os valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios, em triplicata cada. Controle: meio de cultura + microorganismo. CIP: ciprofloxacina 0,25 μ g/ml. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

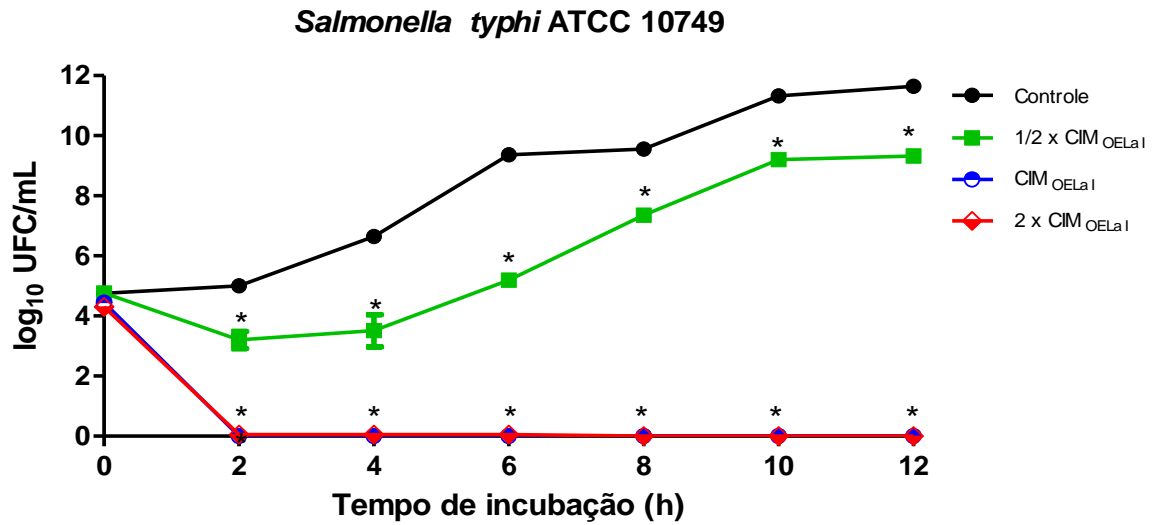
Ao final da avaliação da placa, foi realizado o plaqueamento dos poços que continham as maiores concentrações do OELa I, foram os poços de 1, 2 e 4 mg/mL para confirmar a ausência de crescimento microbiano, e por consequência a concentração bactericida mínima (CBM). De acordo com o estudo, a CBM para ambas as cepas foi de 1 mg/mL.

6.2.1 Efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade microbiana de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

As cepas testadas apresentam padrão de crescimento semelhante. Quando ativadas *overnight*, atingem as fases de crescimento exponencial e estacionário após 2 e 10 horas de incubação, respectivamente (GRÁFICO 3 e 4). Para avaliar o efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, as cepas foram expostas a $1/2 \times \text{CIM}_{\text{OELa I}}$, $\text{CIM}_{\text{OELa I}}$, $2 \times \text{CIM}_{\text{OELa I}}$.

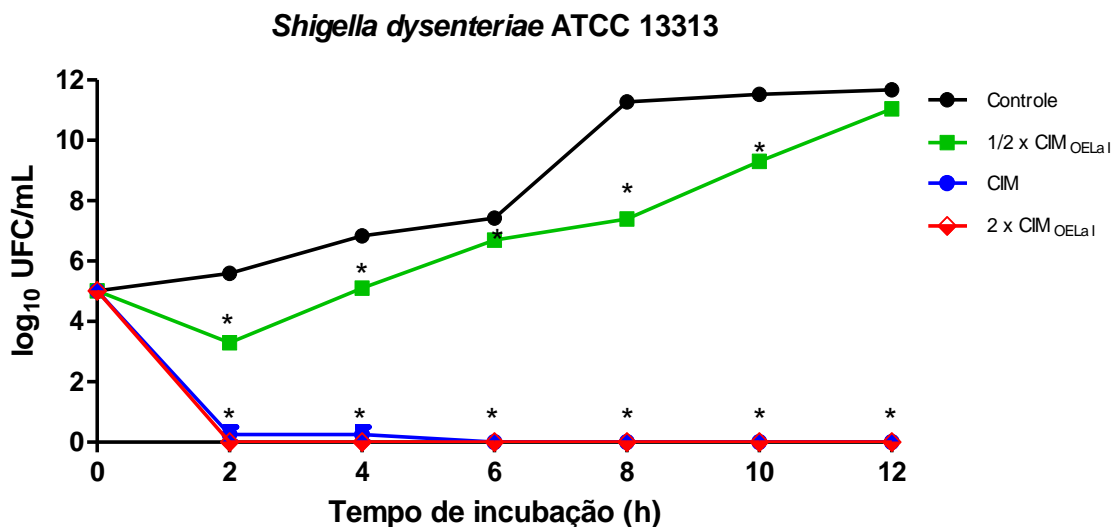
Após exposição com $1/2 \times \text{CIM}_{\text{OELa I}}$ houve inibição do crescimento de forma significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados para *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*. Quando expostos à $\text{CIM}_{\text{OELa I}}$, foi constatada inibição de crescimento, a partir das duas primeiras horas de exposição, para ambas as cepas. No entanto, quando expostos a concentração igual a $2 \times \text{CIM}_{\text{OELa I}}$, houve perda de viabilidade celular após duas horas de exposição (GRÁFICO 3 e 4).

Gráfico 3 - Efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade de *Salmonella typhi* ATCC 10749



Os valores estão expressos pela média \pm EPM de dois ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle. Controle: meio de cultura + microrganismo; CIM_{OELa I} = 1 mg/mL; 1/2 x CIM_{OELa I} = 0,5 mg/mL; 2 x CIM_{OELa I} = 2 mg/mL.

Gráfico 4 - Efeito do tempo de exposição ao OELa I na viabilidade de *Shigella dysenteriae* ATCC 13313



Os valores estão expressos pela média \pm EPM de dois ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle. Controle: meio de cultura + microrganismo; CIM_{OELa I} = 1 mg/mL; 1/2 x CIM_{OELa I} = 0,5 mg/mL; 2 x CIM_{OELa I} = 2 mg/mL.

6.3 Efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos sobre cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

Os ensaios de atividade moduladora evidenciaram elevado efeito sinérgico entre o OELa I e a maioria dos antimicrobianos selecionados para o estudo. Nas associações que ocorreram efeito sinérgico, o OELa I foi capaz de reduzir em 16 vezes a CIM de três ATB: ciprofloxacina, cefepime e ceftriaxona (TABELA 5).

Tabela 5 - Efeito modulador do OELa I na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

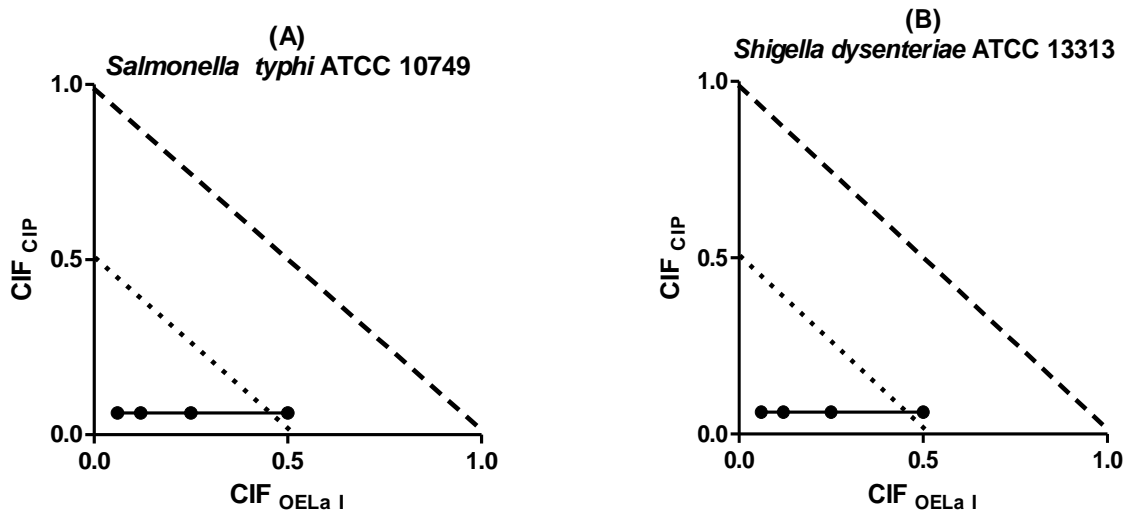
OELa I-ATB	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749				<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313			
	CIF _{OELa I}	CIF _{ATB}	ICIF	EM	CIF _{OELa I}	CIF _{ATB}	ICIF	EM
OELa I-CIP	0,0625	0,0625	0,125	S	0,0625	0,0625	0,125	S
OELa I-AMI	0	0	0	ND	0	0	0	ND
OELa I-CAZ	0	0	0	ND	0	0	0	ND
OELa I-CPM	0,0625	0,125	0,1875	S	0,0625	0,0625	0,125	S
OELa I-CRO	0,0625	0,250	0,3125	S	0,0625	0,0625	0,125	S

CIF_{OELa I} e CIF_{ATB}: Concentração Inibitória Fracionada do OELa I e dos antimicrobianos; ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada; CIP: ciprofloxacina, AMI: amicacina, CAZ: ceftazidima, CPM: cefepime, CRO: ceftriaxona EM: Efeito modulador. S: efeito sinérgico; ND: não determinado. ICIF foi interpretado como: efeito sinérgico para ICIF ≤ 0,5, aditivo ou indiferente para ICIF > 0,5 e < 1,0, e antagonico para ICIF ≥ 1,0 (EUCAST, 2003).

O tipo de interação das associações pode ser visualizado graficamente na forma de isobogramas. Para construção desses gráficos, foram utilizados os valores de FIC do OELa I e dos ATB (CIP, CPM e CRO) com efeitos sinérgicos. As associações nas quais ocorrem interação indiferente ou aditiva podem ser vistas como pontos entre as duas linhas tracejadas CIF (0,5; 0,5) e CIF (1;1), as situações de sinergismo são visualizadas como pontos abaixo da linha tracejada CIF (0,5; 0,5). O efeito antagonico é determinado pelos pontos situados acima da linha tracejada CIF (1;1) (GRÁFICO 5, 6 e 7).

Ao avaliar o efeito modulador das associações OELa I-CIP sobre as cepas de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, foi constatado ações sinérgicas (25,0 %) e aditivas (75,0%). A associação 1/16 CIM_{OELa I} - 1/16 CIM_{CIP} teve ação sinérgica (IFIC = 0,125) e foi selecionada para os estudos posteriores. Não foi constatada nenhuma associação antagonista, para as concentrações testadas (GRÁFICO 5).

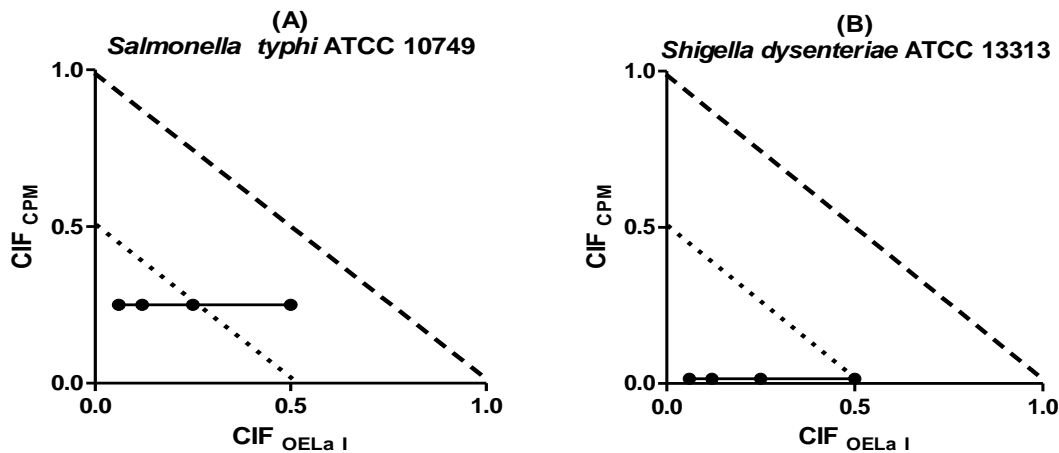
Gráfico 5 - Isobolograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CIP sobre *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*



Isobolograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CIP sobre *Salmonella typhi* (A) e *Shigella dysenteriae* (B): CIF_{OELa I} e CIF_{CIP}: Concentração Inibitória Fracionada do OELa I e da ciprofloxacina; ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada. Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

Ao avaliar o efeito modulador das associações OELa I-CPM sobre as cepas de *Salmonella typhi* foi constatado ações sinérgicas (75,0 %) e aditivas (25,0%) e para *Shigella dysenteriae* foi constatado ações sinérgicas (25,0 %) e aditivas (75,0%) (GRÁFICO 6).

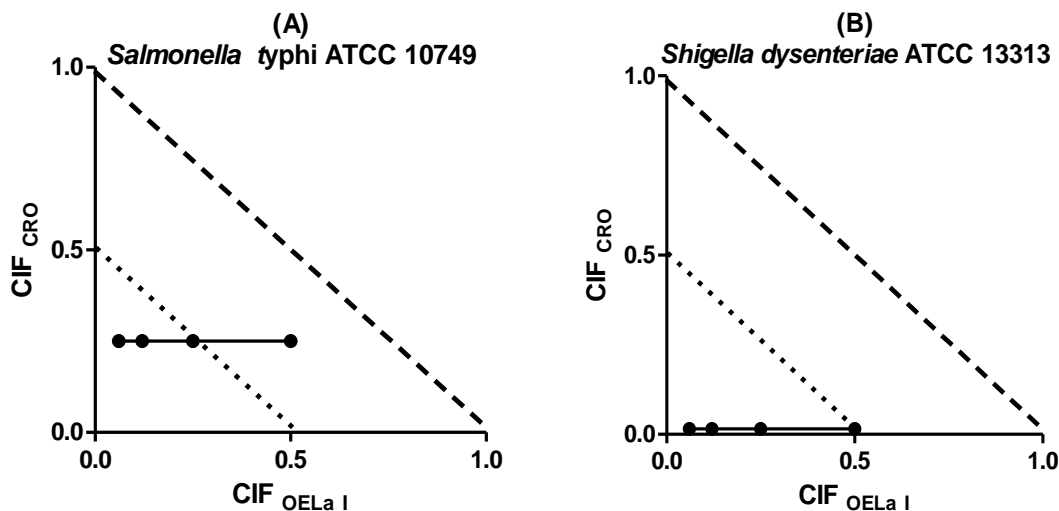
Gráfico 6 - Isobolograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CPM sobre *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*



Isobolograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CPM sobre *Salmonella typhi* (A) e *Shigella dysenteriae* (B): CIF_{OELa I} e CIF_{CPM}: Concentração Inibitória Fracionada do OELa I e da cefepime; ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada. Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

Ao avaliar o efeito modulador das associações OELa I-CRO sobre as cepas de *Salmonella typhi* foi constatado ações sinérgicas (75,0 %) e aditivas (25,0%) e para *Shigella dysenteriae* foi constatado que todas as associações foram sinérgicas. Não foi observado nenhuma associação antagonista, para as concentrações testadas (GRÁFICO 7).

Gráfico 7 - Isoblograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CRO sobre *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*



Isoblograma do efeito sinérgico da associação OELa I-CRO sobre *Salmonella typhi* (A) e *Shigella dysenteriae* (B); CIF_{OELa I} e CIF_{CRO}: Concentração Inibitória Fracionada do OELa I e da cefepime; ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada. Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

6.3.1 Efeito do tempo de exposição às associações OELa I-ATB na viabilidade microbiana de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

Os valores obtidos para CIM e CBM do OELa I, da ciprofloxacina, cefepime e ceftriaxona e o ICIF das associações OELa I-ATB foram utilizados para avaliar o efeito do tempo de exposição na viabilidade de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*. O ensaio foi realizado no intervalo de seis horas, com acompanhamento a cada 1 hora de experimento.

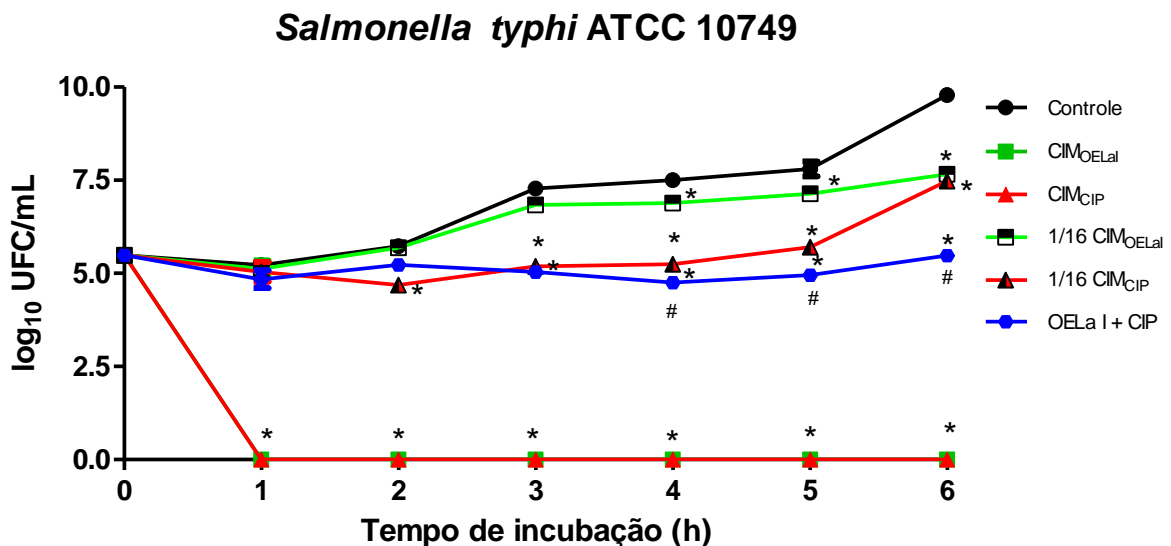
Para a determinação do efeito do tempo de exposição à associação OELa I - ATB na viabilidade microbiana foram selecionadas associações sinérgicas com as menores concentrações de OELa I para cada microrganismo, encontradas pelo ensaio do *Checkboard*:

Salmonella typhi ATCC 10749: OELa I – CIP (1/16 CIM_{OELaI} - 1/16 CIM_{CIP});

Shigella dysenteriae ATCC 13313:OELa I – CIP (1/16 CIM_{OELaI} - 1/16 CIM_{CIP}).

A associação OELa I–CIP (1/16 xCIM_{OELaI} – 1/16xCIM_{CIP}) foi capaz de inibir o crescimento de forma significativa ($p<0,05$), após 3 horas de tratamento para *Salmonella typhi*. Quando isolada, a concentração de 1/16 xCIM_{OELaI}, só foi capaz de inibir o crescimento de forma significativa ($p<0,05$), após 4 horas de tratamento. Após a primeira hora de tratamento com a CIM_{OELaI}, a viabilidade celular da *Salmonella typhi* foi reduzida em 5-log₁₀ UFC/mL (GRÁFICO 8).

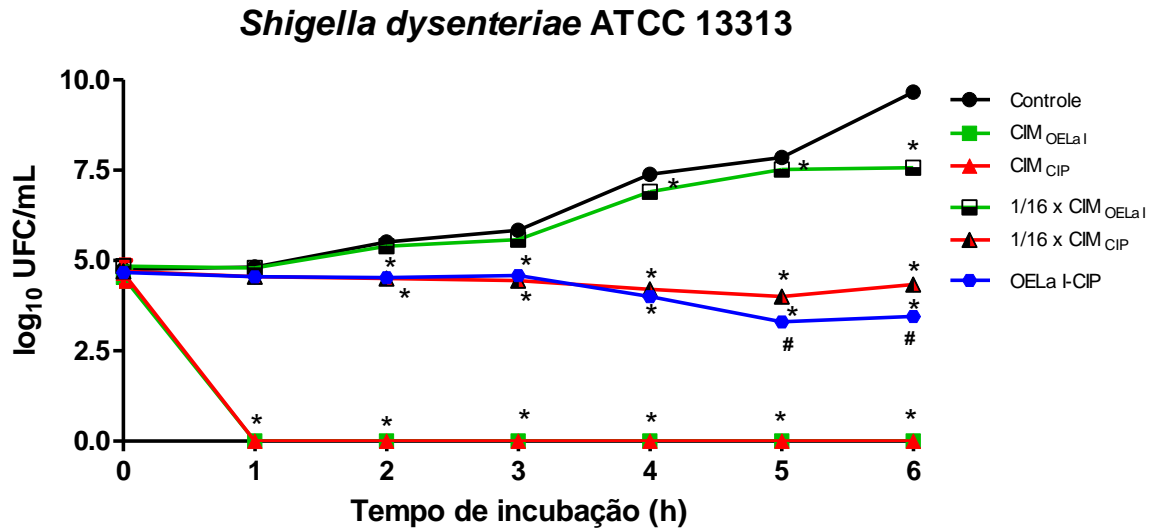
Gráfico 8 - Efeito do tempo de exposição ao OELa I e a associação OELa I-CIP na viabilidade de *Salmonella typhi* ATCC 10749



Os valores estão expressos pela média \pm EPM de dois ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com valor de * $p<0,05$ quando comparado ao controle e valor de # $p<0,05$ quando comparado a 1/16 CIM_{CIP}. Controle: meio de cultura + microrganismo; CIM_{OELaI} = 1 mg/mL; CIM_{CIP} = 0,25 μ g/mL; IFCI_{OELaI-CIP} = 0,125 (menores concentrações do OELa I e CIP na associação, com atividade antimicrobiana = 1/16 x CIM).

A associação OELa I–CIP (1/16 xCIM_{OELaI} – 1/16xCIM_{CIP}) foi capaz de inibir o crescimento de forma significativa ($p<0,05$), após 2 horas de tratamento para *Shigella dysenteriae*. De forma semelhante ao tratamento da *Salmonella typhi*, quando isolada, a concentração de 1/16 xCIM_{OELaI}, só foi capaz de inibir o crescimento de forma significativa ($p<0,05$), após 4 horas de tratamento e a CIM_{OELaI} reduziu a viabilidade celular em 5-log₁₀ UFC/mL (GRÁFICO 9).

Gráfico 9 - Efeito do tempo de exposição ao OELa I e a associação OELa I-CIP na viabilidade de *Shigella dysenteriae* ATCC 13313.



Os valores estão expressos pela média \pm EPM de dois ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle e valor de $\#p < 0,05$ quando comparado a 1/16 CIM_{CIP}. Controle: meio de cultura + microrganismo; CIM_{OELa I} = 1 mg/mL; CIM_{CIP} = 0,25 μ g/mL; IFCI_{OELa I-CIP} = 0,125 (menores concentrações do OELa I e CIP na associação, com atividade antimicrobiana = 1/16 x CIM).

6.4 Caracterização e cinética de formação de biofilme de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

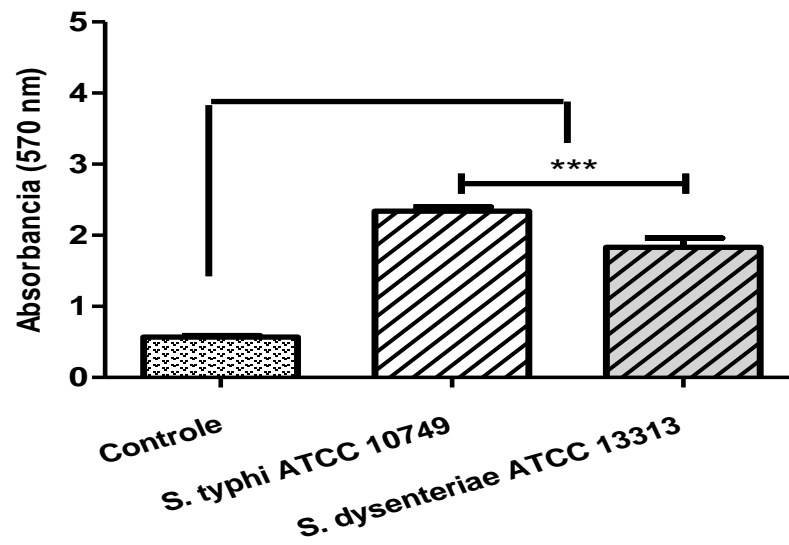
Os microrganismos foram avaliados e classificadas quanto à aderência e formação de biofilme após 24 de incubação. Foi possível observar que a cepas testadas possuem de moderada a forte aderência (TABELA 6 e GRÁFICO 10).

Tabela 6 - Classificação das cepas quanto à aderência

Cepas	DO	Classificação
Controle	0,570 \pm 0,059	Não aderente
<i>Salmonella Typhi</i> ATCC® 10749	2,337 \pm 0,173	Fortemente aderente
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC® 13313	1,830 \pm 0,373	Moderadamente aderente

A densidade óptica (DO) foi determinada em leitora de ELISA (Bio-Tek) a 570nm. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. Controle (meio TSB).

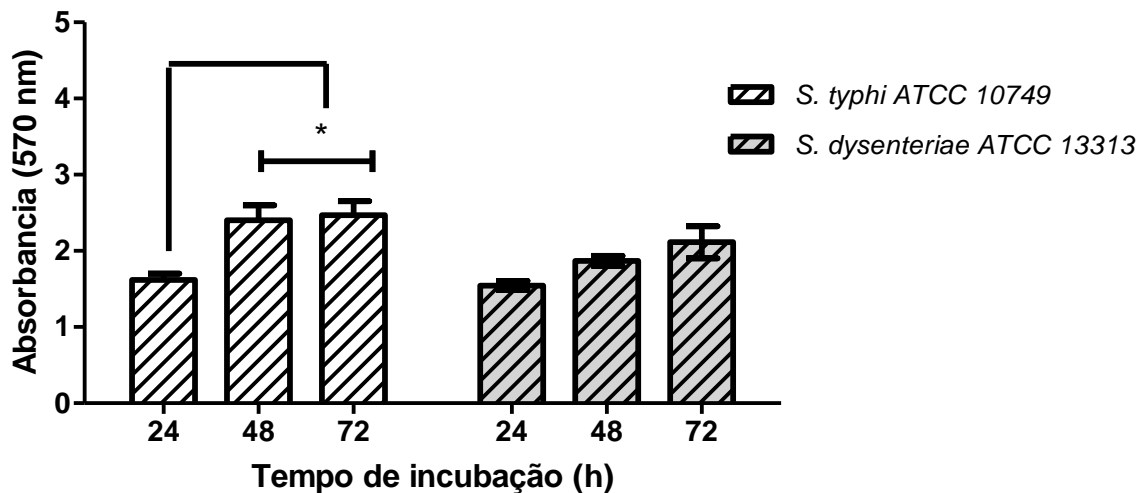
Gráfico 10– Quantificação de massa de biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* pelo OELa I



A densidade óptica (DO) foi determinada em leitora de ELISA (Bio-Tek) a 570nm. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. Controle (meio TSB).

A quantificação de massa de biofilme das cepas em função do tempo foi realizada para analisar a fase de maturação do biofilme está representada no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Quantificação de massa de biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* em função do tempo



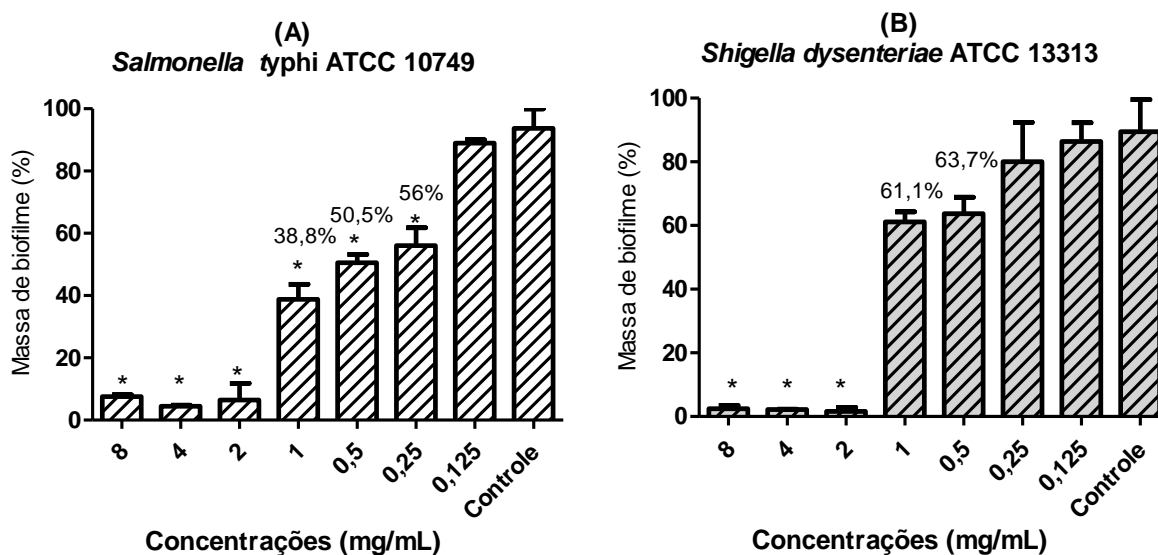
A densidade óptica (DO) foi determinada em leitora de ELISA (Bio-Tek) a 570nm. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de $p < 0,05$ (*) quando comparado ao tempo de 24 horas.

Não houve diferença significativa entre os tempos 24, 48 e 72 horas na formação do biofilme de *Shigella dysenteriae*, porém para *Salmonella typhi* o tempo de 48 e 72 horas se mostrou significante ($p < 0,05$) quando o comparado ao de 24 horas (GRÁFICO 11). Após classificação quanto à aderência, e reconhecimento das etapas de formação de biofilme, foi avaliado o efeito do OELa I e da melhor associação OELa I – CIP sobre a formação e erradicação do biofilme.

6.4.1 Efeito anti-biofilme do OELa I e da associação OELa I-ATB na inibição da formação de biofilme de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

A massa de biofilme foi reduzida quando as culturas foram expostas a diferentes concentrações de OELa I. A CIM_{OELa I} foi capaz de reduzir em 61,2% a massa de biofilme de *Salmonella typhi* e 38,9 % de *Shigella dysenteriae*. A 1/2x CIM_{OELa I} também foi capaz de reduzir a massa de biofilme de forma significante ($p < 0,05$). Nas concentrações de 2 e 4 mg/mL de OELa I houve redução da massa de biofilme de maneira dose dependente (GRÁFICO 12).

Gráfico 12 - Inibição da formação do biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* pelo OELa I



Inibição da formação do biofilme de *Salmonella typhi* (A) e *Shigella dysenteriae* (B) pelo OELa I. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios, em triplicata cada. Controle: meio de cultura + microrganismo. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de $p < 0,05$ (*) quando comparado ao controle. A porcentagem representa a massa de biofilme quantificada.

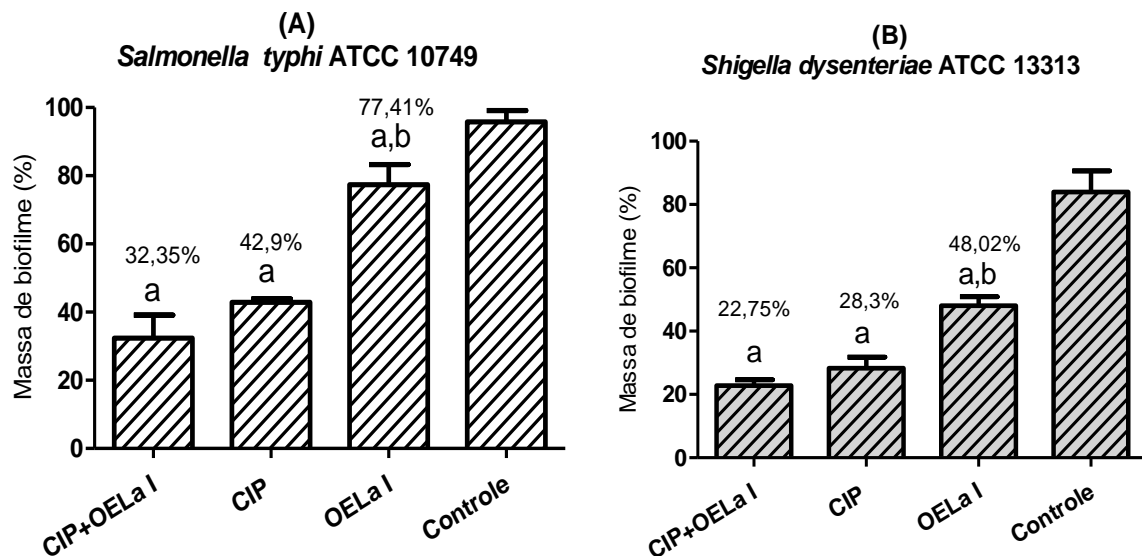
Considerando seu efeito anti-biofilme do OELa I, a associação de OELa I-CIP que inibiu o crescimento de células planctônicas foi testada na avaliação de inibição do biofilme, para isso foi selecionada a melhor associação OELa I-CIP do ensaio do *Checkboard*:

Salmonella typhi ATCC 10749: OELa I – CIP (1/16 CIM_{OELaI} - 1/16 CIM_{CIP});

Shigella dysenteriae ATCC 13313: OELa I – CIP (1/16 CIM_{OELaI} - 1/16 CIM_{CIP}).

A associação 1/16 x CIM_{OELaI} – 1/16 CIM_{CIP} inibiu a formação do biofilme em 67,6 e 77,2% para *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*, respectivamente (GRÁFICO 13).

Gráfico 13 - Inibição da formação do biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* pela associação OELa I-CIP.



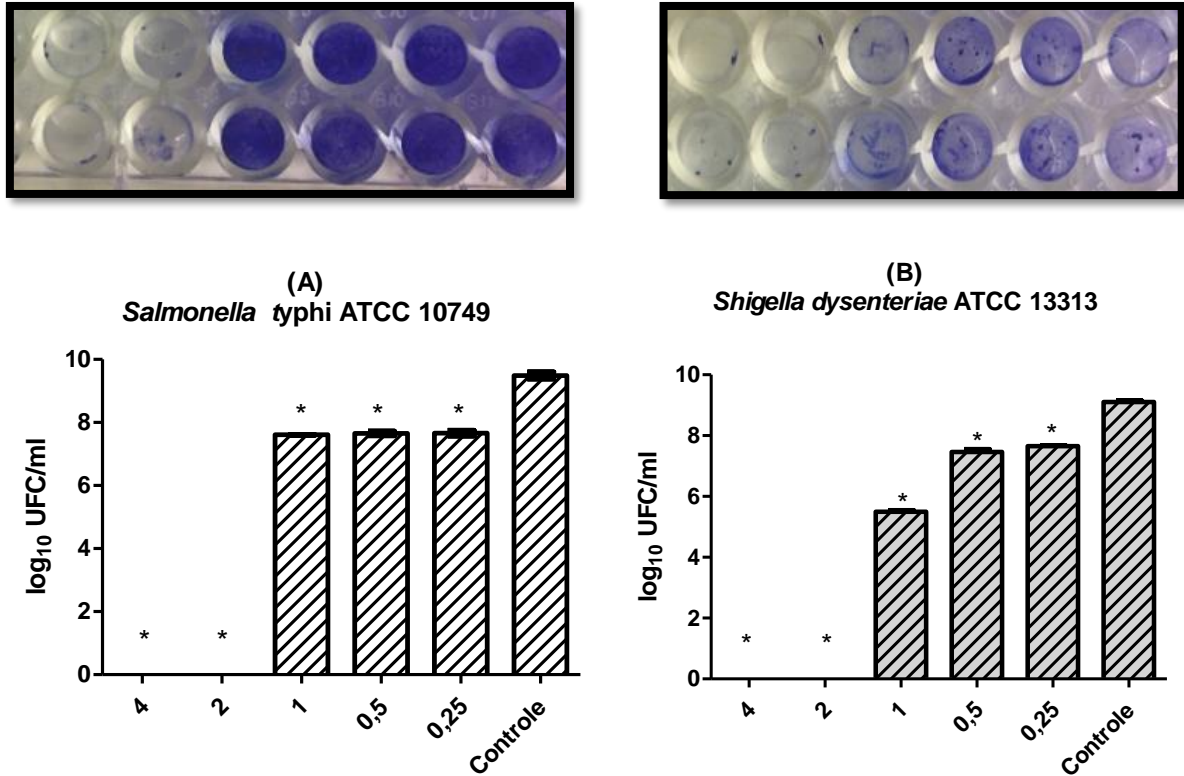
Inibição da formação do biofilme de *Salmonella typhi* (A) e *Shigella dysenteriae* (B) pela associação OELa I-CIP. CIP + OELa I (1/16 x CIM_{OELaI} – 1/16 CIM_{CIP}); CIP (1/16 CIM_{CIP}), OELa I (1/16 x CIM_{OELaI}); Controle (biofilme não tratado). Os valores estão expressos pela média ± EPM de dois ensaios. A porcentagem representa a massa de biofilme quantificada. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de $p < 0,05$ quando comparado ao controle (a), e valor de $p < 0,05$ quando comparado a associação CIP+OELa I (b).

6.4.2 Efeito anti-biofilme das associações OELa I-ATB na erradicação de biofilme de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*

Quando os biofilmes pré-formados foram expostos a concentração igual a 2x CIM_{OELaI} (2 mg/mL), houve perda de viabilidade celular após 24 horas de exposição. A CIM_{OELaI} (1 mg/mL) não foi capaz de erradicar o biofilme já formado, no entanto, houve

redução significativa da viabilidade microbiana no biofilme em comparação ao controle (GRÁFICO 14).

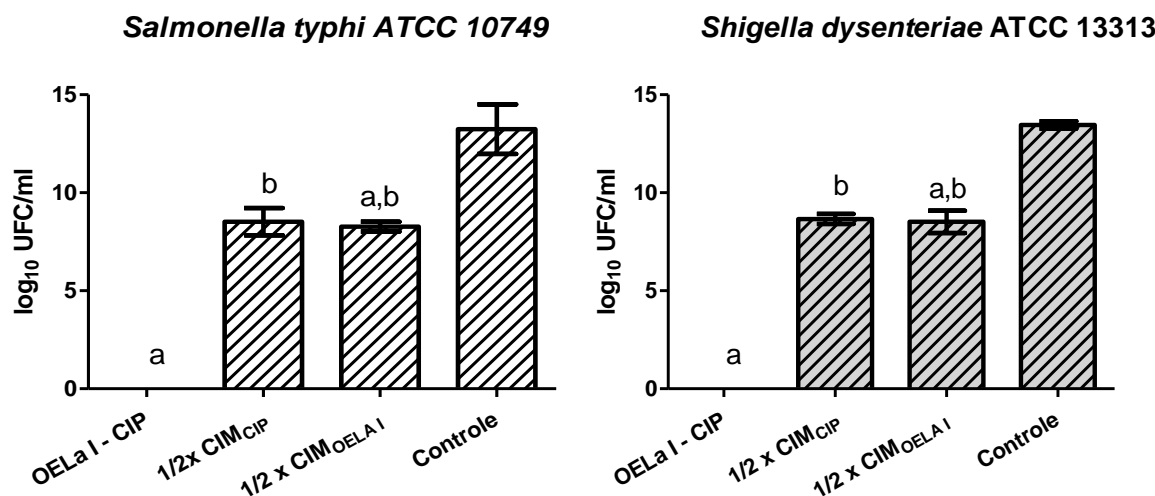
Gráfico 14 – Efeito do OELa I na viabilidade celular em biofilme de *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*



Efeito do OELa I na viabilidade celular em biofilme de 48 horas de *Salmonella typhi* (A) e *Shigella dysenteriae* (B). Controle (biofilme não tratado). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de dois ensaios. A porcentagem representa a massa de biofilme quantificada. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett e valor de $p < 0,05$ quando comparado ao controle (*).

Para avaliação do efeito modulador da OELa I sobre antimicrobianos de uso clínico sobre a erradicação de biofilme, foi selecionada a associação $1/2 \times \text{CIM}_{\text{OELaI}} - 1/2 \times \text{CIM}_{\text{CIP}}$, visto que nessas concentrações foi possível promover a perda de viabilidade celular após 24 horas de exposição ($p < 0,05$) quando comparado a ciprofloxacina. As concentrações isoladas não foram capazes de erradicar o biofilme já formado, para ambas as cepas (GRÁFICO 15).

Gráfico 15 – Efeito modulador do OELa I na atividade antimicrobiana da ciprofloxacina sobre biofilme maduro de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*



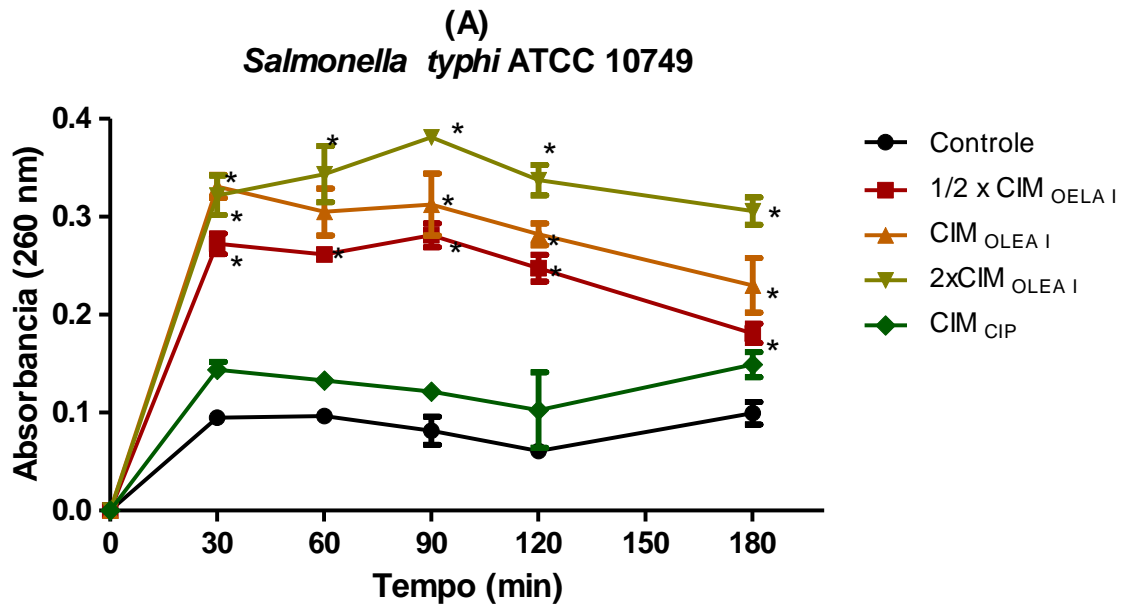
Efeito modulador do OELa I na atividade antimicrobiana da ciprofloxacina sobre biofilme maduro de *Salmonella typhi* (A) e de *Shigella dysenteriae* (B). OELa I - CIP ($1/2 \times \text{CIM}_{\text{OELa I}} - 1/2 \times \text{CIM}_{\text{CIP}}$); CIP ($1/2 \times \text{CIM}_{\text{CIP}}$); OELa I ($1/2 \times \text{CIM}_{\text{OELa I}}$); Controle (biofilme não tratado). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de dois ensaios. A porcentagem representa a massa de biofilme quantificada. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de $p < 0,05$ quando comparado ao controle (a), e valor de $p < 0,05$ quando comparado a associação OELa I - CIP (b).

6.5 Alteração na permeabilidade de membrana pela liberação de ácidos nucleicos e proteína

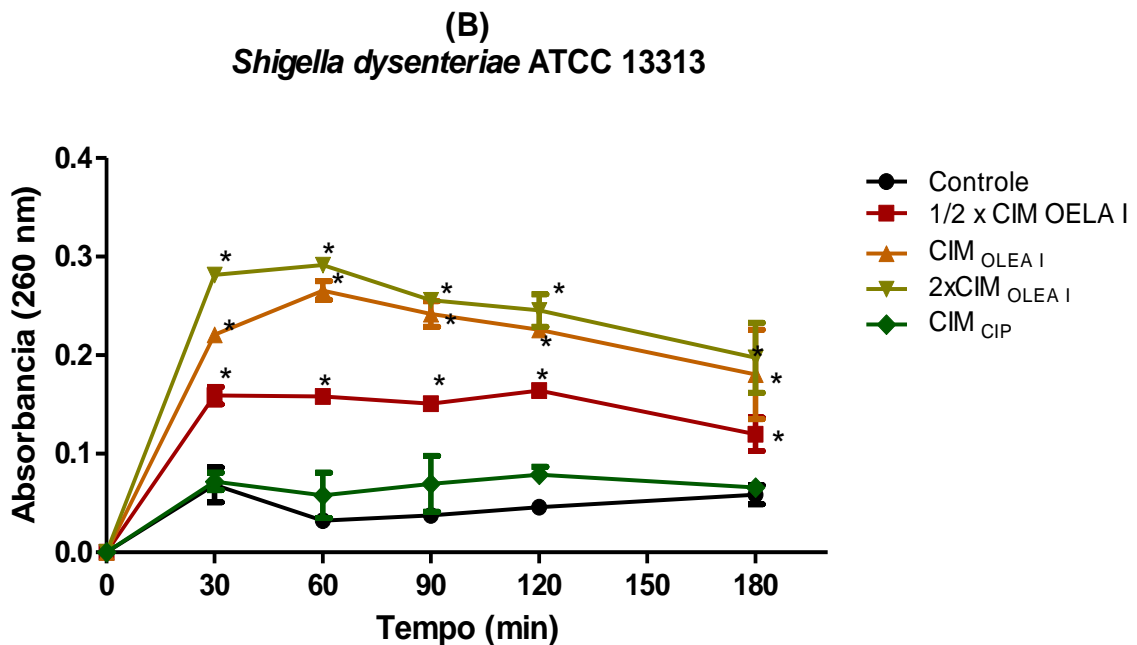
A ocorrência de extravasamento de material citoplasmático foi analisada pela metodologia de Zhou et al. (2008), pela medida de liberação de ácidos nucleicos e proteínas. O gráfico 17 mostra que não houve diferença significativa entre as absorbâncias das culturas dos grupos Controle (sem tratamento) e CIP (ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), após 30, 60, 90, 120 e 180 min, já que a ciprofloxacina não altera a permeabilidade da membrana citoplasmática.

Para os grupos $1/2 \times \text{CIM}$, CIM e $2 \times \text{CIM}$, a exposição por 90 e 120 min determinou um aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de ácidos nucleicos para ambas cepas testadas, quando comparado ao grupo controle. Após 60 min de exposição os grupos CIM e $2 \times \text{CIM}$ apresentaram aumento significativo de absorbâncias, indicando a ocorrência de extravasamento de material citoplasmático (GRÁFICO 16).

Gráfico 16– Efeito do OELa I na liberação de ácidos nucleicos pelas cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*



Efeito do OELa I na liberação de ácido nucleico pelas cepas de *Salmonella typhi* (A) e de *Shigella dysenteriae* (B): Controle: sem tratamento. A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios. *diferença significativa quando comparado ao grupo controle após 60 min; #: diferença significativa quando comparada ao grupo controle após 90 min; **: diferença significativa quando comparada ao grupo controle após 120 min.



Efeito do OELa I na liberação de ácido nucleico pelas cepas de *Salmonella typhi* (A) e de *Shigella dysenteriae* (B): Controle: sem tratamento. A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios. *diferença significativa quando comparado ao grupo controle após 60 min; #: diferença significativa quando comparada ao grupo controle após 90 min; **: diferença significativa quando comparada ao grupo controle após 120 min.

O Gráfico 16 mostra que não houve diferença significativa entre as absorvâncias das culturas dos grupos Controle (sem tratamento) e CIP (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), após 30, 60, 90, 120 e 180 min. Os resultados expressos em média estão representados na tabela 7.

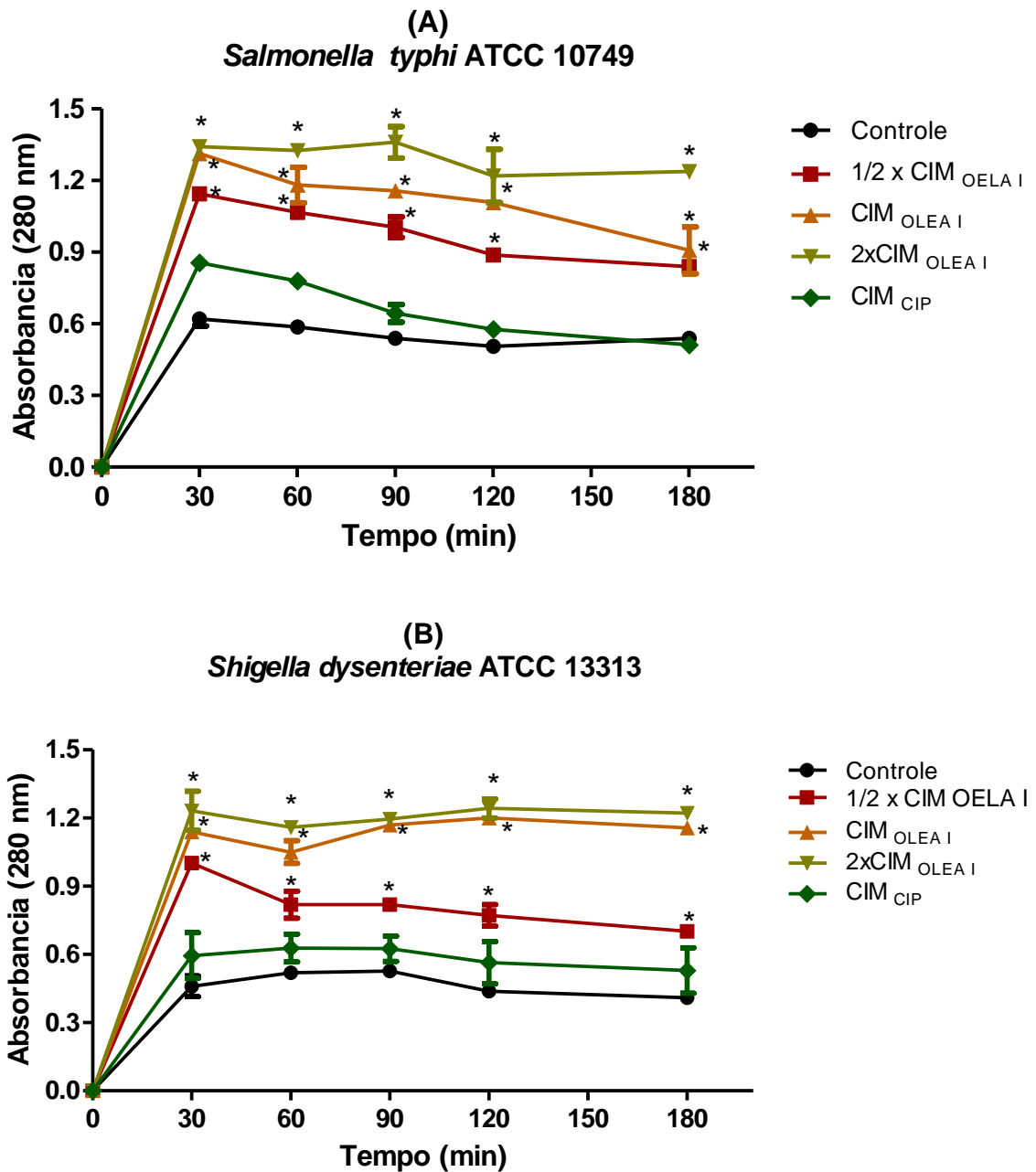
Tabela 7 - Cinética de liberação de ácidos nucleicos pelas cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae* após tratamento com diferentes concentrações de OELaI

<i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749					
Tempo	Controle	1/2xCIM_{OELaI}	CIM_{OELaI}	2xCIM_{OELaI}	Ciprofloxacina
0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
30	0,095±0,01	0,272±0,01	0,331±0,02	0,322±0,02	0,144±0,01
60	0,096±0,01	0,261±0,01	0,305±0,03	0,343±0,04	0,133±0,01
90	0,081±0,02	0,281±0,02	0,312±0,04	0,375±0,01	0,121±0,01
120	0,061±0,01	0,247±0,02	0,282±0,01	0,337±0,02	0,102±0,05
180	0,09±0,01	0,181±0,01	0,230±0,04	0,306±0,01	0,149±0,01
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 10333					
Tempo	Controle	1/2xCIM_{OELaI}	CIM_{OELaI}	2xCIM_{OELaI}	Ciprofloxacina
0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
30	0,068±0,02	0,159±0,01	0,171±0,07	0,281±0,01	0,072±0,01
60	0,016±0,02	0,133±0,03	0,125±0,01	0,291±0,01	0,033±0,01
90	0,037±0,01	0,151±0,01	0,207±0,07	0,256±0,01	0,069±0,04
120	0,046±0,01	0,182±0,02	0,206±0,14	0,245±0,02	0,079±0,01
180	0,058±0,01	0,120±0,02	0,180±0,06	0,197±0,05	0,036±0,04

Efeito do OELa I na liberação de ácidos nucleicos pelas cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae* : Controle: sem tratamento. Resultados expressos em média ± erro padrão de três ensaios.

Para os grupos 1/2xCIM, CIM e 2x CIM, a exposição por 90 e 120 min determinou um aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de proteínas para ambas cepas testadas, quando comparado ao grupo controle. Após 60 min de exposição os grupos CIM e 2x CIM apresentaram aumento significativo de absorvâncias, indicando a ocorrência de extravasamento de material citoplasmático (GRÁFICO 17).

Gráfico 17 – Efeito do OELa I na liberação de proteínas pelas cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*



Efeito do OELa I na liberação de proteína pelas cepas de *Salmonella typhi* (A) e de *Shigella dysenteriae* (B): Controle: sem tratamento. A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$) diferença significativa quando comparado ao grupo Controle (sem tratamento). Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios.

O Gráfico 17 mostra que não houve diferença significativa entre as absorbâncias das culturas dos grupos Controle (sem tratamento) e CIP (ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), após 30, 60, 90, 120 e 180 min. Os resultados expressos em média estão representados na tabela 8

Tabela 8 - Cinética de liberação de proteínas pelas cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae* após tratamento com diferentes concentrações de OELaI

<i>Salmonella typhi</i> ATCC 10749					
Tempo	Controle	1/2xCIM _{OELaI}	CIM _{OELaI}	2xCIM _{OELaI}	Ciprofloxacina
0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
30	0,621±0,03	1,144±0,01	1,313 ±0,01	1,342 ±0,01	0,855 ±0,02
60	0,587±0,01	1,066±0,02	1,181 ±0,07	1,325 ±0,02	0,780 ±0,03
90	0,540±0,02	1,005±0,04	1,156 ±0,01	1,360 ±0,06	0,644 ±0,04
120	0,505±0,01	0,887±0,02	1,108 ±0,02	1,219 ±0,11	0,577 ±0,01
180	0,540±0,01	0,839±0,01	0,907 ±0,09	1,238 ±0,02	0,511 ±0,01
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 10333					
Tempo	Controle	1/2xCIM _{OELaI}	CIM _{OELaI}	2xCIM _{OELaI}	Ciprofloxacina
0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
30	0,460±0,06	1,015±0,01	1,139 ±0,01	1,232 ±0,12	0,595 ±0,14
60	0,520±0,01	0,819±0,08	1,050 ±0,07	1,159 ±0,03	0,628±0,07
90	0,526±0,01	0,820±0,03	1,169 ±0,01	1,196 ±0,02	0,625 ±0,07
120	0,438±0,01	0,771±0,06	1,201 ±0,01	1,242 ±0,06	0,564 ±0,13
180	0,409±0,02	0,702±0,01	1,156 ±0,03	1,222 ±0,03	0,529 ±0,14

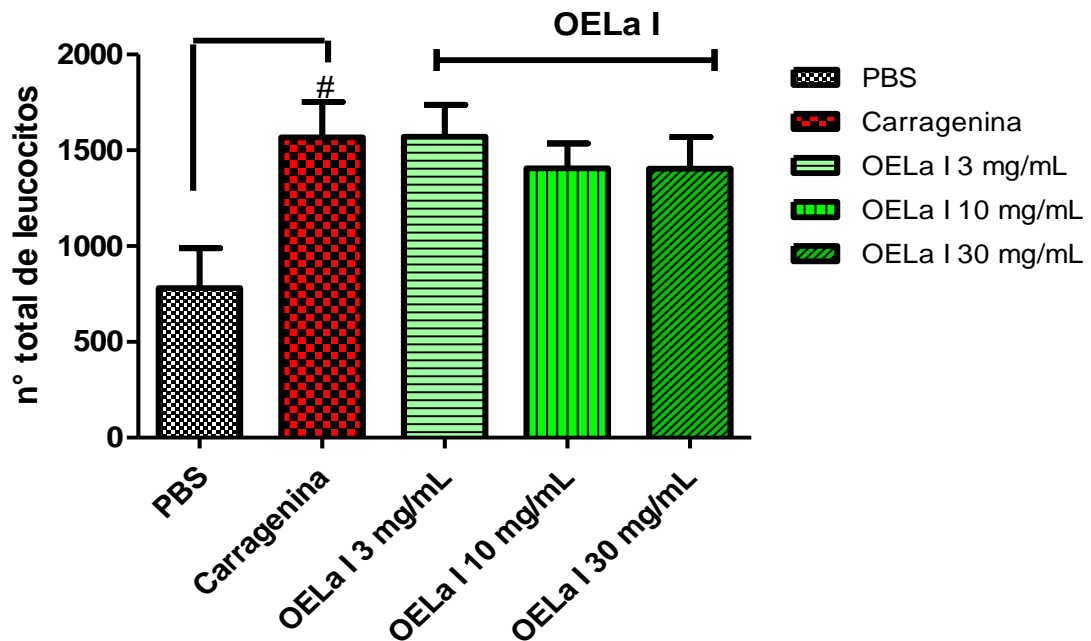
Efeito do OELa I na liberação de proteína pelas cepas de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae* : Controle: sem tratamento. Resultados expressos em média ± erro padrão de três ensaios.

6.6 Efeito modulador do OELa I na inflamação induzida em camundongo

6.6.1 Efeito modulador do OELa I sobre os leucócitos

A injeção intraperitoneal de carragenina 1% (500 µg/ 0,05mL) nos camundongos induziu um aumento significativo ($\#p<0,05$) no número total de leucócitos para a cavidade peritoneal quando comparado ao grupo veículo (PBS). O pré-tratamento dos animais com OELa I (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) não reduziu de forma significativa a migração de leucócitos quando comparado com a carragenina (GRÁFICO 18).

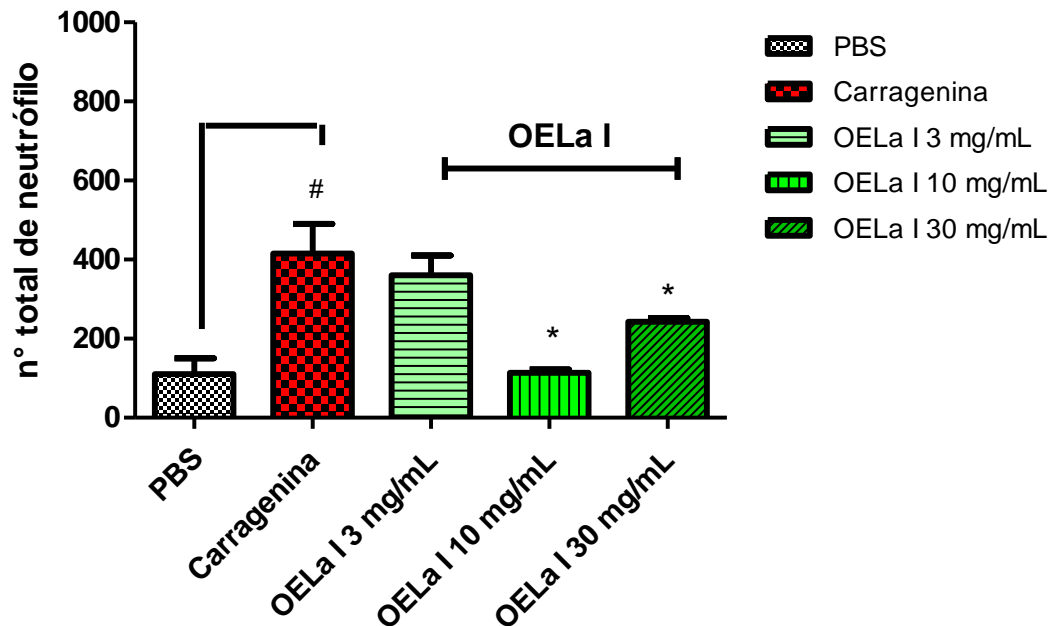
Gráfico 18 - Efeito do OELa I no número total de leucócitos em peritonite induzida por carragenina em camundongos.



A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet (# $p < 0,05$) quando comparado ao PBS e quando comparado ao grupo tratado somente com carragenina (* $p < 0,05$). Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios.

Da mesma forma, a carragenina 1% nos camundongos induziu um aumento significativo (# $p < 0,05$) no número total de neutrófilos para a cavidade peritoneal quando comparado ao grupo veículo (PBS). O tratamento dos animais com a concentração de 10 e 30mg/kg de OELa I reduziram de forma significativa (* $p < 0,05$) a migração de leucócitos polimorfonucleares na cavidade peritoneal quando comparado com a carragenina (GRÁFICO 19).

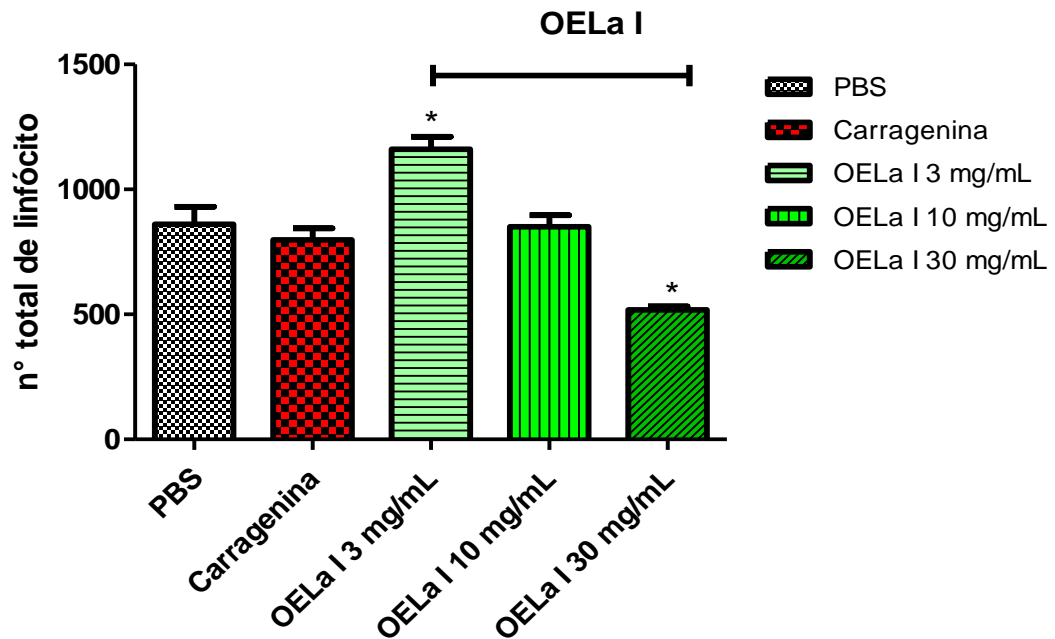
Gráfico 19- Efeito do OELa I no número total de neutrófilos em peritonite induzida por carragenina em camundongos



A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet (# $p < 0,05$) quando comparado ao PBS e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com carragenina. Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios.

O grupo tratado com a carragenina 1% não apresentou efeito sobre a população de linfócitos da cavidade peritoneal quando comparado ao grupo veículo (PBS). O tratamento dos animais com a concentração de 30mg/kg de OELa I reduziu de forma significativa (* $p < 0,05$) a população de linfócitos na cavidade peritoneal quando comparado com a carragenina (GRÁFICO 20).

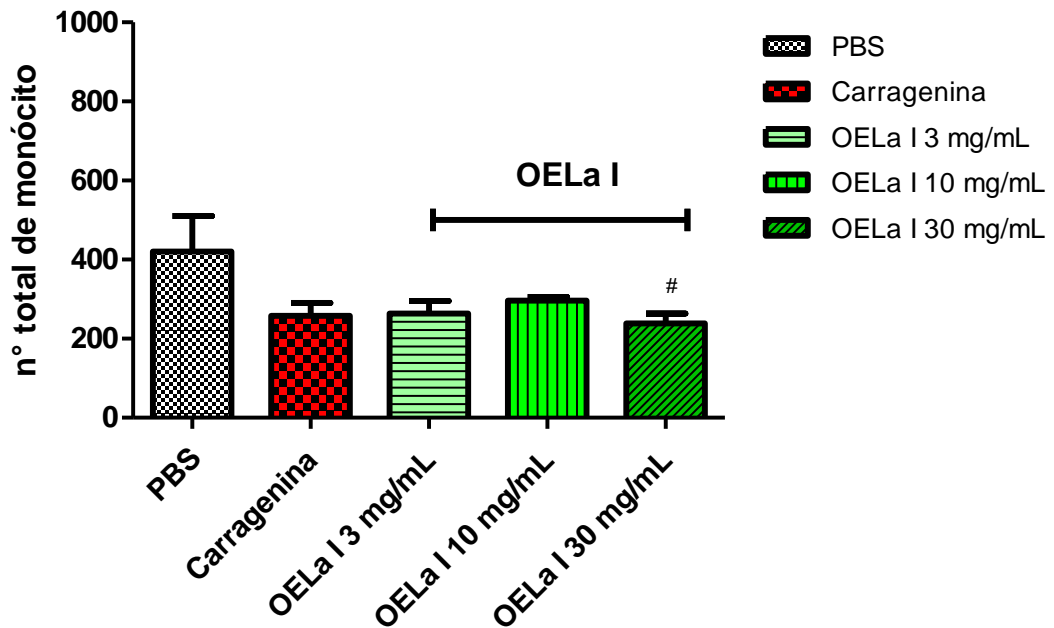
Gráfico 20- Efeito do OELa I no número total de linfócito em peritonite induzida por carragenina em camundongos



A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet (# $p < 0,05$) quando comparado ao PBS e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com carragenina. Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios.

O grupo tratado com a carragenina 1% não apresentou efeito sobre a população de monócitos da cavidade peritoneal quando comparado ao grupo veículo (PBS). O tratamento dos animais com a concentração de 30mg/kg de OELa I reduziu de forma significativa (* $p < 0,05$) a população de monócitos na cavidade peritoneal quando comparado com a carragenina (GRÁFICO 21).

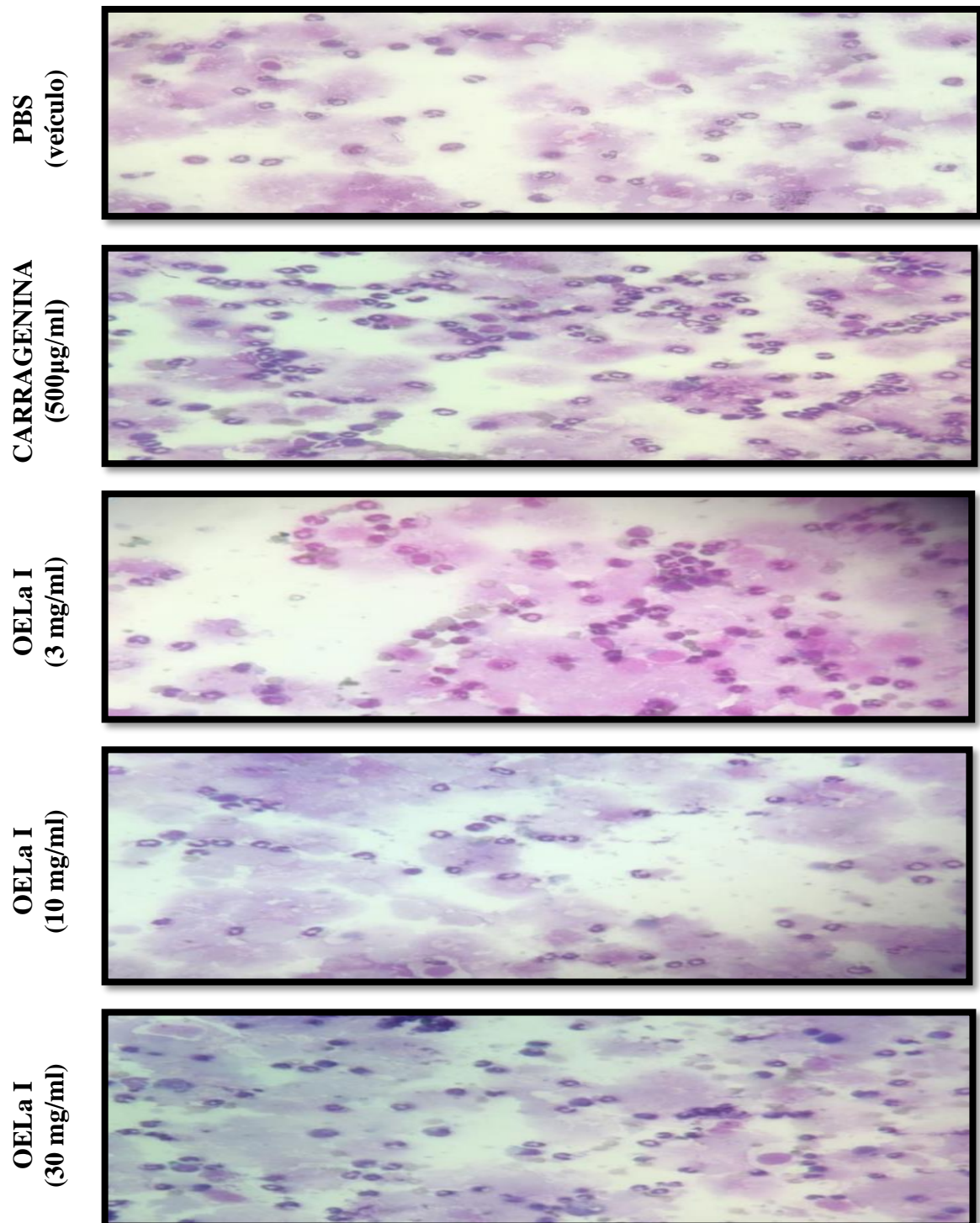
Gráfico 21- Efeito do OELa I no número total de monócito em peritonite induzida por carragenina em camundongos



A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet (# $p < 0,05$) quando comparado ao PBS e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com carragenina. Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios.

Na Figura 26 é possível verificar o padrão de celularidade encontrado no lavado peritoneal dos camundongos tratados com PBS, carragenina e OELa I (3, 10 e 30 mg/mL).

Figura 26- Efeito do OELa I sobre a celularidade em peritonite induzida por carragenina em camundongo

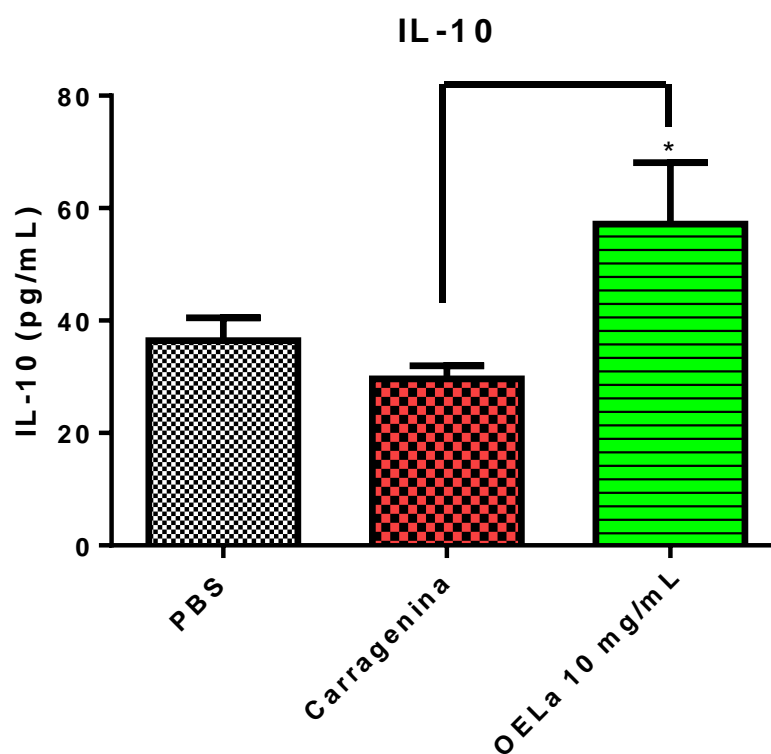


Padrão de celularidade encontrado no lavado peritoneal dos camundongos tratados com PBS, carragenina e OELa I (3, 10 e 30 mg/mL). Microscopia óptica (aumento de 100 x).

6.6.2 Efeito modulador do OELa I sobre o perfil de citocinas

O grupo tratado OELa I 10 mg/mL que teve o melhor efeito sobre a migração de neutrófilos foi selecionado para avaliação do efeito modulador sobre o perfil das citocinas TNF- α e IL-10. Não foram obtidas leituras para os grupos tratados com TNF- α , no entanto, quando foi realizada a dosagem de IL-10, o grupo tratado aumentou de forma significativa ($*p<0,05$) a liberação de IL-10 cavidade peritoneal quando comparado com a carragenina (GRÁFICO 22).

Gráfico 22- Efeito do OELa I na liberação de IL-10 em peritonite induzida por carragenina em camundongos



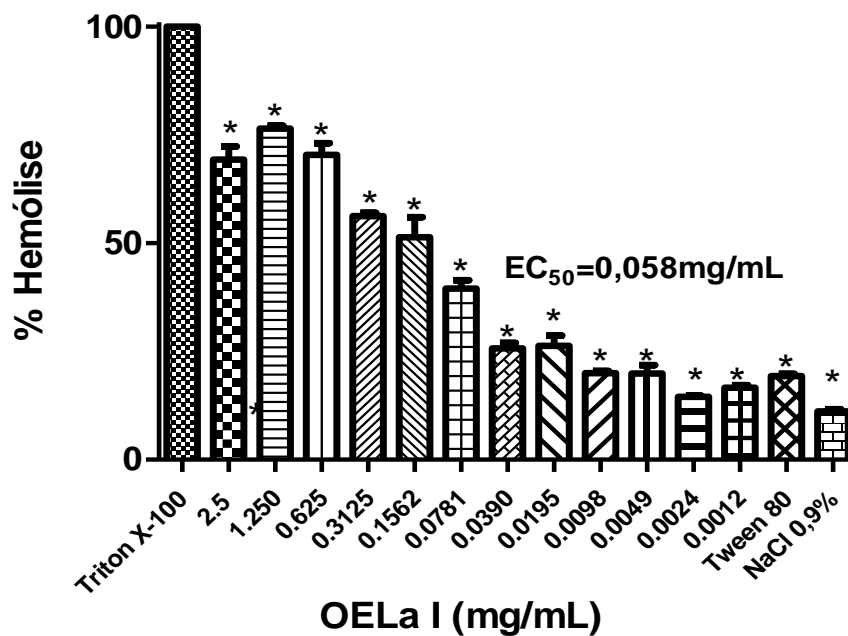
A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet ($\# p<0,05$) quando comparado ao PBS e $* p<0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com carragenina. Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios. A dosagem foi realizada no fluido peritoneal coletado 4h após da aplicação da carragenina.

6.7 Efeito do OELa I sobre a membrana eritrocitária

Os resultados do efeito hemolítico foram expressos em porcentagem, comparando os valores das amostras com Triton X 100 (controle positivo) para o qual se atribuiu 100%

hemólise. O ensaio de atividade hemolítica sobre eritrócitos revelou uma $EC_{50} = 0,058$ mg/mL (GRÁFICO 23).

Gráfico 23 -Efeito do OELa I na citotoxicidade de hemácias



A análise estatística realizada foi ANOVA, com pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$) quando comparado ao Triton X 100 (1%); Tween 80 a 0,1% (diluyente do OELa I); NaCl 0,9% (diluyente suspensão de hemácias). Resultados expressos em média \pm erro padrão de três ensaios.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15% a 20%. Entre os elementos que compõem essa biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destacam o conhecimento sobre manejo e o uso de plantas medicinais (BRASIL, 2016).

O Ceará, por sua vez, apresenta condições peculiares que permite o desenvolvimento de uma flora rica, do ponto de vista farmacológico. Diante de todo esse potencial, a espécie vegetal *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown encontra-se dentre as plantas da Relação Estadual de Plantas Medicinais (BANDEIRA, 2019).

Neste sentido, compreende-se que o Brasil, com seu amplo patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem em mãos a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área de saúde, que prime pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os princípios éticos e assim, promover a geração de riquezas com inclusão social, através do uso de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016).

No presente trabalho, o óleo essencial das folhas do quimiotipo I de *L. alba* (OELa I) foi extraído pela técnica de destilação com arraste de vapor d'água e sua composição, posteriormente, foi analisada através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A análise fitoquímica obtida para OELa I identificou 20 constituintes, dentre eles cetonas (5%), monoterpênicos (40%) e sesquiterpênicos (55%). Os componentes majoritários foram o citral e mirceno, o que caracterizou como óleo essencial do quimiotipo I (Tabela 1) (MATOS, 1996).

A variabilidade de composição química dos óleos essenciais pode ser influenciada pelas condições de cultivo, e pela falta de modelos de produção que definam as práticas e condições específicas que maximizem a eficiência da produção. Fatores como clima, solo, região geográfica, duração do dia e noite contribuem para a variação dos constituintes que compõem os OELa (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011).

No estudo realizado por Veeck et al. (2012), foi possível realizar a identificação de 62 compostos. Os principais constituintes químicos foram o linalol, eulapitol, germacreno,

cariofileno. Hatano et al. (2012), avaliando o efeito ansiolítico do OELa, classificaram como constituinte majoritário a carvona (54,57%) e o limoneno (23,13%). Teixeira (2015), revelou a presença de 15 componentes sendo os constituintes majoritários o citral e o limoneno, 57,67% e 9,27%, respectivamente. Machado et al. (2014), apresentaram a atividade do OELa sobre cepa de *S. choleraesuis* ATCC 10708, *E. coli* ATCC 10536, *L. innocua* ATCC 19115, *L. monocytogenes* ATCC 33090, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. aureus* ATCC 6538P e teve como constituinte majoritário o e-citral (31.57%), neral (25.50%), d-limonemo (14.07%), germacrene D (5.47%), b-elemol (5.37%), g- terpinen (4.09%) and p-cymene (1.56%).

O potencial farmacológico dos óleos essenciais de *Lippia alba* é amplamente descrito na literatura (CARVALHO *et al.*, 2018; RIVERA *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2014), entretanto, sua ação sobre bactérias Gram-negativo de importância médica foi pouco explorada (TEIXEIRA,2009; AQUINO *et al.*, 2010).

No presente estudo, constatou-se o ótimo potencial antimicrobiano deste óleo sobre cepas causadoras de infecções gastrointestinais, com rápida ação, não só bacteriostática, mas também bactericida sobre *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*.

A atividade bactericida e bacteriostática de substâncias pode ser determinada por meio de ensaios de tempo de morte (*time kill assay*), método *in vitro* que permite identificar a velocidade da ação antimicrobiana da substância estudada, informação que não é obtida nos ensaios de determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima (AIYEGORO; AFOLAYAN; OKOH, 2009). Através desse ensaio, foi possível observar que a ação bactericida de OELa I ocorreu com curtos tempos de exposição (1 a 2 horas) e a ação bacteriostática foi evidenciada em concentrações subinibitórias (1/2xCIM) (GRÁFICO 3 e 4). Considerando o possível desenvolvimento de um fitoterápico, a concentração da CIM poderia ser utilizada como concentração de ataque diante de infecções agudas, e as concentrações subinibitórias poderiam ser doses de manutenção durante o tratamento.

Patógenos transmitidos por alimentos, tais como *Salmonella* spp., *E. coli* e *Shigella* spp. estão associados a alta taxa de infecções nos países, onde o saneamento básico e a falta de higiene são facilitadores da ocorrência de gastroenterites (AHMED; SHIMAMOTO, 2014). As infecções por *Salmonella* spp. corresponderam a mais de 25% de todos os surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2017 (BRASIL, 2018).

Relatórios da Organização Mundial da Saúde estimam que a cada ano, mais de 600 milhões de pessoas ficam doentes depois de consumirem alimentos contaminados, resultando

em quase 420.000 mortes (WHO, 2015). As espécies de *Shigella sp* são patógenos intracelulares facultativos que causam doença através da invasão do epitélio do cólon. A shigelose resulta em morbidade significativa e mortalidade em todo o mundo a cada ano, predominantemente em crianças menores de 5 anos em países em desenvolvimento (KOTLOFF *et al.*, 2013; LIVIO *et al.*, 2014). Atualmente, não há vacina contra *Shigella sp* e a resistência a antibióticos é uma complicação crescente (BHATTACHARYA *et al.*, 2015).

De acordo com GU *et al.* (2012) a resistência antimicrobiana da *Shigella spp* as quinolonas, na região Ásia-África, aumentou num ritmo extremamente acelerado e que a proporção de cepas resistentes é dez vezes maior que na Europa e na América. Já a resistência antimicrobiana da *Salmonella spp* às quinolonas foi relatada ao sistema de vigilância italiano para doenças transmitidas por alimentos e água (GARCÍA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

O aumento da prevalência de bactérias multirresistentes fez da busca por novos agentes antibacterianos uma importante estratégia para o estabelecimento de terapias alternativas no tratamento de doenças infecciosas. Os óleos essenciais usados como agentes antimicrobianos, além de atingirem muitos alvos, simultaneamente, não apresentam relatos de resistência microbiana (BAKKALI *et al.*, 2008).

Diante da crescente resistência bacteriana a múltiplas drogas, combinações sinérgicas entre novas moléculas e os medicamentos comerciais podem ser boas alternativas para o controle de tais microrganismos (DODOU *et al.*, 2017). As vantagens das associações é que elas aumentam a atividade dos antimicrobianos, impedem a resistência aos medicamentos, diminuem doses necessárias que subsequentemente podem reduzir o custo, os efeitos adversos e a toxicidade dos fármacos (SZABO *et al.*, 2010).

Os ensaios de atividade moduladora sobre células planctônicas evidenciaram que o OELa I foi capaz de modular sinergicamente a ação de antimicrobianos de uso clínico sobre *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae*. Houve sinergismo entre a OELa I e antimicrobianos de diferentes classes como cefalosporinas de diferentes gerações (cefepime e ceftriaxona) e quinolona (ciprofloxacina) (TABELA 5, GRÁFICO 5, 6 e 7), reduzindo os valores de CIM para estes microrganismos em até 16 vezes, no caso da ciprofloxacina (TABELA 5).

O ensaio de tempo de morte pode ser realizado para determinar se existe combinações sinérgicas entre substâncias testadas, além de identificar a velocidade da ação bactericida das associações. Nesse estudo, foram selecionadas associações, para cada uma das cepas testadas, com as menores concentrações de OELa I que foram capazes de modular

sinergicamente a ação do antibiótico, obtidas pelo método do *checkboard*. A associação testada OELa I-CIP foi capaz de reduzir a viabilidade celular após 4 horas. A taxa de mortalidade bacteriana foi considerada com efeito sinérgico quando ocorreu uma redução $> 2\log_{10}$ UFC/mL (JAYARAMAN et al., 2010).

Combinações que apresentem sinergismo de dois ou mais agentes antimicrobianos são interessantes em virtude de fatores como a prevenção do surgimento de cepas resistentes, a diminuição da toxicidade, visto que o mesmo efeito é obtido com doses bem menores, além de, muitas vezes, expandir o espectro de ação em relação às substâncias isoladas (ROCHA, 2012).

Salmonella e *Shigella* tem como importante fator de virulência a capacidade de formar biofilme (DI DOMENICO et al., 2017; KANG et al., 2018). Biofilmes são aglomerados são aglomerados bacterianos, aderidos a uma superfície, e incorporados a uma matriz extracelular, o que fornece proteção tanto contra substâncias antimicrobianas como contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Esta estrutura permite que estas bactérias sobrevivam em condições hostis, como a exposição à luz UV, exposição a metais, exposição a ácidos, desidratação e salinidade (STOODLEY, COSTERTON, STOODLEY, 2004).

Alguns mecanismos que conferem características protetoras aos biofilmes são: a matriz pode representar uma barreira mecânica dificilmente penetrada pelas células do sistema imune, além disso, a matriz limita a difusão para alguns antibióticos. Além disso, as células em biofilme apresentam diferenças fisiológicas em relação às células planctônicas, por exemplo, as bactérias em biofilme apresentam atividade reduzida de alguns processos celulares, como replicação do DNA, divisão celular e síntese proteica (OTTO, 2012). Para a formação do biofilme, a bactéria sofre adaptações em todo o seu genoma, como na biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e da parede celular, que justificam a limitação da atividade das substâncias antimicrobianas sobre tais microrganismos (OTTO, 2009).

Considerando o potencial antimicrobiano do OELa I sobre cepas planctônicas de *Salmonella* spp e *Shigella* spp e sendo estes microrganismos de importância médica, principalmente, pela sua capacidade de formar biofilme, foi avaliada a ação antibiofilme de OELa I. Inicialmente, as cepas foram classificadas quanto a sua capacidade de aderir e formar biofilme na microplaca, em seguida, os ensaios de avaliação da ação antibiofilme foram realizados em caldo TSB suplementado com glicose 1% (p/v) (OTTO, 2008; BOLES; HORSWILL, 2011).

A OELa I foi capaz de inibir a formação do biofilme na mesma concentração que inibiu o crescimento de células planctônicas, após 24 horas de exposição, reduzindo em 61,2%

a massa de biofilme de *Salmonella typhi* (fortemente aderente) e 38,9 % de *Shigella dysenteriae* (moderadamente aderente). Quando associado, OELa I-CIP foi capaz de promover a inibição da formação do biofilme, utilizando concentrações de 1/16xCIM do OELa I e do antimicrobiano.

A aplicação do estudo com associações de substâncias com atividade antimicrobiana também pode ser aplicada além da clínica, na rotina das indústrias alimentícias. De acordo com Bag e Chattopadhyay, (2017), a associação do ácido p-cumárico com a nisina (conservante) foi efetiva sobre células planctônicas e biofilmes de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo.

O OELa I isolado não foi capaz de erradicar o biofilme pré-formado, no entanto, houve redução significativa da viabilidade microbiana no biofilme em comparação ao controle, porém, quando associado, OELa I-CIP foi capaz de promover a perda de viabilidade celular após 24 horas de exposição, utilizando concentrações mais elevadas do OELa I e do antimicrobiano.

Trata-se de um resultado esperado, devido aos biofilmes serem estruturas mais resistentes e que necessitam de concentrações mais elevadas para sua erradicação, cerca de 10 a 1000 vezes maiores, em comparação a células planctônicas (AGUILA-ARCOS *et al.*, 2015; OTTO, 2012). E as taxas de crescimento de células em biofilmes são menores do que a de células planctônicas, o qual poderia explicar em parte a maior resistência dos biofilmes aos antibióticos, particularmente, aqueles que a eficiência é muito dependente da taxa de crescimento das células (CERCA *et al.*, 2005).

As bactérias que residem nos biofilmes são protegidas do estresse ambiental em comparação com células planctônicas, por isso a formação de biofilme passa a ser predominante. Ao lado de ambientes que processam alimentos, biofilmes de *Salmonella* spp, por exemplo, são frequentemente encontrados em celeiros, cozinhas e banheiros (TEPLITSKI *et al.*, 2009).

Salmonella spp é capaz de formar biofilmes em superfícies abiótica e bióticas (cálculos biliares). Depois de atravessar o epitelial intestinal *S. typhi* é capaz de invadir macrófagos, que podem levar o patógeno para o fígado de onde ele pode cair na vesícula biliar.

Outros estudos também têm demonstrado a importância da *Shigella* spp. como causa de diarreia em países em desenvolvimento (BONKOUNGOU *et al.*, 2013; RATHAUR *et al.*, 2014). Em um estudo realizado em Bangladesh que investigou especificamente a etiologia da disenteria em mais de duas mil crianças abaixo de cinco anos de idade, a *Shigella* spp foi o principal agente causador, com 32% dos casos (FERDOU *et al.*, 2014).

Diversos mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos OELa. De modo geral, entende-se que a inibição do crescimento microbiano

pelos OE seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do OE, resultando na expansão, maior fluidez e permeabilidade da membrana, perturbação e incorporação de proteínas a membrana, inibição da respiração e alteração do transporte iônico (DA SILVEIRA, 2012).

No estudo de Teixeira (2015), o mecanismo de ação do OELa, sobre cepas de *S. aureus*, ocorre por ação direta sobre o envoltório celular, o que foi comprovado pela ocorrência de alteração irreversível na permeabilidade da membrana citoplasmática, com consequente aumento na captação de cristal violeta, liberação de ácidos nucleicos e efluxo de íons potássio, bem como por danos na parede bacteriana, e inibição da atividade de fatores de virulência. Os constituintes majoritários do OELa, por serem hidrofóbicos, podem aderir aos lipídeos da membrana celular, destruindo estruturas e tornando-a mais permeável, levando a perda de componentes celulares, o que pode determinar danos graves e irreversíveis a célula.

A alteração na permeabilidade está relacionada com a capacidade de interação dos componentes de OE com a membrana citoplasmática, podendo se dissolver na bicamada lipídica, alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos, desestabilizando assim a membrana e aumentando sua fluidez, resultando no incremento danoso de sua permeabilidade passiva (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

Devi et al. (2010) evidenciaram o efeito do eugenol sobre a permeabilidade da membrana externa pela captação do corante cristal violeta para a cepa de *Salmonella typhi* sem tratamento com eugenol apresentaram uma captação de 43% e essa captação aumentou para 95% e 99%, após o tratamento com 1% (v/v) e 5% (v/v), respectivamente.

A ocorrência de extravasamento de material citoplasmático foi analisada pela medida de liberação de ácidos nucleicos e proteínas após tratamento com OELa I. A cinética de liberação foi estabelecida, de forma que foi possível observar que a exposição por 90 e 120 min determinou um aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de ácidos nucleicos para ambas cepas testadas, quando comparado ao grupo controle. No estudo de Liu (2004), foi possível verificar que a liberação de ácidos nucleicos ocorre por ação na membrana citoplasmática e seu efeito ocorre de maneira dose-dependente.

A determinação *in vitro* do potencial antimicrobiano de preparações caseiras à base de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas foi realizada no estudo de Bastos et al. (2011). Nesse estudo, foi possível constatar, o uso frequente de plantas medicinais como uma opção terapêutica de baixo custo no tratamento de doenças. A utilização de plantas medicinais em uma determinada comunidade, evidenciou que o boldo e a erva-

cidreira foram às plantas mais utilizadas, para o tratamento de doenças como dor de barriga, enjoo, ansiedade e alívio da dor de cabeça. A população do estudo usava estas plantas na forma de chá (92,5%), xarope (17,4%) e a folha *in natura* (2%) (VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014).

A diarreia é uma síndrome intestinal determinada pelo aumento de volume, quantidade de água ou frequência das evacuações. As diarreias infecciosas são caracterizadas pela ruptura da barreira intestinal a partir da ação de patógenos, e são comumente acompanhadas de náusea, vômito e dores abdominais. A transmissão ocorre por água ou alimentos contaminados, de pessoa a pessoa ou resultado de higiene e saneamento básico precários (PETRI *et al.*, 2008). A desnutrição é um fator de risco importante para a ocorrência de diarreias infecciosas. O comprometimento da resposta imune inata pode levar a uma maior suscetibilidade ao estabelecimento de infecções entéricas que, por sua vez, desencadeiam um estado de má-absorção de nutrientes, além de dano tecidual e inflamação intestinal (GUERRANT *et al.*, 2013).

Considerando, o uso popular da *Lippia alba*, o estudo se propôs a realizar o estudo *in vivo* para investigar o potencial do OELa I de modular a resposta inflamatória induzida em camundongos. No estudo, foi utilizado o modelo de peritonite induzida por carragenina.

A inflamação aguda induzida por carragenina é um processo não imune, e bastante reproduzível. Quando injetada subcutaneamente na região plantar do animal, a carragenina induz os sinais cardinais da inflamação como edema (tumor), eritema (rubor) calor e hiperalgesia que se desenvolvem imediatamente em decorrência da presença de vários mediadores pró-inflamatórios plasmáticos como a histamina, serotonina, bradicinina, citocinas ou das células envolvidas na resposta inflamatória (SADEGHI *et al.*, 2014). Outros parâmetros de suma importância na resposta inflamatória são a migração de células leucocitárias para o local da inflamação, o extravasamento de proteínas para o tecido ou exsudato e a liberação de citocinas (MEDZHITOV, 2010).

A carragenina é um colóide obtido por extração em fase aquosa de variedades naturais de algas das famílias *Gigartinaceae*, *Solieriaceae*, *Hypneaeeae* e *Furcellariaceae* da classe *Rhodophyceae* (algas vermelhas). Administrada por via intraperitoneal induz um aumento sustentado da permeabilidade pós-capilar, favorecendo um aumento na infiltração celular, em especial dos neutrófilos (MALECH; GALLIN, 1987). Desta forma, este modelo de inflamação aguda possibilita a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade

peritoneal, sob a ação de agentes quimiotáticos, principalmente citocinas e quimiocinas (BROOKS; DAY, 1991).

Dentre os eventos celulares mais importantes, destacamos a migração leucocitária e consequente instalação da resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos constituem as primeiras células sanguíneas a serem recrutadas para o tecido, com o objetivo de eliminar o agente patogênico e favorecer a recuperação tecidual. Os neutrófilos recrutados produzem diferentes interleucinas como a IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 que contribuem para potencializar a resposta inflamatória. No entanto, a sua permanência no tecido pode promover sérios danos contribuindo para a instalação do processo inflamatório crônico (MEDZHITOV, 2010).

Os animais pré-tratados com o OELa I não apresentam redução significativa do número de leucócitos no exsudato peritoneal. No entanto, o tratamento dos animais com a concentração de 10 e 30mg/kg de OELa I reduziram a migração de leucócitos polimorfonucleares na cavidade peritoneal. Segundo Fattori, Amaral e Verri Jr (2016), inibir o recrutamento de neutrófilos para a região inflamatória é de fundamental importância para a reversão do processo inflamatório.

A inflamação aguda é caracterizada por dilatação dos vasos, exsudação de plasma e migração celular para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004), desta forma, seguindo o aumento na permeabilidade vascular, há o infiltrado celular, principalmente de neutrófilos, que contribuem para o processo inflamatório através da produção, dentre outros mediadores, de radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido e radicais hidroxilas (POSADAS *et al.*, 2004). O padrão de celularidade pode ser evidenciado na Figura 26.

A inibição da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal pode se dar por dois mecanismos: a inibição da produção de substâncias quimiotáticas e/ou a inibição da expressão de moléculas de adesão, haja vista que os leucócitos necessitam de substâncias quimiotáticas que facilitem sua migração para o local onde está ocorrendo a injúria, inflamação, para então desencadear seus efeitos na tentativa de destruir o agente agressor (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004). A redução do influxo leucocitário também está associada à inibição da mieloperoxidase (PEREIRA *et al.*, 2006), enzima importante nos processos inflamatórios.

Neste trabalho também decidimos investigar se o efeito antiinflamatório do OELa I estaria relacionado, à inibição da liberação de algumas citocinas, especialmente, IL-10 e TNF- α . TNF- α é uma outra citocina pró-inflamatória, secretada principalmente por macrófagos ativadas, que tem um papel fundamental em diversas condições tais como inflamação, imunomodulação, citotoxicidade e apoptose. Esta citocina é reconhecida como quimioatraente e está intimamente associada com processo de migração de neutrófilos (CROSARA *et al.*, 1996).

TNF- α é um dos agentes liberados pela carragenina, em sua fase inicial e um marcador de inflamação aguda.

A metodologia utilizada no estudo para detecção do TNF- α foi limitada, impedindo que fossem quantificados nos grupos do estudo. No entanto, para IL-10, foi possível observar que na concentração de OELa I 10 mg/ml houve aumento da liberação de IL-10 quando comparando ao controle, indicando que o óleo pode modular de forma positiva o efeito anti-inflamatório, porém estudos que descrevam de que maneira ocorre a indução de produção de de IL-10 são necessários.

Diante do potencial farmacológico do OELa I, é fundamental a elaboração de estudos que apontem a toxicidade e os riscos apresentado quanto ao seu uso. Para isso foi avaliado o efeito do OLEa I sobre eritrócitos humanos, que revelou que a OELa I apresenta uma EC₅₀ próxima a CIM do OELa I. O eritrócito é um excelente modelo experimental devido à facilidade com que pode ser obtido e apresentar fácil preservação. Além disso, funciona como modelo para possíveis mecanismos de ação de substâncias (SPRAGUE *et al.*, 2007).

O estudo revela que a janela terapêutica do OELa I é estreita, faixa terapêutica próxima a faixa subterapêutica e tóxica, o que indica que estratégias devem ser consideradas no desenvolvimento e o uso desse óleo. A associação do OELa I com antimicrobianos e/ou o uso de sistemas de liberação prolongada (nanocápsulas) podem minimizar esse risco.

Nesse contexto, o manejo e a prevenção da *Salmonella* e *Shigella* representam um grande desafio para a saúde pública (GARCÍA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014) e o estudo demonstrou o grande potencial do OELa I na terapêutica dessas infecções.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o OELa I apresentou atividade antibacteriana sobre o crescimento planctônico, na formação de biofilme e na ruptura do biofilme maduro de *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*. O OELa I foi capaz de modular a atividade antimicrobiana da ciprofloxacina, de forma a reduzir a concentração utilizada, atuando de forma sinérgica. Seu mecanismo de ação ocorre por mudanças no envoltório celular bacteriano, levando a perda de compostos intracelulares, e por inibição da atividade de fatores de virulência. O OELa I é um agente que modula o processo de migração de leucócitos e de interleucinas na inflamação induzida por carragenina. Essas atividades biológicas destacam o grande potencial do OELa I como candidato ao desenvolvimento de um fitoterápico promissor no combate a infecções por *Salmonella typhi* e de *Shigella dysenteriae*.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- ABDULLAHI, U.F., IGWENAGU, E., MU'AZU, A., ALIYU, S.; UMAR MI. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. **Veterinary World**, 9: 12-18., 2016.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, 4^o Edição, 2007.
- AGUILA-ARCOS, S. et al. A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* overexpresses membrane proteins associated with pathogenesis when grown in biofilms. **J Membrane Biol.** v. 248, n. 3, p. 431-42, Apr 2015.
- AHMED, Ashraf M.; SHIMAMOTO, Tadashi. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **International journal of food microbiology**, 2014, 168: 57-62.
- AIYEGORO, O.; AFOLAYAN, A.; OKOH, A. In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. **J Med Pl Res**, v.3, n.6, p. 462-467, 2009.
- AKIRA, S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. **Cell** 124, 783–801 (2006).
- ANDERS, K. L. et al. Epidemiology and virology of acute respiratory infections during the first year of life: a birth cohort study in Vietnam. **Pediatr Infect Dis J**, v. 34, n. 4, p. 361-70, 2015.
- ANGELINI, M. et al. Molecular epidemiology of *Shigella* spp. strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 685-92, 2009.
- BAG, Anwesa; CHATTOPADHYAY, Rabi Ranjan. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. **PloS one**, 2015, 10.7.
- BAMIAS, G., PIZARRO, T.T. & COMINELLI, F. **Transl. Res.** 167, 104–115 (2016).
- BANDEIRA, M. A. M.; GOMES, A. B.; BRASIL, A. R. L.; PEIXE, J. C. O.; MAGALHÃES, K. N.; SÁ, K. M.; CARVALHO, M. T. F. P.; MONTEIRO, P. M.; ROMERO, N. R.; FONSECA, S. G. C. **A fitoterapia no ciclo da assistência farmacêutica: inserção das farmácias vivas**, Fortaleza: HBM, 2015.
- BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9^a Edição, Editor: Mosby, St. Louis: Bailey & Scott's, 1994.
- BATISTA, A.H.M **Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da violaceína sobre cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilme** Fortaleza: Dissertação .Universidade Federal do Ceará, 2014.
- BATISTA, Andressa et al. Modulatory Effect of *Lippia alba* Essential Oil on the Activity of Clinically Used Antimicrobial Agents on *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* Biofilm. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 4, p. 52, 2018.

BETONI JEC, MANTOVANI RP, BARBOSA LN, DI STASI LC, FERNANDES JUNIOR A . Synergism between plants extract and antimicrobial drugs used on Staphylococcus aureus diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101: 387-390. 2006.

BHAN, M. K., BAHL, R. & BHATNAGAR, S. Typhoid and paratyphoid fever. **Lancet** 366, 749–762 (2005).

BHATTACHARYA D, BHATTACHARYA H, SAYI DS, BHARADWAJ AP, SINGHANIA M, SUGUNAN AP, ROY S. 2015. Changing patterns and widening of antibiotic resistance in *Shigella* spp. over a decade (2000-2011), Andaman Islands, India. *Epidemiol*

BLANCO, Marcos A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 803-809, 2013.

BLOM, A. M. The role of complement inhibitors beyond controlling inflammation. *Journal of internal medicine*, 2017, 282.2: 116-128.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 9, p. 449-55, Sep 2011. ISSN 1878-4380 (Electronic) 0966-842X (Linking).

BRAGA, M. E. M. et al. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 149-56, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas Integrativas e Complementares em saúde: uma realidade no SUS. *Revista Brasileira Saúde da Família*, Brasília, v. 9, n. especial, p. 70-76, maio, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. PORTARIA Nº 886, DE 20 DE ABRIL DE 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças

transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde.** Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL - RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014 - **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS : atitude de ampliação de acesso /** Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015.96 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Available at:<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf> Accessed at: 15 December 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos /** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume 1 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde,** Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Diarreicas Agudas,** Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BONKOUNGOU, Isidore Juste O., et al. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC pediatrics**, 2013, 13.1: 36.

BUCKLE, G.C. WALKER, C.L.; BLACK, R.E. Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. **J. Glob. Health.** 2012.

BÜHLER, H.F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S.M.A. da S.; HACON, S.S. Análise espacial de indicadores integrados determinantes da mortalidade por diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em regiões geográficas. **Ciência & Saúde Coletiva.** v. 19, n. 10, p.: 4131-4140, 2014.

BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G.; DAVIES, J.; EISENSTEIN, B.; HUOVINEN, P.; JACOBY, G.A.; KISHONY, R.; KREISWIRTH, B.N.; KUTTER, E.; et al. Tackling antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbiol.** 2011.

CAPALONGA, R., RAMOS, R.C., BOTH, J.M., SOEIRO, M.L., LONGARAY, S.M., HAAS, S.; TONDO, E.C. (2014) Salmonella serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 8: 811-817. DOI: 10.3855/jidc.3791.

CARDOSO, REBECA SALES. **Desenvolvimento de técnicas farmacêuticas para obtenção da droga vegetal a partir das folhas de erva-cidreira (Lippia alba (Mill.) N.E. Brown) quimiotipo II.** / Rebeca Sales Cardoso. – 2016.

CARVALHO, J. C. et al. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v.19, n.11, p. 946-50, 2005.

CASTRO, D. M. **Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de Lippia alba N.E.Brown Ex. Britt. & Wilson (Verbenaceae).** 132 p. Tese (Doutorado em Horticultura), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2.ed. Visconde do Rio Branco: UFV, 2004. 113 p.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Multistate Outbreak of Human Salmonella Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks (Final Update). Atlanta, Georgia: United States Department of Health and Human Service, CDC, 2015.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Centers for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases.** Acessado em Dezembro, 02, 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/shigella/fast-facts.html>

CERCA, Nuno, et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Research in microbiology**, 2005, 156.4: 506-514.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections.** Antibiotics in laboratory medicine, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLSI, C. A. L. S. I. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement.** CLSI M07-A8. Wayne, PA: 2015

COSTA, P. S. et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, p. 158-171, 2017.

CRAWFORD, R.W.; GIBSON, D.L.; KAY, W.W.; GUNN, J.S. Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. **Infect. Immun.** 2008, 76, 5341–5349.

CROSARA, D. P., et al. Tumor necrosis factor accounts for the neutrophil emigration activity released by cultured malignant fibrous histiocytoma cells. **Brazilian journal of medical and biological research**= 1995, 28.6: 671-678.

CRUMP JA, KRETSINGER K, GAY K, HOEKSTRA RM, VUGIA DJ, HURD S, SEGLER SD, MEGGINSON M, LUEDEMAN LJ, SHIFERAW B, et al. 2008. Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States foodnet multicenter retrospective cohort study. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:1278–1284.

CRUZ, C. B. et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 539697, 2014.

DA SILVA, R. E. R. et al. Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 792-798, 2018.

D'AOUST J, MAURER J. 2007. **Salmonella Species**, p 187-236. In Doyle M, Beuchat L (ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Third Edition. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555815912.ch10

DE AMORIM SANTOS, ISRAEL GOMES et al. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp.(Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 535-540, 2016.

DE OLIVEIRA, MARIA LIDUÍNA MAIA et al. Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 283-289, 2014

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology*, [S.l.], v. 11, p. 1-6, 1984.

DE SOUZA, RENILDE CORDEIRO et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 29-33, 2017.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010. ISSN 0378-8741.

DI DOMENICO, E.G.; FARULLA, I.; PRIGNANO, G.; GALLO, M.T.; VESPAZIANI, M.; CAVALLO, I.; SPERDUTI, I.; PONTONE, M.; BORDIGNON, V.; CILLI, L.; et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. **Int. J. Mol. Sci.** 2017, 18, 1077.

DINARELLO, C.A. **Eur. J. Immunol.** 37 (Suppl. 1), S34–S45 (2007).

DODOU, H. V., et al. Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* and synergistic effect on commercially available antibiotics. **Journal of applied microbiology**, 2017, 123.4: 853-860.

DUARTE, A.; FERREIRA, S.; SILVA, F.; DOMINGUES, F.C. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine** 2012.

EFFA, E. E. et al. Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever). **Cochrane Database Syst Rev** CD004530 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004530.pub4>, 2011.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY , EFSA-ECDC report for 2007: Salmonella remains most common cause of food-borne outbreaks, 2015.

ELTZSCHIG, H.K. & CARMELIET, P. N. **Engl. J. Med.** 364,656–665 (2011).

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agentes by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8m p. 1-7, 2003.

FATTORI, Victor; AMARAL, Flavio A.; VERRI JR, Waldiceu A. Neutrophils and arthritis: role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacological research**, 2016, **112**: 84-98.

FERDOUS, F. et al. Aetiology and clinical features of dysentery in children aged <5 years in rural Bangladesh. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 1, p. 90–98, 2014.

FHOGARTAIGH, C. NIC, Dance, D.A.B. Bacterial gastroenteritis, **Medicine** 41 (2013) 693-699.

FRANCESCHI, C. & CAMPISI, J. J. **Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.** 69 (Suppl. 1), S4–S9 (2014).

GARCÍA-FERNÁNDEZ A, GALLINA S, OWCZAREK S, DIONISI AM, BENEDETTI I, DECASTELLI L, et al. (2015) Emergence of Ciprofloxacin-Resistant Salmonella enterica Serovar Typhi in Italy. **PLoS ONE** 10(6): e0132065. doi:10.1371/journal.pone.0132065

GOBBO-NETO, L., & LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30(2), 374–381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. 2007

GOMES, V. B. Acompanhamento do uso do Elixir de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (erva-cidreira) como ansiolítico na atenção Psicossocial. 2014. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

GOMES, ANGÉLICA FERRAZ ET AL. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of Lippia alba. **Food chemistry**, v. 273, p. 186-193, 2019.

GONZALEZ-ESCOBEDO, G. & GUNN, J. S. Identification of Salmonella enterica serovar Typhimurium genes regulated during biofilm formation on cholesterol gallstone surfaces. **Infection and Immunity** 81, 3770–3780 (2013).

GONZALEZ-ESCOBEDO, G.; MARSHALL, J.M.; GUNN, J.S. Chronic and acute infection of the gall bladder by Salmonella Typhi: Understanding the carrier state. **Nat. Rev. Microbiol.** 2011, 9, 9–14.

GU B, CAO Y, PAN S, ZHUANG L, YU R, PENG Z, QIAN H, WEI Y, ZHAO L, LIU G, TONG M. Comparison of the prevalence and changing resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin of *Shigella* **Int. J. Antimicrob. Agents**. 2012; 40:9–17.

GUERRANT, Richard L., et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, 2013, 10.4: 220.

GUNN, J. S. et al. Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. **Trends in Microbiology** 22, 648–655 (2014).

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1983, 11.5: 427-433.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews microbiology**, 2004, 2.2: 95-108.

HARDY, S. P.; KOHLER, W. Investigating bacillary dysentery: the role of laboratory, technique and people. **Int J Med Microbiol**, v. 296, n. 4-5, p. 171-8, 2006.

HARRIS, F.; PHOENIX, D. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie**, v. 79, n. 4, p. 171-174, 1997. ISSN 0300-9084.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 238-243, 2012.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., & BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, & WEILL, F. X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the white–Kauffmann–Le minor scheme. **Research in microbiology**, 165(7), 526-530.

IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. **Nat. Immunol.** 5, 987–995

JENNISON, A. V., & VERMA, N. K. (2004). *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS microbiology reviews**, 28(1), 43-58.

JOOSTEN, L.A. et al. **Ann. Rheum. Dis.** 75, 1219–1227

JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extrato de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 36-38, 2003.

KAHSAY, A. G.; TEKLEMARIAM, Z. Prevalence of *Shigella* among diarrheic children under-5 years of age attending at Mekelle health center, north Ethiopia. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 788, 2015.

KAMPKE, Edgar Hell et al. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 59, p. 163-171, 2018.

KOTLOFF et al. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382:209–222. [https:// doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2).

KROGSTAD, DONALD J.; MOELLERING, R. C. Combinations of antibiotics, mechanisms of interaction against bacteria. *Antibiotics in laboratory medicine. The Williams & Wilkins Co., Baltimore*, 1980, 298-341.

KWIECIŃSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 4, p. 343-347, 2009. ISSN 0924-8579.

LAMBERTI, L. M. et al. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2705, 2014.

LEYVA-LÓPEZ, Nayely et al. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 187, p. 302-312, 2016.

LIVIO et al.. 2014. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clin Infect Dis* 59:933–941. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu468>.
3. Schroeder GN, Hilbi H. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.:

MACIEL, et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova** [online]. 2002, vol.25, n.3.

MACHADO, T.F. et al. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 699-705, 2014.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis.*, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010. doi: 10.1086/650733.

MALECH, Harry L.; GALLIN, John I. Neutrophils in human diseases. **New England Journal of Medicine**, 1987, 317.11: 687-694.

MATOS, F. J. A. **As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae).** Parte I Farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 72, p. 65-67, 1996.

MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M. **Guia Fitoterápico.** 2º Edição. Editora: UFC, Fortaleza-Ce, 2001.

MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, 2010, 140.6: 771-776.

MITIC-CULAFIC, D. et al. Different DNA extraction methods for paraffin-embedded pathological samples. **Iran J Pathol**, v.2, n.4, p. 159-164, 2007.

MOGASALE, V.; MASKERY, B.; OCHIAI, R.L.; LEE, J.S.; MOGASALE, V.V.; RAMANI, E.; KIM, Y.E.; PARK, J.K.; WIERZBA, T.F. Burden of typhoid fever in low-income and middle-income countries: A systematic, literature-based update with risk-factor adjustment. **Lancet Glob. Health** 2014, 2, e570–e580.

MONACK DM, MUELLER A, FALKOW S. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. **Nat Rev Microbiol**. 2:747–765.

MORAIS, L. A. S. de. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MORENO, Érika Marcela et al. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 225, 2018.

MOON, S.E.; KIM, H.Y.; CHA, J.D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Arch. Oral Biol**. 2011, 56, 907–916.

MWEU E, ENGLISH M. 2008. Typhoid fever in children in Africa. **Tropical medicine & International Health**. 13:532–540.

NATARO, J.P.; BOPP, C.A.; FIELDS, P.I.; KAPER, J.B.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK D. W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington: ASM Press, 2011. V. 1, Cap. 35, p. 603-26.

NETEA, MIHAI G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature immunology**, v. 18, n. 8, p. 826, 2017.

NIE H, YANG F, ZHANG X, et al. Complete genome sequence of *Shigella flexneri* 5b and comparison with *Shigella flexneri* 2a. **BMC Genomics** 2006;7:173.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **J Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 133-43, 2005.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checker board puts between them. **J. Antimicrob. Chemother**.2003, 52, 1.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 207-28, 2008. ISSN 0070-217X (Print) 0070-217X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453278> >.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. **Sem Immunopathol**. v. 34, n. 2, p. 201-214, March 2012.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 555-67, Aug 2009.

PACIELLO, I., SILIPO, A., LEMBO-FAZIO, L., CURCURÙ, L., ZUMSTEG, A., NOËL, G., ... & BERNARDINI, M. L. (2013). Intracellular *Shigella* remodels its LPS to dampen the innate immune recognition and evade inflammasome activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(46), E4345-E4354.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** **2010**, 140, 164–168

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PEIXOTO, M. G., COSTA-JÚNIOR, L. M., BLANK, A. F., LIMA, A. DA S., MENEZES, T. S.A., SANTOS, et al. (2015). Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 210, 118–122.

PEREIRA-DE-MORAIS, Luís et al. Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats. *Chemico-biological interactions*, 2018. GOMES, Angélica Ferraz et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 273, p. 186-193, 2019.

PETROPOULOS, S., FERNANDES, A., BARROS, L., CIRIC, A., SOKOVIC, M., & FERREIRA, I. C. F. R. (2018). Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. **Food**, **2018**.

PETTIT, R. K., et al. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2612–2617, 2005.

PORFÍRIO, E. M., MELO, H. M., PEREIRA, A. M. G., CAVALCANTE, T. T. A., GOMES, G. A., CARVALHO, M. G. D., ... & Júnior, F. E. A. C. (2017). In vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal**, 2017.

POSADAS, Inmaculada, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, 2004, 142.2: 331-338.

RATHAUR, Vyas Kumar, et al. Clinical study of acute childhood diarrhoea caused by bacterial enteropathogens. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, 2014, 8.5: PC01.

ROCHA, L. Q. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (Mill). N. E. Brown na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente.** 2012. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza-Ce, 2012.

ROMEIRO, R. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**: UFV Viçosa, 2007.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annual Reviews of Pathology*, v. 3, p. 99-126, 2008.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. *Informe Agropecuário*, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; DE SIMONI, C. **Fitoterapia na Saúde da Família. In: Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade (Org.)**. Programa de Atualização em Medicina de Família e Comunidade (PROMEF). Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2011. p. 31-65.

SADEGHI, H.; ZAREZADE, V.; SADEGHI, H.; TOORI, M.A.; BARMAK, M.J.; AZIZI, A.; GHAVAMIZADEH, M.; MOSTAFAZADEH, M. Anti-inflammatory activity of *Stachys pilifera* Benth. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 9, p. e19259, set. 2014

SATPATHY, S., SEN, S.K., PATTANAIK, S.; RAUT, S. Review on bacterial biofilm: A universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 7: 56–66. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.05.002, 2016.

SCAPINI, P., MARINI, O., TECCHIO, C. & CASSATELLA, M.A. **Immunol. Rev.** 273, 48–60 (2016).

SCHROEDER, G. N. & HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 134–156 (2008).

SHATTUCK, E.C. & MUEHLENBEIN, M.P. **Am. J. Phys. Anthropol.** 157, 1–18 (2015).

SHERWOOD, Edward R.; TOLIVER-KINSKY, Tracy. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 2004, 18.3: 385-405.

SHIN, S.; LIN, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **J Appl Microbiol**, v.97, n. 6, p. 1289-96, 2004.

SILVA, S. Conhecimento e uso de plantas medicinais em uma comunidade rural no município de Cuitegi, Paraíba, Nordeste do Brasil. 2014. 64 p. Monografia (Graduação em Licenciatura Plena em Geografia) – Centro de Humanidades, Universidade Federal da Paraíba, 2014.

SOUSA, M. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30-5, 2013.

SPRAGUE, R. S.; STEPHENSON, A. H.; ELLSWORTH, M. L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 9, p. 350-355, 2007. ISSN 1043-2760.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SU, L.; CHIU, C. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 2007, 30.3: 210.

SWEARINGEN MC, PORWOLLIK S, DESAI PT, MCCLELLAND M, AHMER BMM (2012) Virulence of 32 Salmonella Strains in Mice. *PLoS ONE* 7(4): e36043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036043>

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. de. Lippia alba: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada em Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 204-220, 2011.

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown.** 2009.139 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

TEIXEIRA, ANDRÉA BESSA. **Óleo essencial das folhas do quimiotipo II de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown: mecanismo de ação antimicrobiano em Staphylococcus aureus e atividade cicatrizante** / Andréa Bessa Teixeira. – 2015.

TEIXEIRA DE OLIVEIRA, GRAZIELA ET AL. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of Lippia alba Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural product research**, v. 32, n. 6, p. 723-731, 2018.

TEPLITSKI, Max; BARAK, Jeri D.; SCHNEIDER, Keith R. Human enteric pathogens in produce: un-answered ecological questions with direct implications for food safety. **Current Opinion in Biotechnology**, 2009, 20.2: 166-171.

THANH, Duy Pham et al. The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235, 2016.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of Lippia alba and Cymbopogon citratus essential oils on biofilms of Streptococcus mutans and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 749-754, 2016.

TREVISAN, M. T. S., MARQUES, R. A., SILVA, M. G. V., SCHERER, D., HAUBNER, R., ULRICH, C. M., et al. (2016). Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of Lippia species: Identification, quantitation and antioxidant capacity. **Records of Natural Products**, 10, 485–496.

TROFA, A. F. et al. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 5, p. 1303-6, 1999.

UNICEF - FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The state of the world's children 2014 in numbers: every child counts.** 2014.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, RJAEM. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2002, 68.4: 1561-1568.

USHIMARU P I. Estudo in vitro da atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. [Monografia] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 51p., 2007.

VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS- JUNIOR, J. G.; VIANA, G. S. B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p.709-714, 2002.

VÁSQUEZ, S. P. F.; DE MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v.44, n. 4, p. 457-472, 2014

VEECK, A. P. L. et al. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 93, n. 4, p. 955-960, 2012.

VINEGAR R, TRUAX JF, SELPH JL. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Federation Proc.** 1976;35(13):2447-57.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo X ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Universidade de Campinas. 2006.

WARD, P.A. J. **Innate Immun.** 2, 439–445 (2010).

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Princípios gerais no tratamento da inflamação.** In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. *Farmacologia clínica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 294-295.

WHO. World Health Organization. (2011) *The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges*. Geneva: WHO, 2011. 12p.

WHO. World Health Organization. (2015) *WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths - 2015*.

WHO. World Health Organization. (2014) *WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths - 2014*.

ZAIDI, Mussaret Bano; ESTRADA-GARCÍA, Teresa. *Shigella*: a highly virulent and elusive pathogen. **Current tropical medicine reports**, 2014, 1.2: 81-87.

ZHANG, J. et al. Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. from humans in Shanghai, China, 2004-2011. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 78, n. 3, p. 282-6, 2014.

ZHOU, K. et al. Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 817- 822, 2008.

ANEXO A – COMPROVANTE DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* em camundongos ", protocolada sob o CEUA nº 9876180618 *(in vitro)*, sob a responsabilidade de **Nadia Accioly Pinto Nogueira** e equipe; **ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/08/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* in mice", utilizing 77 Heterogenic mice (77 males), protocol number CEUA 9876180618 *(in vitro)*, under the responsibility of **Nadia Accioly Pinto Nogueira** and team; **ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 08/08/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2018** a **12/2019**

Área: **Departamento de Farmácia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **30 a 40 dias**

N: **77**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**


Local do experimento: As atividades serão desenvolvidas no **LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO E DO CÂNCER** sob supervisão do Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

Fortaleza, 08 de agosto de 2018

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A5E434F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A5E434F**
 Usuário: **Universidade Federal do Ceará**
 CPF/CNPJ: **07.272.838/0001-31**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Lippia alba

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE Lippia alba SOBRE BIOFILME DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS INFECÇÕES GASTROINTESTINAIS**


Equipe

NÁDIA ACCIOLY PINTO NOGUEIRA	Universidade Federal do Ceará
ANDRESSA HELLEN DE MORAIS BATISTA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HILANIA VALÉRIA DODOU	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
GLEILTON WEYNE PASSOS SALES	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
MATHEUS LIMA RODRIGUES	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PEDRO IGOR DE OLIVEIRA PEREIRA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Data do Cadastro: **12/08/2018 14:35:05**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **8:05 de 31/07/2018.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA – 2017

Journal of
Applied Microbiology

Original Article | Full Access

Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* and synergistic effect on commercially available antibiotics

H.V. Dodou , A.H. de Morais Batista, G.W.P. Sales, S.C. de Medeiros, M.L. Rodrigues, P.C.N. Nogueira, E.R. Silveira, N.A.P. Nogueira

First published: 26 July 2017 | <https://doi.org/10.1111/jam.13547>



molecules



Article

Antimicrobial Effects of Violacein against Planktonic Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus*

Andressa H. M. Batista ^{1,*} , Anne C. D. Moreira ¹, Rafael M. de Carvalho ¹, Gleilton W. P. Sales ¹ , Patrícia C. N. Nogueira ², Thalles B. Grangeiro ³ , Suelen C. Medeiros ³, Edilberto R. Silveira ² and Nádia A. P. Nogueira ¹

NJC



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)


Cite this: *New J. Chem.*, 2017, 41, 13085

A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity†

José Marcos da Silveira Carvalho, ^a Andressa Hellen de Morais Batista, ^b Nádia Accioly Pinto Nogueira, ^b Alda Karine Medeiros Holanda, ^a Jackson Rodrigues de Sousa, ^a Dávila Zampieri, ^a Maria Júlia Barbosa Bezerra, ^c Francisco Stefâncio Barreto, ^c Manoel Odorico de Moraes, ^c Alzir A. Batista, ^d Ana Cláudia Silva Gondim, ^a Tercio de F. Paulo, ^a Luiz Gonzaga de França Lopes ^a and Eduardo Henrique Silva Sousa ^{a*}

ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA – 2018





ELSEVIER

Biochimie

Volume 149, June 2018, Pages 9-17

Research paper

Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity *in vitro* and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice

Adson A. Souza ^a, Andrea S. Costa ^a, Dyély C.O. Campos ^a, Andressa H.M. Batista ^b, Gleilton W.P. Sales ^b, Nádia A.P. Nogueira ^b, Keila M.M. Alves ^c, Andreлина Noronha Coelho-de-Souza ^d, Hermógenes D. Oliveira ^a  





Scientia
Pharmaceutica



Article

Modulatory Effect of *Lippia alba* Essential Oil on the Activity of Clinically Used Antimicrobial Agents on *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* Biofilm

Andressa Batista ^a , Hilania Dodou, Matheus Rodrigues, Pedro Pereira, Gleilton Sales ^b , Suelen Medeiros and Nádia Nogueira

Clinical Department of Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza 60356000, Brazil; valeriadodou@gmail.com (H.D.); matthew.lima.rodrigues@gmail.com (M.R.); pedroigordeoliveira@gmail.com (P.P.); gleilton@hotmail.com (G.S.); sumedeiros86@gmail.com (S.M.); acciolyufc@gmail.com (N.N.)

* Correspondence: andressahellenufc@yahoo.com.br; Tel.: +55-85-3366-8267

