



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL**

JANYKETCHULY DE SOUSA CRISTO ALVES

**PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS E DAS
FOLHAS DE *AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS (MELIACEAE) E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS E
CARBAPENEM**

**JUAZEIRO DO NORTE – CEARÁ
2017**

JANYKETCHULY DE SOUSA CRISTO ALVES

PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS E DAS FOLHAS
DE *AZADIRACHTA INDICA A. JUSS* (MELIACEAE) E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS E CARBAPENEM

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho.

JUAZEIRO DO NORTE – CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Alves, Janyketchuly de Sousa Cristo.

Perfil fitoquímico do extrato etanólico das cascas e das folhas de *Azadirachta INDICA A. Juss* (Meliaceae) e atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos e carbapenem [recurso eletrônico] / Janyketchuly de Sousa Cristo Alves. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 GB pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 65 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Juazeiro do Norte, 2017.

Área de concentração: Biotecnologia.
Orientação: Prof.¹ Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.
Coorientação: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho.

1. Mecanismo de ação. 2. Multirresistência. 3. Potencialização. I. Título.

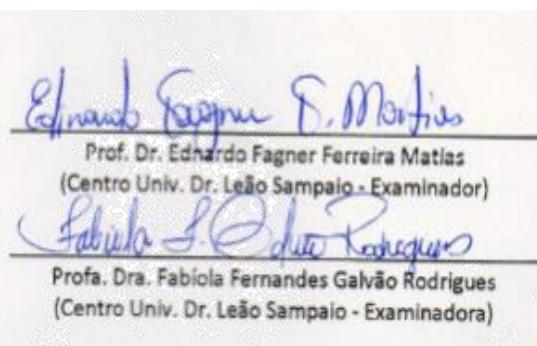
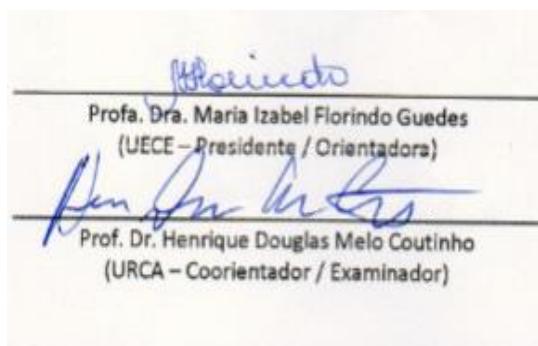
JANYKETCHULY DE SOUSA CRISTO ALVES

PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS E DAS FOLHAS
DE *AZADIRACHTA INDICA A.* JUSS (MELIACEAE) E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS E CARBAPENEM

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 18 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA



À minha mãe, Eunice Celsa de Sousa
Cristo, e aos meus irmãos sempre
dispostos a me apoiarem, Julierme de
Sousa Cristo e Jenyemerson de Sousa
Cristo, por me darem forças e em todas
as minhas escolhas se fazerem sempre
presentes.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, minha base e força maior e grande responsável de todas as coisas, obrigado Senhor por me dar forças e equilíbrio psicológico quando precisei, por me acompanhar em meus caminhos!

A minha mãe, Eunice Celsa de Sousa Cristo que amo e admiro tanto, meu exemplo de vida. Ao concluir essa etapa sei que estarei te dando tal orgulho, pois queria a senhora a oportunidade de estudar e vencer como eu, mas o teu amor de mãe preferiu ver o meu crescimento, lutando comigo e conquistando um dos meus sonhos, não se constrói o que se deseja sozinho, digo com toda certeza que vencemos juntas, e que esse sonho é tão meu quanto seu, obrigada pelo amor incondicional, um dia quando for mãe irei entender toda a sua graça, pois agraciada é aquela que me fez aprender todas as melhores fases da minha vida ! Te amo muito!

Aos meus irmãos, Julierme Cristo e Jenyemerson Cristo pela força, carinho e incentivo! Amo vocês!

A toda minha família, especialmente minha tia Raimunda da Conceição que me apoia nas minhas escolhas e me dá toda atenção e carinho, meus avós João Miguel e Celsa da Conceição, sou eternamente grata pelo carinho e acolhida sempre que dou um jeitinho de fazer aquela visita rápida em sua morada, por serem meus pais de coração, agradeço essa vitória também a vocês meus amores!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Henrique Douglas, pela paciência comigo, por me ensinar a “lutar pelos meus objetivos esquecendo um pouco dos meus medos”, pelo otimismo e incentivo! Obrigada pelo voto de confiança. Agradeço pela pessoa que és e tenho eterna gratidão pelos ensinamentos, dedicação, por saber elogiar e criticar do jeito certo e na hora certa. Obrigada por tudo meu querido.

Ao meu professor e amigo, Dr. Edinardo Fagner, por ter me recebido com toda boa vontade e atenção, para todas as horas que precisei, tanto no período da graduação como até aqui. Só tenho a agradecer por você se fazer presente, mesmo sendo tão ocupado sempre deu seu jeito para contribuir, muito obrigada de coração.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia da URCA, pelo incentivo e toda a ajuda para os procedimentos do meu projeto, pelo imenso auxílio nos ensaios microbiológicos, pelo encorajamento transmitido e pela amizade que construímos!

Ao Prof. Dr. Francisco Cunha e sua aluna Joycy Sampaio, pela grande ajuda com os extratos e pelas sugestões de artigos e todo material didático como ferramenta de pesquisa, sou muito grata!!!

Aos meus amigos Geraldo Júnior e Nara Luana, que estiveram presentes em todos os momentos dessa jornada de dificuldades, muito trabalho e bons momentos, juntos nas nossas idas e voltas à Fortaleza para a UECE em busca de nossos sonhos, com todo zelo, carinho, trabalhamos, nos ajudamos, rimos e choramos, agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha caminhada, obrigada!

Ao meu amigo Pedro Everson, sou grata pelo apoio e toda a força que tem me dado até aqui, você se fez tão presente mesmo estando em outra cidade, mas nunca negou ajuda sempre que precisei, sem você tirando minhas dúvidas e me encorajando quando tudo parecia difícil e quase impossível, eu não teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada meu anjo!

A minha mais nova amiga Najla Ferreira, a quem eu tive o privilégio de conhecer durante esse período na UECE, você também se fez presente em todos os momentos nessa caminhada, com esse seu jeito doce, engraçado, brincalhona, profissional, e todas as demais qualidades que não caberia aqui pra falar sobre você. Obrigada por tudo minha querida!

Aos demais colegas do mestrado pela ótima convivência, receptividade e pelos momentos de descontração e amizade! Aos professores da UECE e a coordenação e aos demais membros da instituição, em especial, ao professor NUNES, pessoa fundamental na realização do nosso mestrado profissional, obrigada por receber o pessoal do CARIRI como o mesmo se referia com todo carinho e atenção, que Deus o abençoe hoje e sempre!

Obrigada também, ao meu antigo patrão, Dr. Luciano Nobrega, por todo o apoio e compreensão, por todas as vezes que precisei me ausentar do trabalho para comparecer a UECE, sem a sua força e a oportunidade a que me foi dada, em me deixar fazer parte de sua equipe, eu não teria conseguido chegar até aqui. Não poderia deixar de agradecer também, a toda minha equipe Clinivitta, do meu atual emprego, melhor dizendo, minha segunda família, pelo carinho, motivação e apoio em todos os momentos e fases da minha trajetória, pessoal, profissional e de estudo. Amo vocês! Só Deus sabe o quanto foi difícil, quantas barreiras enfrentei, mas eu consegui, e devo primeiramente a Deus, deixo aqui o meu muito obrigada!

RESUMO

O surgimento de linhagens bacterianas resistentes bem como o desenvolvimento de efeitos colaterais significativos de drogas antibacterianas tornou urgente o desenvolvimento de pesquisas para a identificação de novos compostos antibacterianos bioativos. *Azadirachta indica* é uma espécie de planta popularmente conhecida como "nim". Esta planta é de origem Sudeste Asiático, e é amplamente encontrada na África, Austrália e nas Américas. Tem sido relatado que apresenta uma ação inseticida, que diferentes tipos de pragas. O objetivo do estudo foi avaliar o perfil fitoquímico e o potencial antibacteriano e modulatório dos extratos etanólicos obtidos da casca e das folhas de *A. indica* contra bactérias padrão e multirresistentes. Os extratos foram testados isoladamente e ou em combinação com antibióticos, aminoglicosídeos e carbapenêmicos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* usando o método de microdiluição em caldo (BHI). A associação entre antibióticos e extratos de *A. indica* apresentou efeitos sinérgicos e ou antagônicos, o que pode ser devido à diversidade de metabólitos encontrados na planta. Entre estes metabólitos, através do metodo de HPLC, foram detectados e quantificados como quercetina, kaempferol e cumarina considerados como constituintes principais e os demais foram, ácido gálico, catequina e ácido clorogênico. Nesse sentido, *A. indica* modulou a atividade de antibióticos contra linhagens bacterianas multirresistentes e padrão, do tipo GRAM positivas e GRAM negativas, testadas na modulação apenas as multirresistentes e para a MIC, foram utilizadas as bactérias do tipo padrão, que podem envolver múltiplos mecanismos de ação antimicrobiana, o que resultou em uma potencialização da atividade antibacteriana dos antibióticos testados que eram linhagem e fármaco dependentes.

Palavras-chave: Mecanismo de ação. Multirresistência. Potencialização.

ABSTRACT

The emergence of resistant bacterial strains as well as the development of significant side effects of antibacterial drugs have made it urgent to develop research for the identification of novel bioactive antibacterial compounds. *Azadirachta indica* is a species of plant popularly known as "neem". This plant is of Southeast Asian origin, and is widely found in Africa, Australia and the Americas. It has been reported that presents an insecticidal action, which different types of pests. The objective of the study was to evaluate the phytochemical profile and the antibacterial and modulatory potential of the ethanolic extracts obtained from the bark and leaves of *A. indica* against standard and multiresistant bacteria. The extracts were tested either alone or in combination with antibiotics, aminoglycosides and carbapenems against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using the broth microdilution method (BHI). The association between antibiotics and extracts of *A. indica* showed synergistic and / or antagonistic effects, which may be due to the diversity of metabolites found in the plant. Among these metabolites, through the HPLC method, quercetin, kaempferol and coumarin were considered as main constituents and the others were gallic acid, catechin and chlorogenic acid. In this sense, *A. indica* modulates the activity of antibiotics against multiresistant and standard bacterial strains of the GRAM-positive and negative-GRAM types, tested in the modulation only of the multiresistants and the MIC, standard type bacteria were used, which may involve multiple mechanisms Of antimicrobial action, which resulted in a potentiation of the antibacterial activity of the tested antibiotics that were lineage and drug dependent.

Keywords: Mechanism of action. Multiresistance. Potentialization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A espécie <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	18
Figura 2 -	Folhas e flores da espécie <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	19
Figura 3 -	Fruto da espécie <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	20
Gráfico 1 -	Perfil de cromatografia líquida (HPLC) representativo de extrato hidroetanólico de <i>A.indica</i>.....	31
Gráfico 2 -	Extrato etanólico das cascas de <i>A. indica</i> (EHCAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de <i>P. aeruginosa</i>.....	33
Gráfico 3 -	Extrato etanólico das folhas de <i>A. indica</i> (EHFAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de <i>P. aeruginosa</i>.....	34
Gráfico 4 -	Extrato etanólico das cascas de <i>A. indica</i> (EHCAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>.....	35
Gráfico 5 -	Extrato etanólico das folhas de <i>A. indica</i> (EHCAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

≈	Aproximadamente
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
CE	Estado do Ceará, Brasil
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM/8	Concentração Subinibitória
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	<i>Escherichia coli</i>
EEFAI	Extrato etanólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i>
EECAI	Extrato etanólico das cascas de <i>Azadirachta indica</i>
HIA	<i>Heart Infusion Agar</i>
Mm	Milimol
P	Nível de significância
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC/MI	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
URCA	Universidade Regional do Cariri

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	GERAL.....	16
3.2	ESPECÍFICOS.....	16
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
4.1	PRODUTOS NATURAIS E MEDICINA POPULAR.....	17
4.2	AZADIRACHTA INDICA.....	18
4.3	O USO DE AZADIRACHTA INDICA NA MEDICINA POPULAR.....	20
4.4	BACTÉRIAS.....	21
4.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	21
4.4.2	<i>Escherichia coli</i>.....	22
4.4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	22
4.5	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	23
4.6	AMINOGLICOSÍDEOS.....	24
4.7	CARBAPENENS.....	24
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	MATERIAL.....	26
5.2	MICRORGANISMOS E MEIO DE CULTURA.....	26
5.3	DROGAS UTILIZADAS.....	27
5.4	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA.....	27
5.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	27
5.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC.....	28
5.6.1	HPLC-DAD.....	28
5.6.2	Límite de detecção (Iod) e limite de QUANTIFICAÇÃO (LOQ).....	29
5.7	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	29
5.8	MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE AMINOGLICOSÍDEOS E CARBAPENEM.....	29
5.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1	ANÁLISE POR HPLC.....	31

6.2	MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA.....	32
7	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXOS.....	45
	ANEXO A – Artigo publicado.....	46
	ANEXO B – Guia para Autores do Periódico <i>Industrial Crops and Products (print)</i>.....	52

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais, conhecidas como fitoterápicos, são composições de origem vegetal que possuem suas variáveis atividades agindo de forma paliativa ou curativa. Os fitoterápicos são combinações a partir de uma grande e variada mistura de constituintes da planta, preparados de acordo com as orientações devidamente adequadas para o procedimento (DI-STASI, 2007). Geralmente, as combinações fitoterápicas podem ser usadas em diversas apresentações farmacêuticas como cápsula, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidro alcóolicas e infusões, conhecidas popularmente por chás (FRANCISCO, 2010).

Com base nos conhecimentos fitoterápicos de produtos naturais, a anos vêm sendo utilizados em associação com antibióticos ou de forma isolada, dependendo de seu mecanismo de ação, podendo combater ou tratar diferentes tipos de patologias, da mesma forma que está sendo realizado o uso de antibióticos comerciais de forma combinada, mostrando ser eficiente para o combate da resistência bacteriana (MIRAND; ZEMELMAN, 2002; SEYFRIED *et al.*, 2010).

O avanço da tecnologia associada à problemática do surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais, fez com que a pesquisa científica buscasse novas substâncias de origem natural, com eficácia superior ou igual aos da terapêutica usual (OESTERHELT *et al.*, 2005).

A resistência bacteriana representa um alvo relevante das mais atuais publicações sobre antimicrobianos. É uma das principais causas de emergência das doenças infecciosas e do aumento da mobilidade, mortalidade e custos em saúde, decorrentes da redução das opções terapêuticas eficazes contra os microrganismos resistentes. O aumento de resistência bacteriana aos antibióticos comumente utilizados é um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos (SILVA, 2008).

Neste contexto, o uso de substâncias de origem natural, principalmente de origens vegetais, pode promover efeitos similares aos tratamentos atualmente empregados. A *Azadirachta indica* (A. Juss), conhecida como nim ou margosa, se apresenta com propriedades terapêuticas, principalmente em seu uso como inseticida, podendo ser eficaz para a prevenção contra pragas, seja em cultivo agronômico ou agroquímico, além de combater até 430 diferentes tipos de pragas

(MARTINEZ, 2002). Além disto, existem relatos de seu uso como antisséptico, vermífugo, tônico e para o tratamento da diabetes e atuação de toxicidade (WINKALER *et al.*, 2007).

Tendo em vista o uso popular dos diferentes tipos de atividades biológicas, de acordo com os registros na literatura, esse estudo teve como propósito avaliar o perfil fitoquímico pelo método de HPLC e atividade *in vitro* antibacteriana e moduladora dos extratos da casca e da folha de *Azadirachta indica* na inibição do crescimento dos microrganismos multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, espécies envolvidas na etiologia de infecções bacterianas, e verificar efeitos sinérgicos e ou antagônicos na associação dos extratos com antibióticos das classes dos aminoglicosídeos e carbapenem.

2 JUSTIFICATIVA

O uso indiscriminado de antibióticos vem demonstrado relação com a resistência de diversos tipos de bactérias aos mesmos. Isso se deve à seleção natural promovida pelos antibióticos, selecionando aqueles indivíduos mais fortes e resistentes, levando à mutação das bactérias e tornando as substâncias presentes nos antibióticos inviáveis para uso clínico frente a diferentes agentes etiológicos.

Muitas substâncias presentes nas plantas como flavonoides e terpenos, têm demonstrado uma significativa relevância, no sentido de potencialização pelo uso de antibacterianos na resistência das bactérias aos mesmos, o que significa que quando utilizados e ou em associação com extrato de origem vegetal, podem provocar efeitos mais abrangentes e eficazes.

Assim, o estudo das diversas plantas de diferentes tipos de origem, tem fundamental importância para o descobrimento de novas substâncias antibacterianas, que por fim podem ser usadas para pesquisas in vitro e dependendo do conhecimento sobre o grau de toxicidade da planta, sendo possível ter interesse clínico após testes que comprovem se há atuação de forma segura para a clínica médica, como também para contribuir com os estudos nessa área, que são bastante exploradas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar o Perfil Fitoquímico do Extrato Etanólico da Casca e das Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) e atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos e carbapenem.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Obter extratos das cascas e das folhas de *Azadirachta indica* e identificar seus principais metabólitos secundários pelo método de HPLC;
- b) Verificar a concentração inibitória mínima do extrato obtido a partir da casca e das folhas de *Azadirachta indica*, pelo método CIM;
- c) Verificar o efeito modulador da resistência bacteriana à aminoglicosídeos e carbapenem a partir dos extratos da casca e das folhas de *Azadirachta indica*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 PRODUTOS NATURAIS E MEDICINA POPULAR

O uso de produtos naturais iniciou-se há vários anos, eram utilizados pelos povos como forma alternativa ou complementando os medicamentos sintéticos, sendo importantes na saúde mundial (SOUSA *et al.*, 2008).

Muitas comunidades possuem como único recurso terapêutico e medicinal o conhecimento tradicional. De acordo com o ministério da saúde, o conceito de saúde é um estado de equilíbrio espiritual, de convivência comunitária e ecológica, o que explica provavelmente a inclusão de produtos naturais em sistemas de cura tanto de remédios para cura física, quanto para a melhoria e fortalecimento do bem-estar. Plantas e medicamentos podem ser efetivos não apenas em função de sua ação farmacológica, mas em função do significado cultural que lhes é atribuído (HOEFFEL *et al.*, 2011).

O uso de produtos naturais vem contribuindo para resultados relevantes em tratamentos terapêuticos (FIGUEREDO *et al.*, 2013). Uma das formas mais conhecidas de aproveitamento da biodiversidade é o preparo tradicional de fitoterápicos. A utilização de plantas em medicina tradicional deriva da cultura intrínseca e do folclore de cada sociedade. Com o desenvolvimento de novas tecnologias foi possível o estudo mais aprofundado dessas plantas, isolando substâncias responsáveis pelo seu efeito farmacológico e assim criando drogas com o princípio ativo purificado e melhorado (LEANDRO *et al.*, 2013; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001).

O Brasil e outros países, com apoio da Organização Mundial de Saúde, estão resgatando a medicina popular. Muitas ervas têm uso milenar, existindo citações de várias em papiros do antigo Egito. Atualmente, encontra-se facilmente em jornais, revistas e também em publicações da área da saúde uma variada gama de artigos sobre plantas medicinais, que estão sendo utilizadas, cada vez mais, com respaldo científico (MAIA, 2011).

Os extratos produzidos a partir de plantas, além de serem utilizados no controle de variadas patologias, são usados também a fim de combater doenças na agricultura, no tratamento e controle de pragas. Atualmente, diferentes fórmulas à base de extratos vegetais, com componentes químicos identificados e ação biológica

ativa, já vêm sendo usadas de forma comercial (MIRAND; ZEMELMAN, 2002; SEYFRIED *et al.*, 2010).

4.2 AZADIRACHTA INDICA

Azadirachta indica A. Juss (Fig. 1), conhecida popularmente como nim, possui origem no sudeste da Ásia e, tal como a adaptação, é bastante encontrada na África tropical e subtropical, bem como na Austrália e América. A *Azadirachta indica* A. Juss é pertencente da família Meliaceae e compreende 50 gêneros que são distribuídos em todo o mundo (JOLY, 2002; SCHULTZ, 1994).

Figura 1 – A espécie *Azadirachta Indica* A. Juss



Fonte: Elaborada pela autora.

São tipos de plantas de característica arbórea; suas folhas (Fig. 2) têm o formato alongado e de cor verde claro bem vivo; suas flores são pequenas em inflorescência e são hermafroditas; seus frutos são secos e geralmente as sementes

apresentam arilo ou são de forma aladas, com característica de simetria radial (SCHULTZ, 1994; JOLY 2002).

Figura 2 – Folhas e flores da espécie *Azadirachta Indica A. Juss*



Fonte: Elaborada pela autora.

No Brasil existem variadas espécies, destacando-se os gêneros *Cabralea*, *Cedrela*, *Guarea*, *Trichilia*, *Melia* e *Azadirachta*. O gênero *Azadirachta*, conhecido popularmente como “nim”, possui apenas uma espécie – *Azadirachta indica A. Juss*. O comprimento da mesma é de 10 a 20 metros de altura, possuindo tronco de cor marrom escuro e bastante resistente. Suas folhas são verde claro intensa e estão organizadas de forma aglomeradas e alternadas, sua flores (Fig. 2 e 3) são brancas com o tom creme claro, não possuem cheiro e seu fruto é verde claro e possui um bago arredondado (SODEPAZ, 2006).

Figura 3 – Fruto da espécie *Azadirachta Indica A. Juss*



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 O USO DE AZADIRACHTA INDICA NA MEDICINA POPULAR

Azadirachta indica pode vir a ser usada no controle de variadas patologias, dentre elas o diabetes, evitando assim o uso da metformina, fármaco indicado no tratamento dessa doença (CHANDRA *et al.*, 2007; MAHDI *et al.*, 2003). O extrato desse vegetal tem ação hipoglicêmica, ou seja, provoca diminuição da glicemia plasmática (DAVI *et al.*, 2006).

A planta possui ação inseticida para inúmeras espécies de pragas. Um de seus compostos, a azadiractina que possui atividade tóxica, atuando contra insetos (BRUNETON, 1995).

Os lepidópteros, conhecidos como uma variada ordem de insetos diversificados, como as borboletas, são insetos mais sensíveis às substâncias derivadas do nim. Esse efeito tem sido particularmente demonstrado em condições de laboratório para várias espécies, sendo assim, os lepidópteros são os mais frágeis à ação derivada do Nim (SCHMUTTERER, 1990; SIMMONDS, 1989).

Segundo a literatura, a *Azadirachta indica* é conhecida há 5.000 anos e apresenta, além das já citadas, ação contra mais de 430 tipos de pragas que ocorrem em diversos países. Seus efeitos são: (a) repelência, impedindo todos os processos fisiológicos dos insetos (ISMAM *et al.*, 1990); (b) inibição da fertilização dos insetos, prevenindo o surgimento de pragas ou exterminando os possíveis causadores; (c) atividade antiviral; (d) atividade antibacteriana; (e) atividade antifúngica; (f) atividade antiinflamatória; (g) atividade antisséptica; (h) atividade antiúlcera; e (i) atividade antitumoral (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY, 1997; DASGUPTA *et al.*, 2004; HARIKRISHMAN; RANI; BALASUNDARAM, 2003; KUMAR *et al.*, 2006; MARTINEZ, 2002; MARTINEZ, 2002).

4.4 BACTÉRIAS

4.4.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias Gram-positivas, da família micrococcaceae. Geralmente estão dispostas em aglomerados como cachos de uva ou de forma desordenada. Sua parede celular é composta por uma camada espessa de peptideoglicano. Atualmente são descritas 32 espécies, algumas estão presentes na flora normal da pele e outras de origem exógena. Dentre essas espécies, cinco são responsáveis por produzir a coagulase, uma enzima extracelular, que levam a denominação de estafilococos coagulase positiva (ECP). É a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (SILVA; GANDRA, 2004).

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos. É a espécie de maior interesse clínico, principalmente em ambiente nosocomial. Portadores e pacientes contaminados por *S. aureus* na mucosa nasal são avaliados como fatores de risco para manifestação de infecções frequentemente relacionada em seres humanos (FRIDKIN, 2001; LOWY, 1998; NAIMIN *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

Em 1997 e em 2002, foi isolado o primeiro *S. aureus* apresentando característica de resistência aos glicopeptídeos (GISA) constatando o surgimento de cepas resistentes, foram descritas ainda em maio de 2004, três linhagens portadoras

do gene *vanA*, responsáveis por resultar nesse perfil de resistência (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

4.4.2 Escherichia coli

O gênero *Escherichia* é composto por bactérias Gram-negativa, pertencente à flora normal do intestino humano, podendo contaminar e em seguida causar infecções extra intestinais. É um dos principais agentes etiológicos de infecção no trato urinário. Esse microrganismo é um dos agentes que apresenta alta capacidade para ampliar resistência, principalmente dentre as variadas amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC). É um agente etiológico causador da diarreia neonatal. Sua presença é benéfica por auxiliar na produção de certas vitaminas e por promover a quebra de alimentos não digeríveis (KAZMIRCZAK; GIOVELLI; GOULART, 2005).

É conhecido como o microrganismo mais frequente na microbiologia, sendo de grande importância na área da pesquisa. Ainda que não seja classificado como um microrganismo de caráter patogênico, a *E. coli* é a grande principal causadora das infecções urinárias (TORTORA; FUNKE; CASE, 1998).

Em geral, a infecção exibe evolução de forma rápida e sintomas típicos como diarreia severa, desidratação e, em alguns casos, pode levar o indivíduo à morte. A *E. coli* é um tipo de bactéria indicadora de contaminação fecal. Geralmente esse tipo de espécie é avaliada na qualidade sanitária e também para avaliação da qualidade da água. Existem relatos de grande incidência de doenças gastrintestinais em banhistas de áreas recreativas (WADE *et al.*, 2010).

4.4.3 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno hospitalar frequente, uma bactéria do tipo oportunista que se manifesta em qualquer órgão do corpo humano, principalmente em pacientes imunocomprometidos, resultando em infecção generalizada. Está bem distribuída e é capaz de persistir por muitos períodos em ambientes variados e desencadear resistência a agentes antimicrobianos (GALES; REIS; JONES, 2001).

Como a *P. aeruginosa* é uma das principais causadoras de infecções pulmonares crônicas em pacientes já debilitados e que apresentam complicações como fibrose cística, aumentando assim a gravidade do quadro clínico. A resistência desse patógeno se dá pela barreira que esse microrganismo adquire ao formar biofilmes que o protegem contra a ação dos antibióticos, aumentando assim sua resistência (SINGH *et al.*, 2000). A matriz desse biofilme é constituída por diferentes proteínas e exopolissacarídeos que são sintetizados por diferentes tipos de genes (DRENKARD, 2003).

A *P. aeruginosa* é resistente à desinfetantes, antibióticos, à radiação UV, e a outros protozoários e predadores, além de possuir uma matriz bastante hidratada que dificulta a eliminação do patógeno (ELASRI; MILLER 1999; XAVIER *et al.*, 2003).

4.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O uso constante e indiscriminado de diversos tipos de antibióticos tem determinado o aumento de resistência bacteriana em todo o mundo, interferindo na terapia medicamentosa, o que atrapalha no tratamento das infecções bacterianas. A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (KADOSAKI *et al.*, 2012).

Cada vez mais tem se observado o aumento da resistência de muitas bactérias a uma variedade de drogas, principalmente em ambiente hospitalar. O fato é bastante preocupante pois gera custos maiores, cuidados especiais à saúde, e eleva as chances de óbito. Devido à resistência bacteriana, as taxas de mortalidade aumentam exponencialmente (CARNEIRO, 2006; DIAS; MONTEIRO, 2010).

Atualmente, a resistência bacteriana adquirida pelos antibióticos é considerada um grave importante problema em principal para ambiente hospitalar. Hoje é possível ressaltar que existem três principais formas de causas para resistência bacteriana, podendo ser envolvidas nas infecções hospitalares. A primeira é o uso excessivo de antibacterianos nos hospitais. Anão realização de assepsia para controlar infecção hospitalar, como por exemplo a lavagem das mãos. Bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no

tratamento de infecções, havendo a necessidade premente de se encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas (NEUSA *et al.*, 2004).

4.6 AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos são compostos por um grande número de moléculas, organizadas por classes. Sua estrutura apresenta núcleo aminociclitol (estreptidina ou 2-desóxiestreptamina). Os medicamentos dessa classe são do tipo bactericida. O primeiro aminoglicosídeo foi isolado de *Streptomyces griceus* em 1944 (JANA; DEB, 2006).

Desde 1940 os aminoglicosídeos são considerados de importância terapêutica para o combate de diversas infecções bacterianas. Logo após, outros estudos foram realizados afim de avaliar a ação terapêutica em outros patógenos como os actinomicetos encontrado no solo (TAVARES, 2001).

Os aminoglicosídeos têm como função a inibição da síntese proteica das bactérias, impedindo que ocorra o ligamento a 20 subunidades do ribossomo 30s, resultando em interrupção do processo de tradução e causando a morte programada do microrganismo (KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000). A inibição na tradução das bactérias pode ainda ocorrer pela ação de algumas enzimas, classificadas como APH (fosfotransferases), AAC (acetiltransferase) e ANT (nucleotidiltransferase) (JANA; DEB, 2006).

4.7 CARBAPENENS

Carbapenens são os antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos. São utilizados para o tratamento de infecções hospitalares graves causadas, muitas vezes, por bactérias multirresistentes. São fármacos cruciais na prevenção e tratamento de infecções potencialmente fatais que são geralmente associadas a técnicas executadas na medicina moderna, tais como, transplantes de órgãos, hospitalizações em Unidade de Terapia Intensiva, como também nos procedimentos cirúrgicos (NORDMANN *et al.*, 2011).

Carbapenens possuem um grande espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e gram-negativas, incluindo espécies bacterianas anaeróbias. Devido a sua estabilidade frente às β-lactamases, enzimas frequentemente

detectadas em enterobactérias, os carbapenens apresentam alta eficácia no controle de infecções causadas por enterobactérias quando comparados a outros β -lactâmicos (NICOLAU, 2008).

Os carbapenens são estáveis frente à β -lactamase, poucos reativos, podendo ser usados em associação com outras substâncias antibacterianas. Alguns bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose, mico bactérias e *Staphylococcus* resistentes à oxacilina são resistentes também aos carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem). Estes antibióticos sofrem hidrólise renal por ação de enzimas hidrolíticas, que devem ser neutralizadas por uso de inibidores (Cilastina Sódica) (ZHANEL *et al.*, 2009).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Todos os produtos químicos foram de grau analítico. Foram utilizados: acetonitrila, ácido fórmico, ácido gálico e ácido clorogênico (Merck, Darmstadt, Alemanha), catequina, cumarina, queracetina, quercitrina, rutina e canferol luteolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi realizada com um sistema *Shimadzu Proeminence Auto Sample* (SIL-20A; Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com bombas de rotação alternada Shimadzu LC-20AT, conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com um integrador CBM 20A, a um detector por arranjo de diodos SPD-M20A e uma solução 1,22 SP1 LC software.

5.2 MICRORGANISMOS E MEIO DE CULTURA

Os microrganismos que foram utilizados nos testes foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA. As linhagens utilizadas foram do tipo padrão (CIM), com as espécies de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

Para avaliar a atividade modulatória dos produtos naturais foram utilizados os seguintes isolados bacterianos multirresistentes: SA10 (*S. aureus*); PA03 e PA 24 (*P. aeruginosa*) e EC06 (*E. coli*).

Todas as cepas foram estocadas em ágar BHI sob refrigeração, de forma a conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

As cepas utilizadas foram mantidas em meio de cultura *Heart Infusion Agar-HIA* (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) que antes dos testes tinham as células cultivadas por 24 horas a 35 °C em meio *Brain Heart Infusion - BHI* (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante, no caso do BHI, a concentração indicada foi de 10%, sendo em seguida auto clavados.

5.3 DROGAS UTILIZADAS

As drogas antibacterianas utilizadas nos testes foram da classe dos aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina) atuando diretamente no ribossomo da bactéria; e o antimicrobiano Imipenem da classe dos carbapenem, atuando na parede celular da bactéria.

5.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

O material botânico foi coletado no Horto de Plantas Medicinais, do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri – URCA, localizado a 07°14'19,2" de latitude Sul e 07°14'19,2" de longitude Oeste. Uma exsicata foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima sob o número 10.787 e identificada pela curadora daquele herbário Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva como pertencente à espécie: *Azadirachta indica* A. Juss, da família Meliaceae.

5.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO

As folhas e as cascas foram coletadas as 09:00 horas ± 30 minutos, reduzidas em pedaços de aproximadamente 1 cm² e imersas em etanol P.A. por 72 horas, após este período o extrato foi filtrado e o líquido foi destilado em rotaevaporador (marca Fisaton) para evaporação do etanol. Após este procedimento, o material foi colocado em banho Maria (marca Quimis) a 60 °C para evaporação da água. Uma vez obtido, o extrato foi liofilizado (marca Liotop, modelo L101) e em seguida o extrato foi acondicionado em vidro âmbar. O rendimento do extrato em relação à matéria verde foi de 4,5% para as folhas e de 4,78% para as cascas.

5.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC

5.6.1 HPLC-DAD

Os extratos foram injetados de forma padrão em coluna Phenomenex C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm) embalada com partículas de 5 µm de diâmetro.

As fases móveis A e B foram acidificadas a pH 3,0 em água Milli-Q com 2% de ácido fórmico e acetonitrila, respectivamente.

Os gradientes de solventes correspondentes utilizados foram: 0 min., 5% de B; 0-5 min., 15% de B; 5-10 min., 15% de B; 10-30 min., 40% de B; 30-45 min., 70% de B; 45-60 min., 100% B, seguindo o método descrito por Reis *et al.* (2014) com modificações.

Os extratos de *A. indica* e a fase móvel foram filtrados através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), em seguida desgaseificados em banho ultrassônico antes do uso.

O extrato foi analisado a uma concentração de 10 mg/mL. O caudal foi de 0,6 mL/min. e o volume de injeção foi de 50 µL.

A fase de amostra e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), em seguida desgaseificadas por banho ultrassônico antes da utilização.

Foram preparadas soluções de reserva de referências de padrões na fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,020 - 0,350 mg/mL. Foram efetuadas quantificações pela integração dos picos utilizando o método do padrão externo: 270 nm para os ácidos gálicos; 276 nm para cumarina; 280 nm para catequina; 325 nm para ácido clorogênico; e 366 nm para quercetina, quercetina, rutina, luteolina e canferol. Os picos de cromatografia foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com os padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 500 nm).

As curvas de calibração utilizadas – do ácido gálico: $Y = 12573x + 1329,6$ ($r = 0,9998$); Catequina: $Y = 11845x + 1173,9$ ($r = 0,9997$); Ácido clorogênico: $Y = 11948x + 1205,7$ ($r = 0,9995$); Cumarina: $Y = 12685x + 1156,3$ ($r = 0,9999$); Rutina: $Y = 13476x + 1279,8$ ($r = 0,9997$); Quercetina: $Y = 11672x + 1249,5$ ($r = 0,9998$); Quercitrina: $Y = 12408x + 1347,9$ ($r = 0,9999$); Luteolina: $Y = 13508x + 1351,3$ ($r = 0,9996$) e Canferol: $Y = 12834x + 1367,2$ ($r = 0,9997$). Todas as operações de

cromatografia foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicata. (BOLIGON *et al.*, 2012)

5.6.2 Limite de detecção (lod) e limite de QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas e na inclinação utilizando três curvas analíticas independentes (BOLIGON *et al.*, 2012). LOD e LOQ foram calculados como $3,3 \sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação da curva de calibração.

5.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O método utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi o de microdiluição em caldo. O extrato etanólico das folhas e do cascas de *A. indica* foi dissolvido em dimetilsufóxido (DMSO) e diluído para 1024 µg/ml com água estéril. O inoculo bacteriano foi diluído usando BHI 10% para uma concentração final 10^5 UFC/mL. Foram distribuídos 100 µL dos inoculos em cada poço de uma placa de microdiluição de 96 poços e, em seguida, submetidos a uma diluição 1:2 em série usando 100 µL do extrato, variando as concentrações entre 512 a 8 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A leitura evidenciou-se pela mudança de cor para azul ao utilizar a resazurina. A CIM foi determinada como a menor concentração onde o não crescimento do microrganismo foi observado (CLSI, 2000).

5.8 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE AMINOGLICOSÍDEOS E CARBAPENEM

Para verificar se o produto natural poderia alterar a ação de drogas antibacterianas contra as cepas testadas, foi usado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). O extrato etanólico das folhas e do caule de *A. indica* foi testado em concentração subinibitória (CIM/8 = 128 µg/mL).

Foram distribuídos 100 µL da solução contendo BHI com o inoculo de microrganismo e o extrato em cada poço. Em seguida, 100 µL do antibacteriano

foram misturados com a solução do primeiro poço, após diluição de 1:2, variando as concentrações dos antibacterianos entre 2.500 a 2,44 µg/mL, e 512 a 2 µg/mL, respectivamente. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A leitura evidenciou-se após uma hora, pela mudança de cor para azul ao utilizar 20 µL da resazurina em cada poço.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

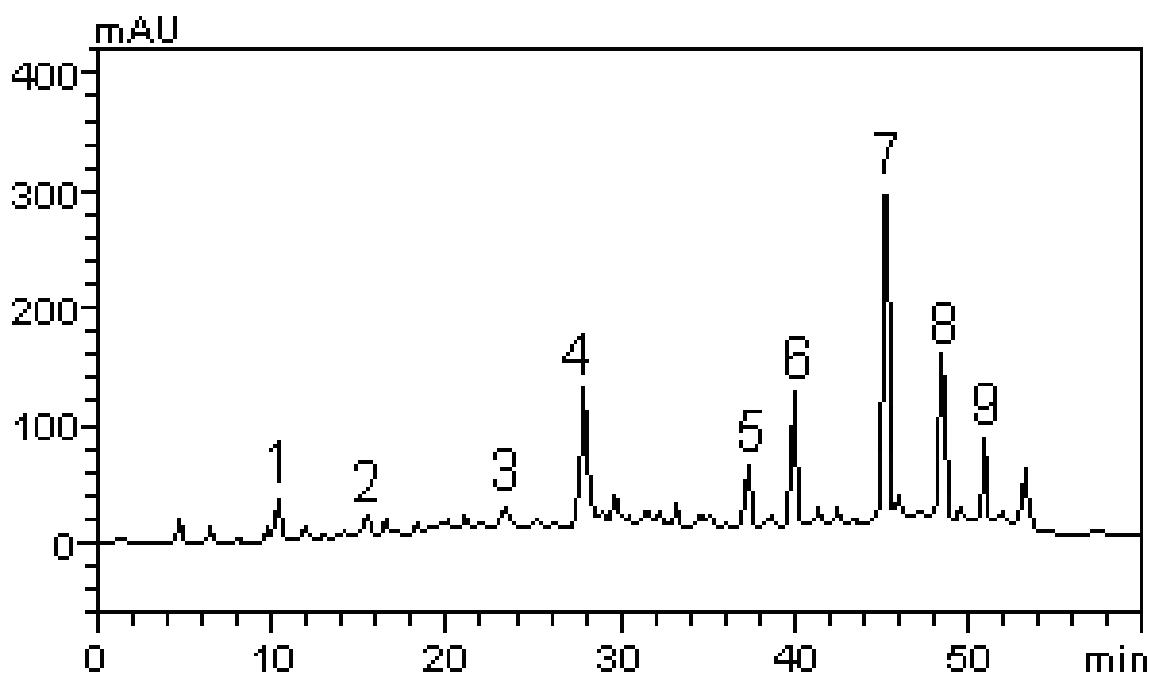
Os resultados dos ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média geométrica. A análise estatística aplicada foi a *Two-Way ANOVA* seguido por pós-teste de Bonferroni utilizando o software *GraphPadPrism 5.0*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE POR HPLC

O extrato hidroetanólico de *A. indica* contém outros compostos menores além do ácido gálico ($tR = 10,12$ min., pico 1), catequina ($tR = 15,03$ min., pico 2), ácido clorogênico ($tR = 23,78$ min., pico 3), cumarina ($tR = 27,96$ min., pico 4), rutina ($tR = 37,01$ min., pico 5) quercitrina ($tR = 39,84$ min., pico 6), quercetina ($tR = 45,26$ min., pico 7), Canferol ($tR = 48,17$ min., pico 8), e luteolina ($tR = 50,34$ min., pico 9) (Gráfico 1 e Tab.1).

Gráfico 1 - Perfil de cromatografia líquida (HPLC) representativo de extrato hidroetanólico de *A. indica*.



Legenda: Pico 1 = ácido gálico; Pico 2 = catequina; Pico 3 = ácido clorogênico; Pico 4 = cumarina; Pico 5 = rutina; Pico 6 = quercitrina; Pico 7 = quercetina; Pico 8 = canferol; Pico 9 – luteolina.
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 – Média e erro padrão da composição de fenóis e flavonoides do extrato hidroetanólico de *A. indica*

Componentes	<i>A. indica</i>		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/ml	µg/ml
Ácido gálico	2,65 ± 0,01 ^a	0,26	0,023	0,076
Catequina	1,79 ± 0,03 ^b	0,17	0,008	0,025
Ácido clorogênico	1,81 ± 0,01 ^b	0,18	0,014	0,048
Cumarina	7,48 ± 0,01 ^c	0,74	0,027	0,091
Rutina	3,72 ± 0,02 ^d	0,37	0,011	0,036
Quercitrina	7,46 ± 0,01 ^c	0,74	0,009	0,029
Quercetina	14,09 ± 0,01 ^e	1,40	0,015	0,048
Canferol	8,15 ± 0,03 ^f	0,81	0,010	0,034
Luteolina	3,74 ± 0,01 ^d	0,37	0,026	0,085

Legenda: LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Letras minúsculas na mesma coluna ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

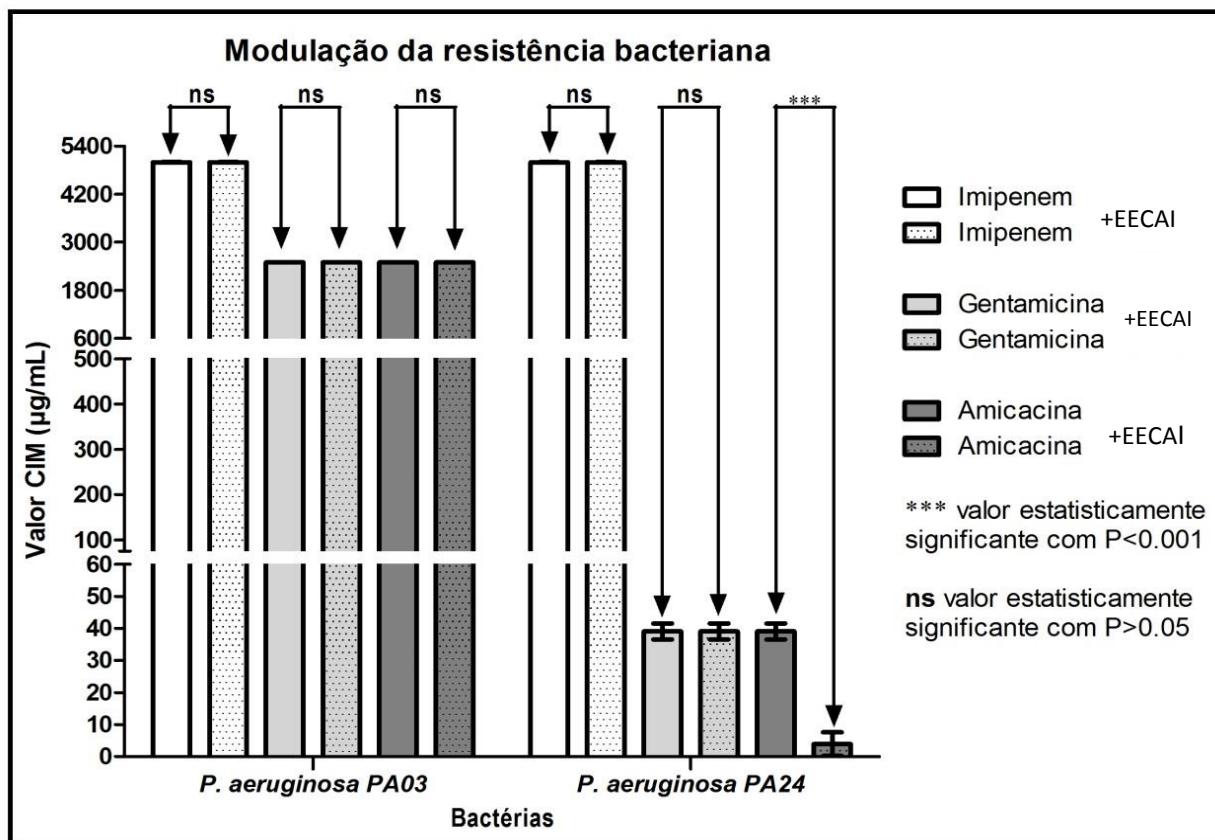
6.2 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

Com base nos resultados da CIM, quando utilizadas as cepas do tipo padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), afim de verificar a concentração inibitória mínima dos antibacterianos testados, verificou-se modulação da atividade antibiótica, onde para os gráficos 2 e 3 mostraram a combinação do extrato de *A. indica* com os antibióticos frente às cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* (PA 03, PA 24). Pode-se observar que a combinação do EECAI (Extrato Etanólico das Cascas de *A. indica*) com o Imipenem e a Gentamicina frente à cepa PA03 de *P. aeruginosa* não apresentou diferenças entre o controle e a associação; porém, frente à cepa PA24 de *P. aeruginosa* associada à Amicacina, foi observado sinergismo ($p < 0,001$).

Já ao ser testado o efeito modulador do EEEAI (Extrato Etanólico das Folhas de *A. indica*), verificou-se que a combinação com o Imipenem, não obteve efeito significativo em relação ao controle para as cepas PA03 e PA24. Em contrapartida, com os aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina houve sinergismo. Contra a cepa PA03 ao ser testado com a Amicacina e frente a cepa PA24, testado

também com a gentamicina, resultando em sinergismo, diminuindo a concentração do antibiótico quando testado junto ao extrato ($p < 0,001$).

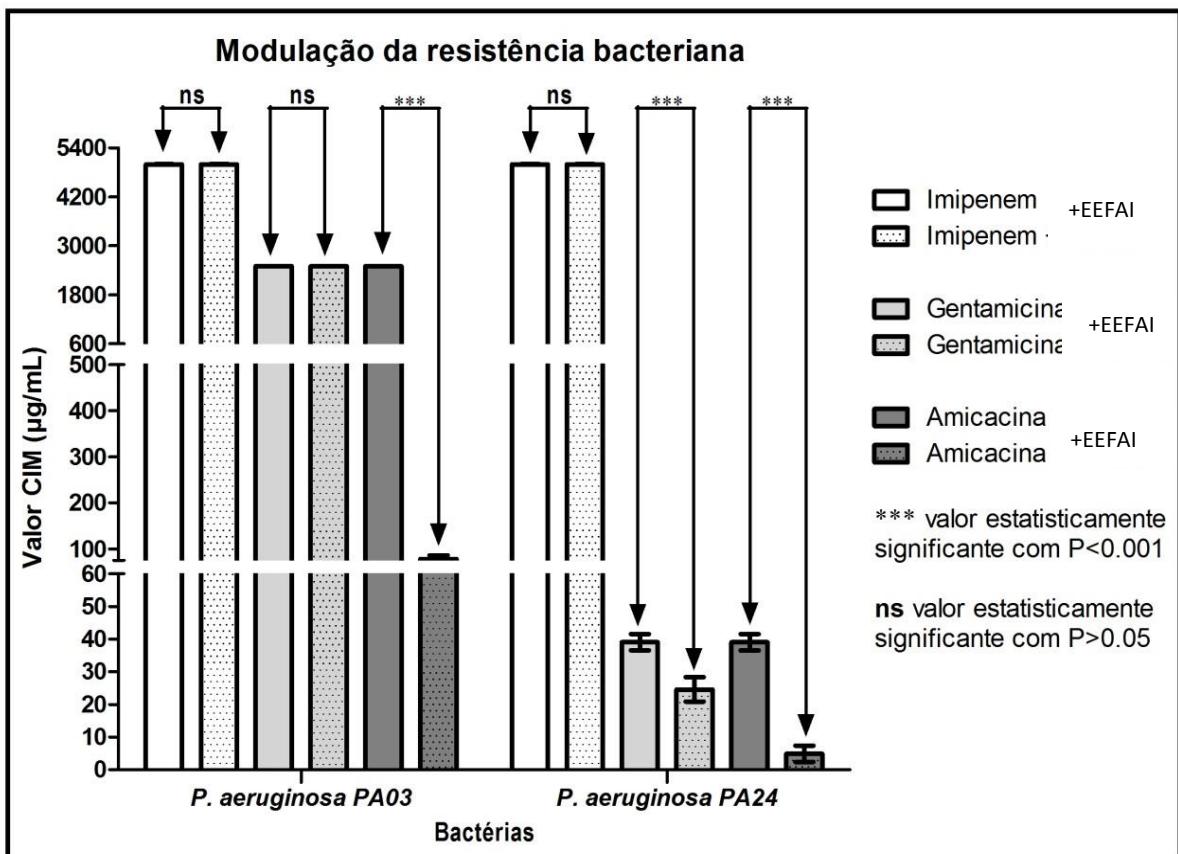
Gráfico 2 - Extrato etanólico das cascas de *A. indica* (EECAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de *P. aeruginosa*



Teste de Bonferroni ($p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 3 – Extrato Etanólico das Folhas de *A. indica* (EEFAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de *P. aeruginosa*



Teste de Bonferroni ($p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o tratamento de algumas patologias, uma grande variedade de antimicrobianos foram usados no intuito de tratar as patologias do tipo infecciosas, por isso é que os produtos naturais foram produzidos através de plantas com efeito medicinal. Desse modo, há a possibilidade de que as plantas possuem variadas substâncias que podem se apresentar como uma novidade para a ação terapêutica frente aos microrganismos multirresistentes e de grande interesse clínico (BUTTLER, 2006).

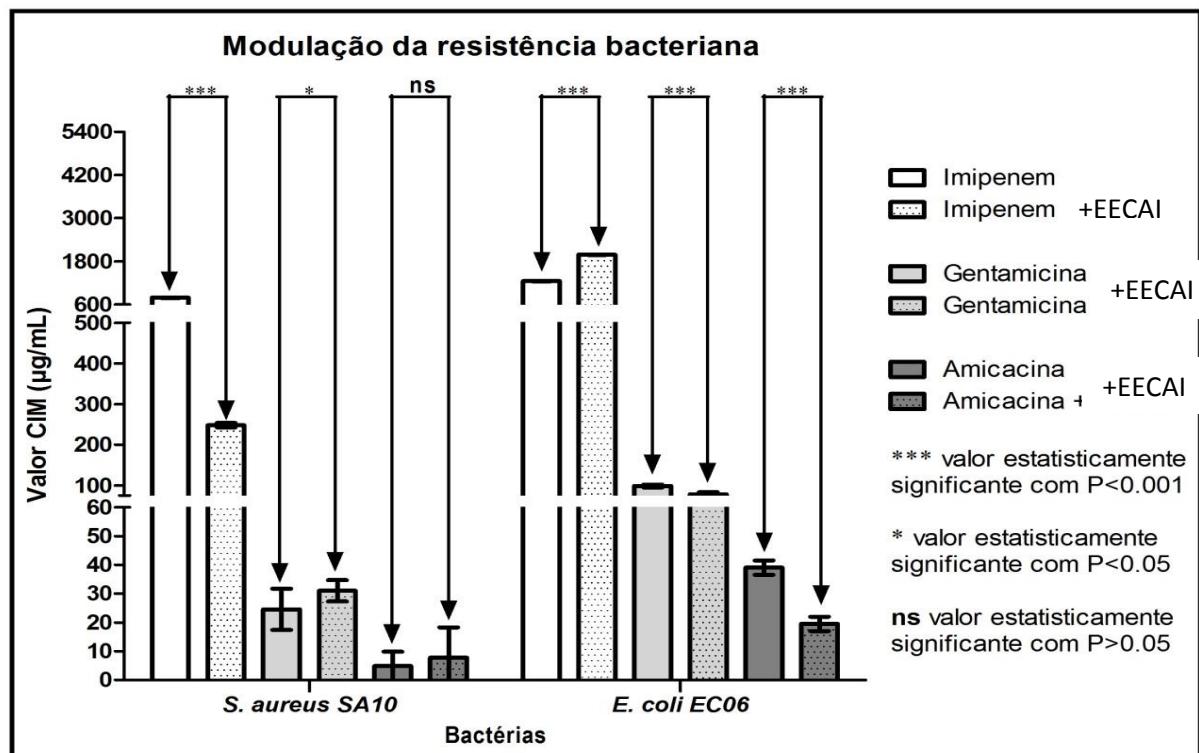
Resultados e metodologias semelhantes foram encontrados em estudos que com *Costus* sp, *Momordica charantia*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum gratissimum* e *Sideroxylon obtusifolium*. Diversos metabólitos podem modificar a atividade de antibióticos, melhorando seu desempenho e diminuindo a sua dose terapêutica (COUTINHO et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; LEANDRO et al., 2013; MATIAS, 2010).

Os gráficos 4 e 5 mostram a combinação dos extratos de *A. indica* com os antibióticos frente às cepas resistentes de *E. coli* e *S. aureus* (SA 10 e EC 06, respectivamente). Foi obtido sinergismo com a combinação do EECAl com o Imipenem, não havendo diferenciação quando testado com Amicacina e efeito antagônico em teste com a Gentamicina frente às cepas de *S. aureus*, diminuindo a CIM para Imipenem.

Dessa forma, foi observado sinergismo somente com o Imipenem para *S. aureus*. Já com a Amicacina, não houve diferenciação se comparado ao controle, mas houve antagonismo na associação com a Gentamicina frente *E.coli* e sinergismo para Amicacina apenas frente a *E. coli*.

Contudo Foi obtido efeito antagônico na associação do EEFAl com o Imipenem frente a *S. aureus*, não havendo diferenciação quando testado com Gentamicina, e antagonismo com a Amicacina. O efeito resultou em sinergismo apenas para Amicacina e Gentamicina em associação do EEFAl frente as cepas de *E. coli* e antagonismo em comparação do grupo controle com a associação da Amicacina com o extrato contra as cepas de *S. aureus*.

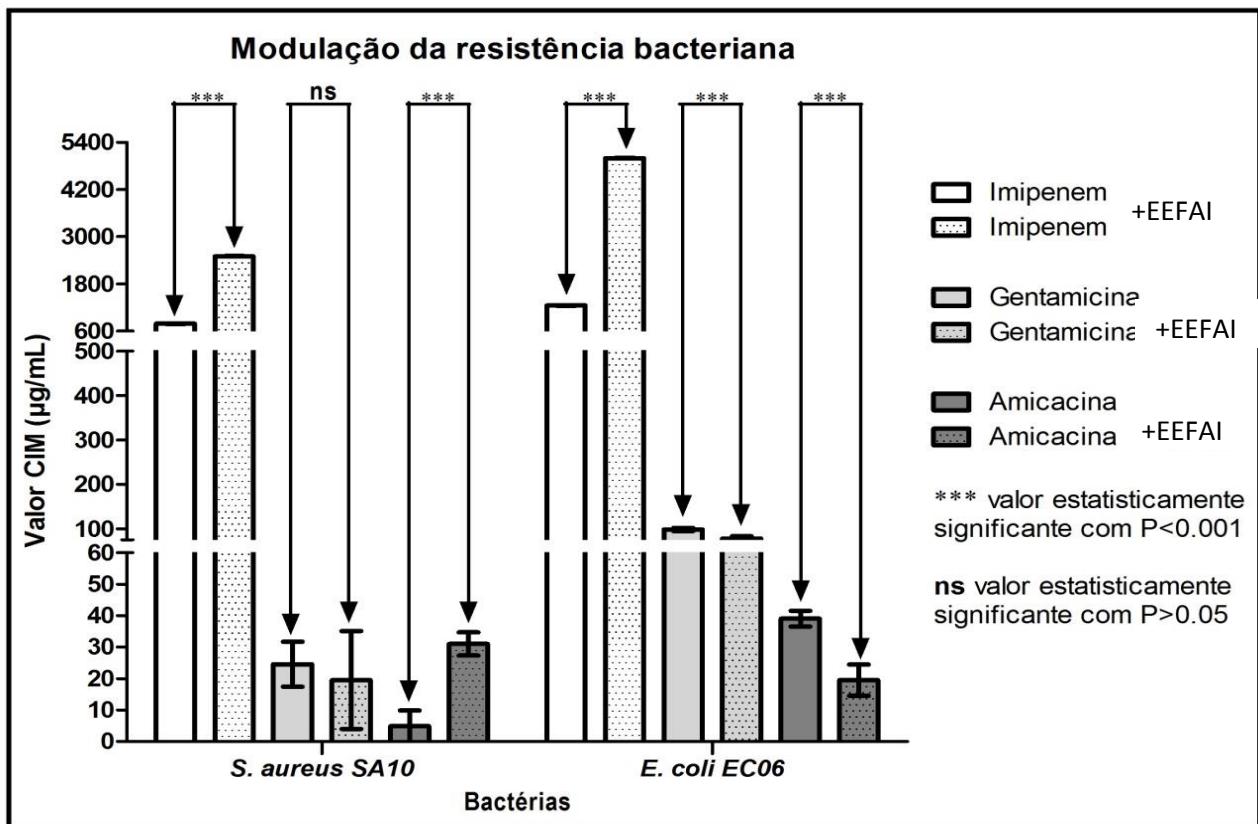
Gráfico 4 - Extrato Etanólico das Cascas de *A. indica* (EECAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de *E. coli* e *S. aureus*.



Teste de Bonferroni ($p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 5- Extrato Etanólico das Folhas de *A. indica* (EEFAI) em combinação com antimicrobianos contra cepas de *E. coli* e *S. aureus*.



Teste de Bonferroni ($p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com a literatura, a explicação das diferentes atividades entre sinergismo e antagonismo dos produtos naturais associados, como por exemplo a Amicacina frente a microrganismos multirresistentes, podem estar relacionadas com a possível variação da estrutura desse aminoglicosídeo. Para esse fármaco, existem moléculas hidrofílicas originadas por uma aminociclitol anel com ligação glicosídica em conexão, sendo clinicamente mais utilizado (MAGNET; BLANCHAD, 2005).

Produtos naturais podem aumentar ou reduzir o efeito dos antibióticos, sendo caracterizados como “Modificadores da Atividade Antibótica”, e assim, atuar sinergicamente com o efeito antibacteriano devido a alguns constituintes presentes em sua composição. Esta atividade é demonstrada pela associação de drogas sintéticas e produtos naturais, que podem reverter à resistência microbiana eliminando plasmídeos e inibindo a bomba de efluxo. No entanto, quando ocorre a quedação dos constituintes do antibiótico pelo extrato ou a ligação destes em locais específicos dos antibióticos, o efeito do fármaco pode ser reduzido caracterizando a

resposta como antagonismo (COUTINHO *et al.*, 2009; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

É possível afirmar que muitos dos metabólitos, sejam de origem vegetal, podem vir a modificar o efeito de alguns antimicrobianos, alterando a atividade das drogas, resultando na redução da concentração da droga em teste (COUTINHO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Diante das várias formas de inibição do crescimento bacteriano, a combinação de medicamentos antimicrobianos, associados ou não a outras classes de inibidores da β -lactamase e/ou β -lactâmicos interfere nos mecanismos de resistência bacteriana (MIRANDA-NOVALES *et al.*, 2006).

A ação moduladora de antibióticos deve-se a presença de metabólitos, como flavonoides e terpenos, que estão presentes em partes do material vegetal, principalmente nas folhas e no caule. Já é comprovada a ação antimicrobiana de compostos como ácido gálico, quercetinas, rutinas, cumarinas, entre outras. Existe uma proporção, assim como diferenças, entre os compostos fenólicos, que irá depender do período da coleta, assim como do local onde o material vegetal é encontrado. Dessa forma, é que se explica à composição química complexa e variável, demonstrando uma variedade de atividades biológicas como: antibacteriana, antitumoral, citotóxica, anti-inflamatória, moduladora e antioxidante (AQUINO *et al.*, 2015; COUTINHO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2015; ZUANAZZI, 2000).

Os diversos metabólitos presentes nos produtos naturais possuem relação com o desenvolvimento dos mecanismos de defesa do vegetal frente aos microrganismos, já sendo comprovado que muitos modificam a ação dos antimicrobianos (COUTINHO *et al.*, 2009; FIGUEREDO *et al.*, 2013).

7 CONCLUSÃO

O extrato de folhas e da casca de *Azadirachta indica* diminuíram a concentração inibitória mínima dos antibacterianos utilizados e modularam a atividade de antibióticos contra cepas bacterianas multirresistentes, havendo efeitos sinérgicos e antagônicos da associação com os antimicrobianos Imipenem, Gentamicina e Amicacina.

Este efeito diferencial pode ser atribuído à presença de vários metabolitos que foram identificados através do método de HPLC, como a quercetina, o kaempferol, a cumarina, o ácido gálico, a catequina e o ácido clorogênico, que tornam a *A. indica* uma fonte importante de substâncias com potencial para ser utilizado no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos.

Nesse sentido, sugere-se que novos testes, ensaios químicos e biológicos sejam realizados para melhor elucidação de quais metabólitos têm efeito sinérgico e quais têm efeito antagônico.

Além destes, sugere-se ainda que sejam realizados testes de toxicidade da planta visando um melhor conhecimento do uso desse material vegetal na área clínica, podendo ainda ser testado seu uso na agroecologia.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, P. E. A. et al. The association between drugs and herbal products: in vitro enhancement of the antibiotic activity by extracts of dry floral buttons of *Egletes viscosa* L. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, p. 258-62, 2015.
- BANDYOPADHYAY, U. et al. Clinical studies on the effect off nem (Azadirachta indic) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. **Life Sciences**, v. 75, p. 2867-78, 2004.
- BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologae Plantarum**, v. 35, p. 2229-39, 2012.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. New York: Intercept, 1995, 499 p.
- BUTTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products - the future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-29, 2006.
- CARNEIRO, J. C. O. **Padrão de consumo de antibacterianos em uma UTI geral: correlação com a resistência bacteriana**. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/5221>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- CHANDRA, A. et al. Indian herbal results in hypoglycemic responses in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 27, p. 161-8, 2007.
- CHATTOPADHYAY, R. R. Effect of *Azadirachta indica* hidroalcoholic leaf extract on de cardiovascular system. **General Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 449-51, 1997.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 5. ed. NIH: Villanova, 2000.
- COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-5, 2008.
- _____. In vitro interference of *Momordica charantia* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1056-9, 2009.
- DASGUPTA, T. et al. Chemoprotective potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 23-36, 2004.
- DAVI, G.; FALCO, A.; PATRONO, C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 256-68, 2006.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cad. Otorrinol. Clin. Invest. Inov.**, v. 1, p. 1-10, 2010.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais:** Verdades e mentiras - o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. UNESP: São Paulo, 2007.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1213-9, 2003.

ELASRI, M. O.; MILLER, R.V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2025-31, 1999.

FERREIRA, F. S. et al. Is the body fat of the lizard *Tupinambis merianae* effective against bacterial infections? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 233-7, 2009.

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the antibiotic activity by extracts from Amburana cearensis A. C. Smith and Anadenanthera macrocarpa (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 1, n. 1-5, 2013.

FRANCISCO, K. S. F. Phytoterapy: an option in odontological treatment. **Revista Saúde**, v. 4, p. 1-7, 2010.

FRIDKIN, S. K. Vancomycin – intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 108-15, 2001.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymixyn B and colistin: Review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 183-90, 2001.

HARIKRISHMAN, R.; RANI, M. N.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, p. 41-50, 2003.

HOEFFEL, J. L. M. et al. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APAS'S Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista VITAS – Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**, n. 1, 2011.

ISMAN, M. B. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to Azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1406-11, 1990.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p.140-50, 2006.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107-13, 1996.

JOLY, B. A. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora nacional. 2002, 777 p.

KADOSAKI et al. Analysis of use and bacterial resistance to antimicrobial in level hospital. **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.

KAZMIRCZAK, A.; GIOVELLI, F. H.; GOULART, L. S., Caracterização das infecções do trato urinário diagnosticadas no município de Guarani das Missões – RS. **RBAC**, v. 37, n. 4, p. 205-7, 2005.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3249-56, 2000.

KUMAR, S. et al. Anticancer effects of ethanolic nem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 246-50, 2006.

LEANDRO, L. M. G. et al. Avaliação antibacteriana e modulatória de extractos metanólicos e hexânicos da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. **E Ciência**, v. 1, p. 1-15, 2013.

LOWY, F. *Staphylococcus aureus* infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520-32, 1998.

MAGNET, S.; BLANCHAD, J. S. Molecular insights into aminoglycosides action andresistance. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 477-97, 2005.

MAHDI, A. A. et al. Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 18, p. 8-15, 2003.

MAIA, G. N. **Caatinga: arvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: Leitura & Arte Editora, 2011, 413 p.

MARTINEZ, S. S. **O Nim – Azadirachta Indica: Natureza, Usos múltiplos, Produção**. Londrina: IAPAR, 2002.

MATIAS, E. E. F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (erva-baleeira)**. 2010. 110f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri, Crato. 2010.

MIRAND, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multi resistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **Science of the Total Environment**, v. 293, p. 207-18, 2002.

MIRANDA-NOVALES, G. et al. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, p. 1-5, 2006.

NAIMI, T. S. et al. Comparison of community- and health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA**, v. 290, n. 30, p. 2976-84, 2003.

NEUSA, et al. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Enferm.**, v.13, Florianópolis, 2004. Disponível:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>> Acesso em: 18 mar. 2016.

NICOLAU, D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 1, p. 23–37, 2008.

NORDMANN, P. et al. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 689–92, 2011.

BRÖTZ-OESTERHELT, H. et al. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. **Nature Medicine**, v. 11, n. 10, p. 1082-7, 2005.

PEREIRA, N. L. F. et al. Antibacterial and topical anti-inflammatory effect of metanol extract of *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitoterá**, v. 9, p. 73-144, 2015.

REIS, E. M. et al. Manejo das podridões radiculares. In: REIS, E. M. **Doenças na Cultura da Soja**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 2004, p. 115-122.

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1052-5, 2009.

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

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-23, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org) **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2001, p. 301-32.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-97, 1990. Disponível em: <[10.1146/annurev.en.35.010190.001415](https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.001415)>. Acesso em: 25 abr. 2016.

SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à Botânica Sistemática**. 4. ed. v. 2, Porto Alegre: Editora da Universidade, 1994, p. 414.

SEYFRIED, E. E. et al. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture. Facilities with varying use of oxytetracycline. **Microbiology Ecology**, v. 59, p. 799-807, 2010.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 18, n. 122, 2004.

SILVA, M.D. **Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga em Pernambuco**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em: <http://www.pgb.ufrpe.br/doctos/2008/dissertacoes/estudo_farmacobotanico_milena_dutra.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2016.

SIMMONDS, M. S. J. et al. **Phytochemistry**, v. 28, 1069 p., 1989.

SINGH, P. K. et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, v. 407, p. 762-4, 2000.

SOLIDARIDAD PARA EL DESARROLLO Y LA PAZ. Disponível em: <<http://www.sodepaz.org/nim/>>. Acesso em: 17 fev. 2006.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-54, 2008.

TAVARES, W. Aminociclítóis aminoglicosídeos. In: TAVARES, W. (Ed.) **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. São Paulo: Atheneu, p. 573-626, 2001.

TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An introduction**. 6. ed. Menlo Park: Addison Wesley Longman. 832 p. 1998.

WADE, T. J. et al. Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. **Environ. Health**, v. 9, p. 66, 2010. Disponível em:<10.1186/1476-069X-9-66>. Acesso em: 05 jun. 2016.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009. Disponível em:<[10.1016/j.phymed.2008.12.018](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018)>. Acesso em: 10 jun. 2016.

WINKALER, E. U. et al. Acute lethal and sublethal effects off nem leaf extract on the neotropical freshwater fish of Prochilodus lineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 236-44, 2007.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.

ZHANEL, G. G. et al. 1,2,3-Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Drugs**, v. 69, p. 809-31, 2009.

ZUANAZZI, J. S. S. et al. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. (Ed.), **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. da Universidade UFRGS / Ed. da UFSC, 2000.

ANEXOS

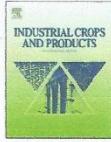
ANEXO A – Artigo publicado

Industrial Crops and Products 94 (2016) 903–908

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Short communication

HPLC profile and antibiotic-modifying activity of *Azadirachta indica* A. Juss, (Meliaceae)

Jannyketchuly S. Cristo^a, Edinardo F.F. Matias^a, Fernando G. Figueredo^a,
Joyce F.S. Santos^b, Nara L.F. Pereira^a, José G.A.S. Junior^a, Pedro E.A. Aquino^a,
Maria N.F. Nogueira^a, Jaime Ribeiro-Filho^a, Francisco de A.B. Cunha^c, Maria S. Costa^c,
Fabia F. Campina^c, Saulo R. Tintino^c, Cristiane C.M. Salgueiro^b,
Henrique D.M. Coutinho^{c,*}

^a Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, CE, Brazil
^b Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
^c Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 May 2016
Received in revised form
25 September 2016
Accepted 2 October 2016

Keywords:
Multi-drug resistance
Potentiation
Antibiotic
Flavonoids
Tannins

ABSTRACT

The rising of resistant bacterial lineages as well as the development of significant side effects of antibacterial drugs have made urgent the development of researches for identification of new bioactive antibacterial compounds. *Azadirachta indica* is a plant species popularly known as "Nim". This plant originates from Southeast Asia, and is amply found in Africa, Australia and in the Americas. It has been reported that it presents an insecticidal action, which affects many species. The study aimed to evaluate the antibacterial and modulatory potential of the ethanolic extracts obtained from leaves and bark of *A. indica* against standard and multiresistant bacteria. The extracts were tested alone or in combination with aminoglycosides and carbapenems antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using the broth microdilution method in Brain Heart Infusion (BHI) medium. The association between antibiotics and *A. indica* extracts presented synergistic or antagonistic effects, which might be due to the diversity of metabolites found in the plant. Among these metabolites, quercetin, kaempferol and coumarin were found as major constituents and gallic acid, catechin and chlorogenic acid were found as minor constituents. In conclusion, *A. indica* modulated the activity of antibiotics against multiresistant bacterial strains, which may involve multiple mechanisms of antimicrobial action, which resulted in a potentiation of the antibacterial activity of the tested antibiotics that was strain and drug-dependent.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Medicinal plants are important natural products employed in the development of herbal medicines, which are compositions produced from the mixture of plant constituents, according to specific technical orientations (Di Stasi, 2007). These products are usually prepared using varied pharmaceutical forms, including capsules, pills, gels, ointments, aqueous solutions, hydroalcoholic solutions and infusions (popularly known as teas) (Francisco, 2010).

Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) is a plant species that is known as "Nim" or "Margosa" (Biswas et al., 2002). Some studies have shown that this plant present therapeutic properties, such as insecticidal and thus, it may be employed in the fight against up to 430 different types of pests that affect agriculture (Martinez, 2002). In addition, other properties of this plant, including antiseptic, anthelmintic, tonic and anti-diabetic have been reported in the literature (Winkler et al., 2007).

Escherichia coli is an etiological agent that cause acute infections, compromising the function of many organs, including the kidneys and intestines, which can result in septicemia, and, as such, it is involved in several conditions of clinical relevance. *Staphylococcus aureus* is a bacterial species that presents great clinical interest because of the rising of many antibiotic-resistant strains. In the other hand, *Pseudomonas*

* Corresponding author at: Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri—URCA, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, Crato, CE 63105-000, Brasil.
E-mail addresses: hdmcoutinho@gmail.com, hdouglas@zipmail.com.br (H.D.M. Coutinho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.001>
0926-6690/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

aeruginosa cause numerous high mortality hospital infections that are resistant to different antibiotics and thus, present an important public health problem (Figueiredo et al., 2007; Santos et al., 2007; Von Baum and Marre, 2005).

Bacterial resistance has become alarming worldwide, especially in the hospital environment, leading to fail in the antibiotic therapy, which is closely associated to increasing mortality rates and demands high costs with special health care, characterizing an important public health problem (Dias and Monteiro, 2010; Carneiro, 2006). In this perspective, the use of natural products in bacterial resistance control becomes an important alternative due to the action of multiple bioactive metabolites, which can synergistically overcome the microbial resistance mechanisms. Therefore, this study aimed to evaluate *in vitro* the antibacterial activity of the *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* alone, or in combination with aminoglycosides and carbapenems antibiotics.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Analytical grade chemicals were used in all assays. Acetonitrile, formic acid, gallic acid and chlorogenic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Catechin, coumarin, quercetin, quercitrin, rutin, luteolin, kaempferol and the aminoglycosides (Amikacin and Gentamicin) and carbapenem (Imipenem) antibiotics were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed using a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

2.2. Microorganisms

The microorganisms used in the tests were provided by the Microbiology and molecular biology laboratory of the Regional University of Cariri—URCA. Standard and multiresistant species of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were used in the tests. The microbial strains used as standard lineage were: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

To evaluate the modulatory activity of the natural products, the following multiresistant bacterial isolates were used: *Staphylococcus aureus* 10; *Pseudomonas aeruginosa* 03 and *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Escherichia coli* 06. These strains were maintained in Heart Infusion Agar- HIA (Difco Ltda.) culture medium and before the tests the cells were cultivated for 24 h at 35 °C in Brain Heart Infusion – BHI (Difco laboratories Ltda.) media. All culture media were prepared following the manufacturer specifications and sterilized in a hot vapor autoclave.

2.3. Plant collection and identification

The botanic material was collected from the Garden of Medicinal Plants of the Natural Products Research Laboratory – LPPN of the Regional University of Cariri—URCA. A voucher specimen was deposited in the Herbarium Caririense Dárdano of Andrade-Lima under number # 10.787 and identified by the curator of that herbarium, Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva, PhD.

2.4. Extract concentration

The leaves and barks of the plant were collected at 09:00 a.m. ± 30 min. Then, this material was pulverized and immersed in ethanol PA for 72 h. After this period, the extract was filtered and the liquid was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom) for ethanol evaporation. After this procedure, the material was placed in water bath (Quimis) at 60 °C for water evaporation. After concentration, the extract was conditioned in an amber glass and stored in a freezer. The extracts obtained from leaves and bark presented a yield of 4.5 and 4.78%, respectively.

2.5. High performance liquid chromatography—HPLC

The extracts were injected into a reversed phase Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phases A and B were Milli-Q water acidified to pH 3.0 with 2% of formic acid and acetonitrile, respectively. Corresponding solvent gradients were used as follows: 0 min, 5% B; 0–5 min, 15% B; 5–10 min, 15% B; 10–30 min, 40%; 30–45 min 70% B; 45–60 min, 100% B. The *Azadirachta indica* extracts and the mobile phase were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. The extracts were analyzed at a concentration of 10 mg/mL. The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 50 µL. Stock solutions of standard references were prepared in the HPLC mobile phase at concentrations ranging from 0.020–0.350 mg/mL. Quantifications were carried out by performing integration of the peaks using the external standard method at 270 nm for gallic acid; 276 nm for coumarin; 280 nm for catechin; 325 nm for chlorogenic acid; and 366 for quercetin, quercitrin, rutin, luteolin and kaempferol. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve of gallic acid: $Y = 12573x + 1329.6$ ($r = 0.9998$); catechin: $Y = 11845x + 1173.9$ ($r = 0.9997$); chlorogenic acid: $Y = 11948x + 1205.7$ ($r = 0.9995$); coumarin: $Y = 12685x + 1156.3$ ($r = 0.9999$); rutin: $Y = 13476x + 1279.8$ ($r = 0.9997$); quercetin: $Y = 11672x + 1249.5$ ($r = 0.9998$); quercitrin: $Y = 12408x + 1347.9$ ($r = 0.9999$); luteolin: $Y = 13508x + 1351.3$ ($r = 0.9996$) and kaempferol: $Y = 12834x + 1367.2$ ($r = 0.9997$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicates. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated based on standard deviation of the responses and the slope was determined using three independent analytical curves, as defined by Boligon et al. (2012). The LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.6. Determination of the minimum inhibitory concentration

The broth microdilution method was used to calculate the minimum inhibitory concentration (MIC). The ethanol extracts obtained from the *Azadirachta indica* leaves and bark were dissolved using Dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted to 1024 µg/mL using sterile water. The bacterial inoculum was diluted using BHI 10% for a final concentration of 10⁵ CFU/mL. Posteriorly, 100 µL of the inoculum was distributed in each well of a microdilution plate with 96 wells. Then, serial dilutions (1:2) were performed using 100 µL of the extract to obtain concentrations from 512 to 8 µg/mL. The plates were then incubated for 24 h at 35 °C (Javadpour et al., 1996). The readings were evidenced by a change in color to blue after using Resazurin as a colorimetric indicator. The MIC was determined as

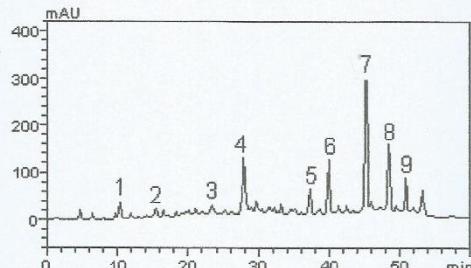


Fig. 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *Azadirachta indica* hydroethanolic extract. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), coumarin (peak 4), rutin (peak 5), quercitrin (peak 6), quercetin (peak 7), kaempferol (peak 8) and luteolin (peak 9).

the lowest concentration at which no microorganism growth was observed, according to CLSI (2000).

2.7. Modulation of the antibiotic activity of aminoglycosides

To analyze the modulatory effect of the extracts on the antibacterial activity of aminoglycosides against the tested strains we used a method described by Coutinho et al. (2008). The ethanolic extracts obtained from the leaves and bark of *A. indica* were tested at a sub-inhibitory concentration ($MIC/8 = 128 \mu\text{g}/\text{mL}$). Then, $100 \mu\text{L}$ of the BHI solution (10%) was distributed with the microorganism inoculum and the extract in each well, followed by addition of $100 \mu\text{L}$ of the antibiotic in the first well. Serial dilutions (1:2) of the extracts obtained from the leaves and the bark were performed in order to achieve antibiotic concentrations that ranged from 2500 to $2.44 \mu\text{g}/\text{mL}$ and from 512 to $2 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Finally, the plates were incubated for 24 h at 35°C (Javadpour et al., 1996). The readings were evidenced by a change in color to blue after using Resazurin ($20 \mu\text{L}/\text{well}$) as a colorimetric indicator. Of note, DMSO at a non-toxic concentration was used in the tests.

2.8. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and data were expressed as geometric mean. The results were compared using two-way ANOVA and the comparison between the geometric means was performed using the Bonferroni's post-test with the Graphpad Prism 5.0 software. The differences with $p < 0.05$ were considered significant (Matias et al., 2013).

3. Results and discussion

3.1. HPLC analysis

The HPLC analysis of the ethanolic extract obtained from *Azadirachta indica* revealed the presence of gallic acid ($t_R = 10.12 \text{ min}$; peak 1), catechin ($t_R = 15.03 \text{ min}$; peak 2), chlorogenic acid ($t_R = 23.78 \text{ min}$; peak 3), coumarin ($t_R = 27.96 \text{ min}$; peak 4), rutin ($t_R = 37.01 \text{ min}$; peak 5), quercitrin ($t_R = 39.84 \text{ min}$; peak 6), quercetin ($t_R = 45.26 \text{ min}$; peak 7), kaempferol ($t_R = 48.17 \text{ min}$; peak 8) and luteolin ($t_R = 50.34 \text{ min}$; peak 9) (Fig. 1). As we can see in Table 1, quercetin, kaempferol and coumarin were found as major constituents of the extract.

Table 1
Phenolics and flavonoids composition of *Azadirachta indica* hydroethanolic extract.
LOD: limit of detection and LOQ: limit of quantification.

Compounds	<i>A. indica</i>		LOD $\mu\text{g}/\text{mL}$	LOQ $\mu\text{g}/\text{mL}$
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%		
Gallic acid	$2.65 \pm 0.01 \text{ a}$	0.26	0.023	0.076
Catechin	$1.79 \pm 0.03 \text{ b}$	0.17	0.008	0.025
Chlorogenic acid	$1.81 \pm 0.01 \text{ b}$	0.18	0.014	0.048
Coumarin	$7.48 \pm 0.01 \text{ c}$	0.74	0.027	0.091
Rutin	$3.72 \pm 0.02 \text{ d}$	0.37	0.011	0.036
Quercitrin	$7.46 \pm 0.01 \text{ c}$	0.74	0.009	0.029
Quercetin	$14.09 \pm 0.01 \text{ e}$	1.40	0.015	0.048
Kaempferol	$8.15 \pm 0.03 \text{ f}$	0.81	0.010	0.034
Luteolin	$3.74 \pm 0.01 \text{ d}$	0.37	0.026	0.085

Results are expressed as mean \pm S.E. of three determinations.

Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

3.2. Modulation of the antibacterial activity of antibiotic

The effects of the combination of the extracts obtained from *Azadirachta indica* with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* (PA 03, PA 24) resistant strains are shown in Figs. 2 and 3. The association between the ethanolic extract obtained from the bark of *Azadirachta indica* (EEBAI) with Imipenem or Gentamicin tested against the *P. aeruginosa* – PA 03 strain caused no significant modulation of the antibacterial activity of this antibiotics, compared to the control group. However, when this extract was associated with Amikacin and tested against the PA 24 strain, the antibacterial activity of this drug was modulated and a synergistic effect was observed, indicating that the modulatory effect of the EEBAI is drug and strain-dependent.

The ethanolic extract obtained from the leaves of *Azadirachta indica* (EELAI) was associated with Imipenem and tested against PA 03 and PA 24 strains. We demonstrated that this association caused no significant modulatory effect, compared the control group. However, the association of this extract with the aminoglycosides Amikacin and Gentamicin resulted in a significant modulatory effect against the PA 24 strain, decreasing the concentration of the antibiotic that was needed for inhibition of bacterial growth. However, no modulatory effect was observed when this association was tested against the PA 03 strain, indicating that the EEBAI presents some degree of specificity, whose effect is explained by the different inhibition profile required on the different bacterial strains.

In the last decades, a wide variety of antimicrobials have been developed in order to treat a great number of pathologies that are triggered by different infectious agents. However, because of the increasing rates of bacterial resistance against antibiotics worldwide, new strategies are needed to control bacterial infections. Thus, natural products, especially those obtained from plants, present today an important alternative in antibacterial drug development, because they bear various substances (in the form of secondary metabolites), and therefore, might work as sources of novel, safe and effective drugs in the fight against multiresistant microorganisms (Butler and Buss, 2006).

Accordingly, using similar methodologies, similar results were obtained in studies that investigated the modulatory effect of *Costus* sp., *Momordica charantia*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum gratissimum* and *Sideroxylon obtusifolium*. These studies indicated that the presence of a great number of metabolites in these plants might modify the activity of antibiotics, improving their antimicrobial effect and thus, decreasing the effective concentration (Coutinho et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Matias, 2010; Leandro et al., 2013).

The Figs. 4 and 5 show the combination of *Azadirachta indica* extracts and antibiotics against resistant *E. coli* and *S. aureus* strains (EC 06 and SA 10). A synergistic effect was obtained with the combination between EEBAI and Imipenem, Amikacin or Gentamicin,

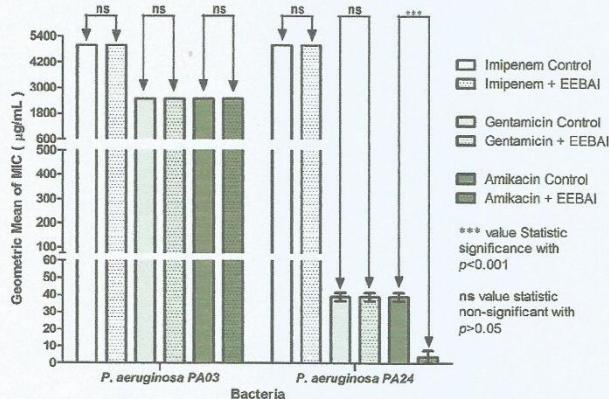


Fig. 2. EEBAI (Ethanol extract of bark from *Azadirachta indica*) in association with antimicrobials against different strains of *P. aeruginosa*.

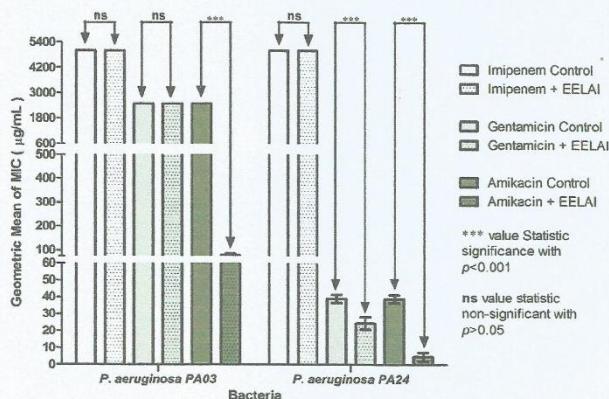


Fig. 3. EELAI (Ethanol extract of leaves from *Azadirachta indica*) in association with antimicrobials against different strains of *P. aeruginosa*.

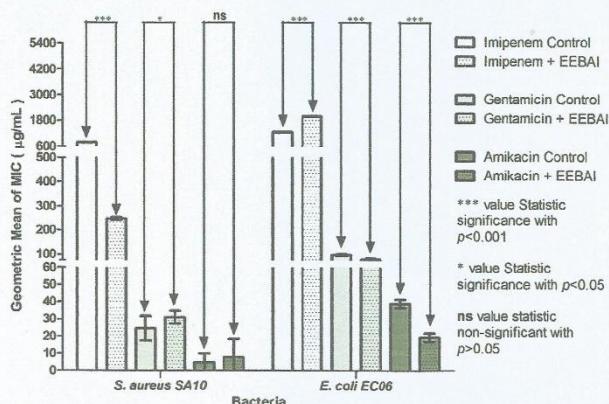


Fig. 4. EEBAI (Ethanol extract of bark from *Azadirachta indica*) in association with antimicrobials against different strains of *E. coli* and *S. aureus*.

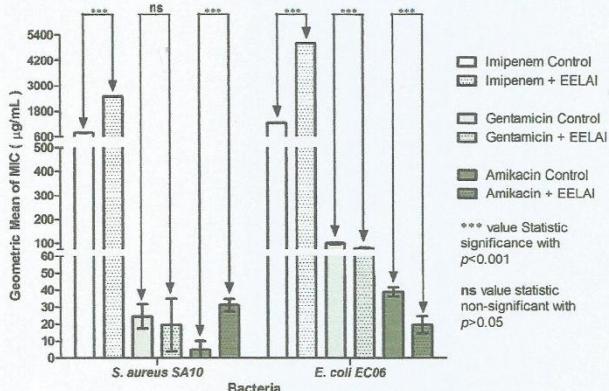


Fig. 5. EELAI (Ethanol extract of leaves from *Azadirachta indica*) in association with antimicrobials against different strains of *E. coli* and *S. aureus*.

against the *E. coli* strains, due to reduction in the MIC of these antibiotics. However, in the tests against *S. aureus* strains, a synergism was observed only when the extract was combined with Imipenem. Interestingly, the combination of EEBAL and Amikacin, caused no modulatory effect compared to the control group and, the combination with Gentamicin caused an antagonistic effect, increasing the MIC of this drug, indicating that, at least for the *S. aureus* strain that was evaluated in our experiments, the extract presented a drug-dependent modulatory effect.

With regard to the modulating effect of the EELAI, a similar profile was observed in the association of this extract with Imipenem, against *E. coli* and *S. aureus*, and in the association of the extract with Amikacin against *S. aureus*. Additionally, there was synergism when the extract was associated with Amikacin and Gentamicin against *E. coli* strains, although no changes were observed in the association of the extract with Gentamicin against the *S. aureus* strains, compared to the control group.

According to the literature, the different profile of effects obtained with the association of natural products (i.e. synergism and antagonism) with Amikacin against multiresistant microorganisms, might be related to induction of changes in the structure of aminoglycosides. Accordingly, hydrophilic molecules originated from an association of an aminocyclitol ring with a glycosidic linkage are currently available and has important clinical application (Magnat and Blanchard, 2005).

Natural products can increase or decrease the effect of antibiotics, and as such, are characterized as modifiers of the antibiotic activity, due to the presence of a great diversity of constituents in their composition. In fact, synergistic effects have been obtained from the association of synthetic drugs and natural products, which can prevent microbial resistance by mechanisms that involve elimination of plasmids and inhibition of efflux pumps. By the other hand, an antagonistic response is usually developed when the constituents present in the extract cause chelation of the antibiotic or bind to specific sites in the antibiotic molecule (Coutinho et al., 2009; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009).

With regard to modulation of the antibiotic activity, our research group have demonstrated that many natural products (including those of both vegetal and animal origin) act as modifiers of the effects of some antimicrobials, altering the activity and thus, reducing the MIC of these drugs (Coutinho et al., 2008; Rodrigues et al., 2009). In this context, natural products work in many ways to cause inhibition of the bacterial growth. Thus, the association of

natural products with antibiotics can interfere with bacterial resistance mechanisms (e.g. β -lactamase activity), increasing the effectiveness of commercial drugs (Miranda-Novales et al., 2006).

The modulatory action of several natural products is associated to the presence of secondary metabolites, such as flavonoids and alkaloids, which can be found in many parts of the plants, such as leaves and stalks. In plants, these metabolites work as defense mechanisms of the vegetal against microorganisms, which might be associated with modulatory activity of these compounds (Ferreira et al., 2009; Coutinho et al., 2009). Finally, the antimicrobial action of gallic acid, quercetin, rutin, coumarin and other compounds identified in the extracts has been previously demonstrated, including: antibacterial, antitumor, cytotoxic, anti-inflammatory, and antioxidant (Zuanazzi, 2000; Coutinho et al., 2009; Aquino et al., 2015; Pereira et al., 2015).

4. Conclusion

Azadirachta indica modulated the activity of antibiotics against multiresistant bacterial strains, which may involve multiple mechanisms of antimicrobial action that result in potentiation of the antibacterial activity of most tested antibiotics, which resulted in a potentiation of the antibacterial activity of the tested antibiotics that was strain and drug-dependent. This differential effect can be attributed to the presence of several compounds, including quercetin, kaempferol, coumarin, gallic acid, catechin and chlorogenic acid. In conclusion, *A. indica* is an important source of substances with the potential to be used in antimicrobial drug development.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aquino, P.E.A., Pereira, N.L.F., Figueiredo, F.G., Ferreira, S.S., Leandro, L.M.G., Souza, J.C.C.O., Souza, J.C.C.O., Oliveira, C.D.M., Santana, J.K.L., Torres, C.M.G., Silva, M.R., Coutinho, H.D.M., Matias, E.F.F., 2015. The association between drugs and herbal products: in vitro enhancement of the antibiotic activity by extracts of dry floral buttons of *Egletes viscosa* L. (maceia). *Eur. J. Integr. Med.* 7, 258–262.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr. Sci.* 82, 1336–1345.

- Boligon, A.A., Kubica, T.F., Mario, D.N., De Brum, T.F., Piana, M., Weiblein, R., Athayde, M.L., 2012. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scaevola buxifolia* Benth extracts. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2229–2239.
- Buttler, M.S., Buss, A.D., 2006. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem. Pharmacol.* 71, 919–929.
- CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 5th ed. NIH, Villanova, PA.
- Carneiro, J.C.O., 2006. *Padrão De Consumo De Antibacterianos Em Uma UTI Geral: Correlação Com a Resistência Bacteriana.* MSc Thesis, Universidade de Brasília, Brasília.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Siqueira-Júnior, J.P., Lima, E.O., 2008. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis mutisii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* —MRSA strains. *Rev. Bras. Farmacol.* 18, 670–675.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., 2009. *In vitro* interference of *Momordica charantia* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. *Pharm. Biol.* 47, 1056–1059.
- Di Stasi, L.C., 2007. *Plantas Medicinais: Verdades E Mentiras O Que Os Usuários E Os Profissionais De Saúde Precisam Saber.* UNESP, São Paulo.
- Dias, M., Monteiro, M.S., 2010. Antibiotics e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. *Cad. Otorrinol. Clin. Invest. Inov.* 1, 1–10.
- Ferreira, F.S., Brito, S.V., Costa, J.G.M., Alves, R.R.N., Coutinho, H.D.M., Almeida, W.O., 2009. Is the body fat of the lizard *Tupinambis merriami* effective against bacterial infections? *J. Ethnopharmacol.* 126, 233–237.
- Figueiredo, E.A.P., Ramos, H., Maciel, M.A.V., Vilari, M.C.M., Loureiro, N.G., Pereira, R.G., 2007. *Pseudomonas aeruginosa:* frequência de resistência a Múltiplos Fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 19, 421–427.
- Francisco, K.S.P., 2010. Phytotherapy: on option in odontological treatment. *Rev. Saúde* 4, 1–7.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* 39, 3107–3113.
- Leandro, L.M.G., Aquino, P.E.A., Macedo, R.O., Rodrigues, F.F.G., Guedes, T.T.M., Frutuoso, A.D., Coutinho, H.D.M., Braga, J.A., Ribeiro, T.R.G., Matias, E.F.F., 2013. Avaliação antibacteriana e modulatória de extratos metanolícios e hexânicos da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. *E ciéncia* 1, 1–15.
- Magnet, S., Blanchard, J.S., 2005. Molecular insights into aminoglycosides action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 477–497.
- Martinez, S.S., 2002. *O Nim—Azadirachta Indica:* Natureza, Usos múltiplos, Produção. IAPAR, Londrina.
- Matias, E.F.P., Alves, E.P., Santos, B.S., Souza, C.E.S.S., Ferreira, J.V.A., Lavor, A.K.I.S., Figueiredo, F.G., Lima, L.F., Santos, F.A.V., Peixoto, F.S.N., Colares, A.V., Boligon, A.A., Saravá, R.A., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., 2013. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. A tool to validate the ethnobiological usage. *Evid. Based Complement. Alt. Med.* 2013, 1–7.
- Matias, E.F.P., 2010. *Avaliação Da Atividade Antibacteriana E Moduladora Da Resistência Bacteriana A Aminoglicosídeos De Extratos Polares E Apolares De Croton Comprestre A. (velame) Ocimum Garitissimum (alfavaca) E Cordia Verbanacea DC. (erva-baleeira).* MSc Thesis, Universidade Regional do Cariri.
- Miranda-Novales, G., Leão-Miranda, B., Pérez, M.Z., Santos, F.S., 2006. *In vitro* activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 1–5.
- Pereira, N.L.F., Aquino, P.E.A., Silva, M.R., Nascimento, E.M., Grangeiro, A.R.S., Oliveira, C.D.M., 2015. Antibacterial and topical anti-inflammatory effect of metanol extract of *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev. Fitoter.* 9, 73–144.
- Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., 2009. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehneri*. *Phytomedicine* 16, 1052–1055.
- Santos, A.L., Santos, D.O., Freitas, C.C., Ferreira, B.L.A., Afonso, I.F., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., 2007. *Staphylococcus aureus:* visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 43, 413–423.
- Von Baum, H., Marre, R., 2005. *Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications.* *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 563–571.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110.
- Winkler, E.U., Santos, T.R., Machado-Neto, J.G., Martinez, C.B., 2007. *Acute lethal and sublethal effects off nem leaf extract on the neotropical freshwater fish of Prochilodus lineatus.* *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 236–244.
- Zuanazzi, J.S.S., et al., 2000. Flavonóides. In: Simões, C.M.O. (Ed.), *Fitoterapia: Da Planta Ao Medicamento.*, 2 ed. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UPSC, Ver. Porto Alegre/Florianópolis.

ANEXO B – Guia para Autores do Periódico *Industrial Crops and Products* (print)

Introduction

Industrial Crops and Products, an International Journal, publishes papers reporting the results of original research, short communications and critical reviews on all aspects of industrial crops and products (defined as non-food/non-feed uses of plants and plant products). This covers a wide range of aspects of cultivation, crop improvement, crop compounds, processing, and integrated chain control, all focusing on the exploitation of agricultural crops for industrial use.

The scope of the journal covers a vast range of crops and research disciplines. Crops should contain significant renewable resources such as:

- Fibres and fibre compounds
- Carbohydrates
- Oils and fatty acids
- Waxes, resins, gums, rubber, and other polymers
- Proteins
- Essential oils for ink, lubricants, plastics, cosmetics
- Biologically active compounds for pharmaceutical, herbicides and insecticides, and preservatives.

Some examples of industrial (non-food/non-feed uses) crops are agave, cassava, crambe, cuphea, elephant grass, fibre hemp, flax, guar, guayule, jojoba, kenaf, lesquerella, maize, meadowfoam, oil palm, peas, plantago, potato, pyrethrum, rape seed, safflower, soybean, Stokes aster, sugar beet, sunflower, vernonia, and wheat.

Papers within the above indicated frame-work will be accepted if they cover or integrate research on:

- Agronomic production and modelling
- Breeding, genetics, and biotechnology
- Post-harvest treatment and storage
- (Bio)process technology
- (Bio)chemistry
- Product testing, development, and marketing
- Economics, and systems analysis and optimization

Types of paper

1. Original research papers (regular papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. We welcome reviews but authors should contact the Editors-in-Chief before submission to ensure appropriateness for publication.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, tables and references).

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

Before you begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or

academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/indcro/>

Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as

possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

Lines should be double-spaced and every line and page should be numbered.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq.

(A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the

file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Try not to over-use abbreviations.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter I.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P <0.05, **P <0.01 and ***P <0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Embed the used fonts if the application provides that option.
 - Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Provide captions to illustrations separately.
 - Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
 - Submit each illustration as a separate file.
- A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full.

Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only

need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/industrial-crops-and-products>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith , R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

After acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).