



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

NARA LUANA FERREIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR DA
RESISTÊNCIA BACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *EUGENIA UNIFLORA* L. E
EUGENIA JAMBOLANA LAM. EM ASSOCIAÇÃO COM AS LUZES DE LED**

FORTALEZA – CEARÁ

2017

NARA LUANA FERREIRA PEREIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR DA RESISTÊNCIA BACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *EUGENIA UNIFLORA* L. E *EUGENIA JAMBOLANA* LAM. EM ASSOCIAÇÃO COM AS LUZES DE LED.

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: Prof.^a Dr^a Maria Izabel Florindo Guedes

Coorientador: Prof. Dr. Edinardo Fagner Ferreira Matias

FORTALEZA - CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Pereira, Nara Luana Ferreira.

Avaliação in vitro do potencial antibacteriano e modulador da resistência bacteriana do óleo essencial *Eugenia Uniflora* L. e *Eugenia Jambolana* Lam. em associação com as luzes de led. [recurso eletrônico] / Nara Luana Ferreira Pereira. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 87 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, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

Coorientação: Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias.

1. Atividade antibacteriana. 2. Atividade moduladora. 3. Concentração inibitória mínima. 4. Antibióticos. *Eugenia uniflora*. 5. *Eugenia jambolana*.
I. Título.


NARA LUANA FERREIRA PEREIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR DA RESISTÊNCIA BACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL *EUGENIA UNIFLORA* L. E *EUGENIA JAMBOLANA* LAM. EM ASSOCIAÇÃO COM AS LUZES DE LED.

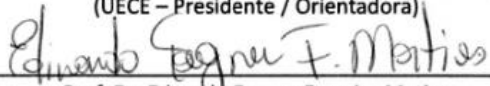
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 13 de abril de 2017.


BANCA EXAMINADORA



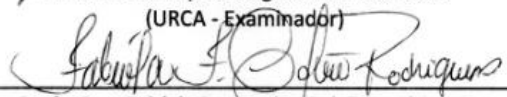
Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
(UECE – Presidente / Orientadora)



Prof. Dr. Ednardo Fagner Ferreira Matias
(Centro Univ. Dr. Leão Sampaio
Coorientador / Examinador)



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
(URCA - Examinador)



Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
(Centro Univ. Dr. Leão Sampaio - Examinadora)

Dedico a meus pais, José André Pereira (*In memoriam*) e Maria Luciene Ferreira, ao meu Esposo Romário Gonçalves da Silva por me apoiarem em minhas escolhas e me ajudarem a conquistá-las, e ao meu Filho Benício que hoje é a minha maior motivação para realizar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir alcançar mais uma conquista e me fazer perceber a cada dia o quanto sou capaz de lutar pelos meus ideais.

Aos meus pais, José Andre Pereira (*In memoriam*) que mesmo não estando presente em corpo, mas sua alma me deu forças para nunca desistir mediante os obstáculos e Maria Luciene Ferreira, por ter assumido o papel de mãe, pai, irmã e, sobretudo amiga, sendo o alicerce na construção das minhas conquistas, transmitindo-me conhecimentos que jamais encontraria em nenhum livro e título adquirido.

Ao meu esposo Romário Gonçalves da Silva, por me apoiar em todas as minhas escolhas, fazendo-se presente em todos os momentos me ajudando em cada conquista e atribuindo a mim um potencial que por vezes desconheço.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias, por não medir esforços para transmitir seus conhecimentos e por ter me ajudado no momento em que mais precisei, dando-me a possibilidade para realização de toda a pesquisa.

Ao Prof.Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, por ter gentilmente nos recebido de outra instituição estando disposto a nos ajudar independente de qualquer intercorrência, aceitando todas as nossas limitações e disponibilizar laboratórios, incentivar nos experimentos e compartilhar conosco todo conhecimento necessário assumindo um papel não só de mestre mas de amigo, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Francisco Cunha pela ajuda com os óleos e material didático pa realização desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues- URCA, Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho- URCA, por participarem da minha banca de Exame de Qualificação e Defesa da Dissertação.

À coordenação de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio Prof^a. Ma. Ana Ruth Sampaio Granjeiro pela disponibilidade do laboratório para a realização dos experimentos.

A minha companheira fiel de laboratório Maria Karollyna do Nascimento Silva por toda dedicação e disponibilidade para me ajudar durante e após os experimentos.

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Maria Izabel Florindo Guedes. Coordenação, à secretária do Curso de Mestrado em Biotecnologia e aos demais professores do Curso de Pós-Graduação, por toda transmissão de conhecimentos e receptividade que tiveram com o pessoal do Cariri.

Ao meu grande amigo Pedro Everson Alexandre de Aquino, mesmo que distante se disponibilizou para me ajudar durante todo este mestrado, compartilhando suas experiências e conhecimentos com toda paciência e dedicação.

Aos meus amigos José Geraldo, Janyketchuly e Najla por tornarem os momentos difíceis em prazerosos e saudosos.

Aos colegas da Pós-Graduação, por termos juntos vencidos mais um desafio onde ficaram laços inesquecíveis.

RESUMO

Eugenia uniflora (OEEu) e *Eugenia jambolana* (OEEj) destacam-se por seu potencial antibacteriano, citotóxico, antiinflamatório, dentre outras atividades associadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana do OEEu e OEEj associados às luzes de LED azul e vermelho. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo com as cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para avaliação da atividade moduladora dos antibióticos foram utilizadas as metodologias de microdiluição em placas com os aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) os quais foram diluídos seriadamente nos poços contendo o meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* – BHI a 10% e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o OEEu e OEEj na concentração subinibitória (CIM/8). A atividade moduladora também foi avaliada pelo método contato gasoso sem exposição às luzes de LED com os antibióticos aminoglicosídeos (amicanina, gentamicina e eritromicina), onde os microorganismos de cepas multirresistentes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) foram semeados em placas de Petri contendo BHI e os óleos diluídos em DMSO. Pelo método de modulação por contato gasoso com exposição das placas às luzes de LED azul e vermelho foram utilizados os antibióticos fluoroquinolonas (ciprofloxacino e norfloxacino) e cepas de bactérias multirresistentes (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). A caracterização dos componentes químicos foi realizada através Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa – CG-MS onde foram obtidos como componentes majoritários o Isofurano-germacreno com o percentual de 61,69% e α -pinene com 48,09% para OEEu e OEEj respectivamente. Na avaliação da CIM dos óleos essenciais o crescimento de todas as linhagens bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* padrão testadas apresentaram valores de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Para as linhagens multirresistentes de *S. aureus* o OEEu mostrou uma CIM $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ e com o OEEj teve CIM $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ e frente a *E. coli* dois óleos apresentaram CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Nos testes de modulação por microdiluição quando combinado o OEEu com a amicacina e a gentamicina frente a *S. aureus* e *E. coli* foi

observado uma redução na atividade antibiótica. Exceto, na combinação do óleo com a gentamicina frente a *E.coli*, onde houve antagonismo. No entanto, na combinação dos antibióticos amicacina e gentamicina com OEEj frente às bactérias *E.coli*, foi possível observar sinergismo. No teste de modulação através do contato gasoso sem exposição ao LED com OEEU e OEEj combinado com a eritromicina, foi observado aumento de halo indicando antagonismo frente às bactérias *P.aeruginosa*. Na modulação através do contato gasoso com exposição ao LED com OEEu e OEEj houve sinergismo em todos os testes quando associados aos antibióticos e a luz de LED azul. Entretanto, ao associar os antibióticos com os óleos e as luzes de LED frente às bactérias testadas, houve indiferença nos testes, com exceção do efeito antagônico da associação do antibiótico norfloxacino, OEEj e luz de led azul. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas para elucidar os efeitos antagônicos e sinérgicos desses produtos.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Atividade moduladora. Concentração inibitória mínima. Antibióticos. *Eugenia uniflora*. *Eugenia jambolana*.

ABSTRACT

Eugenia uniflora (OEEu) and *Eugenia jambolana* (OEEj) stand out for their antibacterial, cytotoxic and anti-inflammatory potential, among other associated activities. Thus, this work aimed to evaluate the antibacterial activity and modulator of bacterial resistance of OEEu and OEEj associated with blue and red LED lights. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the oils was determined by broth microdilution method with the standard and multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. To evaluate the modulating activity of the antibiotics, plaque microdilution methodologies with the aminoglycosides (gentamicin and amikacin) were used, which were serially diluted in the wells containing the Brain Heart Infusion Broth - BHI 10% culture medium and the suspension with the inoculum Of the multidrug resistant strain, with OEEu and OEEj in the subinhibitory concentration (MIC / 8). The modulating activity was also evaluated by the gaseous contact method without exposure to LED lights with aminoglycoside antibiotics (amicanin, gentamicin and erythromycin), where microorganisms from multiresistant strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) were seeded in Petri dishes Containing BHI and the oils diluted in DMSO. The fluoroquinolone antibiotics (ciprofloxacin and norfloxacin) and strains of multiresistant bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) were used by the gaseous modulation method with exposure of the plates to the blue and red LED lights. The characterization of the chemical components was carried out through Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry - CG-MS where Isofuran-germacrene with 61.69% and α -pinene with 48.09% for OEEu and OEEj respectively. In the MIC evaluation of essential oils the growth of all bacterial strains of *S. aureus* and *E.coli* standard tested showed MIC values $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. For *S. aureus* multiresistant strains, OEEu showed a MIC $\geq 256 \mu\text{g} / \text{mL}$ and with OEEj it had MIC $\geq 128 \mu\text{g} / \text{mL}$ and, in contrast to *E.coli*, the two oils presented MICs $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. In the microdilution modulation tests when OEEu was combined with amikacin and gentamicin against *S. aureus* and *E. coli*, a reduction in antibiotic activity was observed. Except in the combination of the oil and the gentamicin against *E.coli*, where there was antagonism. However, in the combination of the antibiotics amikacin and gentamicin with

OEEj against E.coli bacteria, it was possible to observe synergism. In the modulation test through the gaseous contact without LED exposure with OEEU and OEEj combined with erythromycin, an increase of halo indicating antagonism against P.aeruginosa bacteria was observed. In the modulation through the gaseous contact with LED exposure with OEEu and OEEj there was synergism in all the tests when associated with the antibiotics and the blue LED light. However, when antibiotics were associated with the oils and LED lights against the tested bacteria, there was indifference in the tests, with the exception of the antagonistic effect of the combination of the antibiotic norfloxacin, OEEj and blue led light. Thus, further research is needed to elucidate the antagonistic and synergistic effects of these products.

Keywords: Antibacterial activity. Minimum inhibitory concentration. Modulating activity. Antibiotics. LED. *Eugenia uniflora*. *Eugenia jambolana*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Foto do arbusto <i>Eugenia uniflora</i>	25
Figura 2 –	Foto das folhas e frutos da <i>Eugenia jambolana</i>	26
Figura 3 –	Aparelho de LED.....	43
Figura 4 –	Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de microdiluição (Amicacina e Gentamicina) do OEEu.	52
Figura 5 –	Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de microdiluição (Amicacina e Gentamicina) do OEEj...	53
Figura 6 –	Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de contato gasoso (Amicacina, Gentamicina e Eritromicina) do OEEu.....	54
Figura 7 –	Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de contato gasoso (Amicacina, Gentamicina e Eritromicina) do OEEj.....	55
Figura 8 –	Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao LED (ciprofloxacino) do OEEu.....	57
Figura 9 –	Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao LED (Norfloxacino) do OEEu.....	59
Figura 10 –	Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao led (ciprofloxacino) do OEEj.....	59
Figura 11 –	Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao led (norfloxacino) do OEEj.....	60
Quadro 1 –	Radiação e frequência de cada cor.....	31
Quadro 2 –	Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição química do OEEu expressa em percentual.....	47
Tabela 2 –	Composição química do OEEj expressa em percentual.....	48
Tabela 3 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos Óleos essenciais da <i>Eugenia unifora</i> e <i>Eugenia jambolana</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
102	Oxigênio Singleto
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (Síndrome da Imunodeficiência adquirida)
AM	Azul de toluidina
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosine
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
CE	Estado do Ceará (Brasil)
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM/8	Concentração subinibitória
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E6	Acridinas e conjugados de clorina
EC	<i>Escherichia coli</i>
FS	Fotossensibilizador
g	Grama
GaAs	Arsenieto de gálio
GaP	Fosfeto de gálio
HIA	Heart Infusion Agar
L	Litro
LED	Light Emitting Diode
Mg	Micrograma
mg/mL	Miligramas de soluto por mililitro de solvente
ml	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimol
Na_2SO_4	Sulfato De Sódio Anidro
Nm	Nanômetro
p	Nível de significância
PACT	Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana)
RB	Rosa de bengala
RGB	Red, green and blue
RNA	Ácido ribonucléico
$Rt(min)$	Tempo de retenção por minuto
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
TBO	Azul de toluidina
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
URCA	Universidade Regional do Cariri

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	GERAL.....	20
3.2	ESPECÍFICOS.....	20
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
4.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	21
4.2	FAMÍLIA <i>MYRTACEAE</i>	22
4.3	O GÊNERO <i>EUGENIA</i>	22
4.4	<i>EUGENIA UNIFLORA</i> L.	23
4.5	<i>EUGENIA JAMBOLANA</i> LAM.....	26
4.6	ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>EUGENIA</i>	27
4.7	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
4.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	29
4.9	LUZ DE LED	30
4.9.1	Principais diferenças entre LED e LASERS.....	32
4.9.2	Tipos de LEDs aplicados nos tecidos humanos.....	32
4.9.2.1	LEDterapia.....	33
4.9.2.2	Terapia fotodinâmica.....	33
4.10	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	35
4.11	BACTÉRIAS.....	38
4.11.1	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	38
4.11.2	<i>Escherichia coli</i>.....	38
4.11.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	39
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICAS DAS PLANTAS.....	41
5.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS.....	41
5.3	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS POR CG/EM.....	41

5.4	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	41
5.4.1	Linhagens bacterianas.....	41
5.5	IRRADIAÇÃO POR LUZES DE LED.....	42
5.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS AMINOGLICOSÍDEOS.....	43
5.7	MODULAÇÃO DOS AMINOGLICOSÍDEOS.....	44
5.8	TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA POR CONTATO GASOSO.....	45
5.9	TESTE DA ATIVIDADE MODULADORA POR CONTATO GASOSO COM EXPOSIÇÃO AO LED.....	45
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS.....	47
6.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	49
6.3	MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA.....	51
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE.....	81
	APÊNDICE A – Artigo publicado.....	82

1 INTRODUÇÃO

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Onde o reino vegetal, através das plantas tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (GILIOLI, 2010).

As plantas medicinais passaram a representar a primeira fonte de substâncias para desenvolvimento de novos medicamentos desde o início do século XIX (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Dessa forma, os produtos naturais ganharam uma considerável importância na indústria farmacêutica, podendo ser observado que, mesmo em países industrializados, cerca de 45% dos produtos farmacêuticos são provenientes de produtos naturais (CASTRO, 2004).

No Brasil, as pesquisas com etnobotânica vêm crescendo nas últimas décadas, apesar de que em alguns países as plantas medicinais merecem maior reconhecimento quanto as suas propriedades como no norte brasileiro (PERNA; LAMANO-FERREIRA, 2014).

No entanto, com o avanço da tecnologia e o aumento da resistência antimicrobiana aos medicamentos convencionais comercializados, além dos efeitos colaterais causados por estes, aumenta necessidade de se buscar novas substâncias a partir dos produtos naturais e alternativas terapêuticas (OESTERHELT *et al.*, 2005).

Nesse contexto, os óleos essenciais também chamados de óleos voláteis obtidos a partir dos materiais vegetais (flores, folhas, sementes, frutas, raízes, etc) são alvos de pesquisa pela atividade antimicrobiana associada, documentada desde 1974 (GUENTHER, 1974). Onde estas pesquisas buscam a atividade dos seus constituintes químicos e a atividade exercida pelo mesmo (BURT, 2004; VERAS, 2011).

A família Myrtaceae é bastante interessante do ponto de vista químico e farmacológico, e muitas espécies desta família são utilizadas na medicina popular. As espécies do gênero *Eugenia*, um dos maiores gêneros desta família, são alvo de pesquisas pelo seu potencial terapêutico, mostrando em vários estudos resultados promissores, como atividade antiinflamatória, antibacteriana, citotóxica e antitumoral.

Entretanto, dentre as 400 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia*, menos de 10 % foram estudadas quimicamente e biologicamente (MAGINA, 2008).

A utilização da luz de LED também está relacionada ao efeito antimicrobiano, tratamento para cicatrização tecidual e infecções cutâneas, acreditando poder existir para algumas classes bacterianas um recurso alternativo amplamente utilizado na área dermatofuncional. Apesar deste mecanismo não estar bem esclarecido, já é utilizado como a partir de espectros de luz azul e vermelha (MEYER, 2010).

Tendo em vista registros na literatura comprovando algumas atividades biológicas apresentadas por *Eugenia uniflora*, *Eugenia jambolana* e o aparelho de LED, resolveu-se analisar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais, efeito modulador frente a antibióticos por contato direto e gasosobem como comparar quando associado ao uso do aparelho de LED com as luzes vermelho e azul frente às bactérias.

2 JUSTIFICATIVA

Diferentes plantas já possuem suas atividades biológicas confirmadas cientificamente, porém, faz-se necessário o incentivo de pesquisas a fim de descobertas de novas substâncias ativas salientando a importância da propriedade antibacteriana, já que é comum o constante aumento de microrganismos patogênicos resistentes a diferentes antimicrobianos atualmente disponíveis na prática clínica (NADER, 2010).

Visto que as espécies do gênero *Eugenia* são bastante utilizadas na medicina popular, investigar as propriedades antibacteriana das espécies *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambolana*, bem como sua capacidade de interação com outras técnicas de controle microbiano e a atividade bactericida associada ao uso da luz de LED, pode-se tornar uma ferramenta importante para a pesquisa de novas práticas terapêuticas ainda não exploradas e novos medicamentos derivadas de produtos naturais.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana do óleo essencial de *Eugenia uniflora* e *Eugeniajambolana* associados às luzes de LED.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Obter os óleos essenciais a partir das folhas das espécies em estudo;
- b) Identificar a composição química dos óleos essenciais através da Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas- CG-EM;
- c) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais frente a bactérias da linhagem padrão e multirresistente de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- d) Verificar a atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos por microdiluição dos óleos frente às bactérias multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- e) Avaliar a atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos por contato gasoso dos óleos frente às bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- f) Determinar e comparar a atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas, por contato gasoso dos óleos frente às bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com exposição às luzes de LED azul e vermelha.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais para fins de tratamento é uma prática comum desde os primórdios da humanidade, onde o conhecimento sobre tais plantas simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico e ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais (MACIEL *et al.*, 2005).

Mesmo com a evolução constante da medicina, o uso de plantas terapêuticas segue ainda como prática comum pela humanidade, desde os tempos mais remoto se essa prática vem sendo repassada para as gerações mais modernas. Sua utilização é influenciada, principalmente, pelo fácil acesso e pela tradição familiar e cultural desse tipo de tratamento (VEIGA-JUNIOR, 2008) associados com efeitos negativos causado pelo uso abusivo de medicamentos sintéticos (RATES, 2001).

As plantas medicinais são de grande importância desde os tempos antigos, pois foi através destas que obtiveram as primeiras formas terapêuticas para serem utilizadas em diversos tratamentos (CARVALHO; SILVEIRA, 2010; FEIJÓ *et al.*, 2012).

O efeito farmacológico que essas plantas têm deve-se à presença de princípios ativos em seus componentes (SANTOS *et al.*, 2012), que quando devidamente estudados, podem ser caracterizados e assim serem melhor utilizados como forma terapêutica (LORENZI; MATOS, 2008).

O Brasil tem a vantagem de contar com uma flora exuberante e uma grande área fértil, o que permite indicar que, qualquer que seja a política nacional com relação à pesquisa científica, ela deve sempre levar em consideração a necessidade de estudar os fito compostos presentes na diversidade vegetal e animal brasileira. Com isso se tem a garantia da preservação tanto das espécies que já são objeto de prospecção científica quanto para aquelas que podem no futuro, apresentar potencial para isso (ELVIN-LEWIS, 2001).

Grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, onde preparações vegetais são comercializadas com

rotulação industrializada. Normalmente essas preparações não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, muitas vezes, plantas da flora nativa (VEIGA JUNIOR, 2008).

4.2 FAMÍLIA MYRTACEAE

A Família *Myrtaceae* é a maior família da ordem *Myrtales*, considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira em função da larga ocorrência de espécies comestíveis e produtoras de frutas e pela utilização na medicina tradicional (PLAZA *et al.*, 2007). Possui aproximadamente 100 gêneros dentre eles o gênero *Eugenia*, compreendendo 3000 espécies e destas 1000 estão situadas no Brasil. Esta família está presente em todo o mundo por serem plantas tropicais ou subtropicais com maior dispersão Américas e Austrália (SCHUTZ, 1980).

Desta família, os gêneros mais importantes são *Psidium* (Goiabeira), *Myrciaria* (Araçá), *Marlierea* (Cambucá), *Campomanesia* (Guabiroba), *Paivaea* (Cambuci), *Syzigiume Eugenia* (Pitangueira), a qual pertence a espécie em estudo neste trabalho (JOLY, 2002).

Na taxonomia das Mirtáceas distinguem-se as subfamílias *Myrtoideae* e *Leptospermoideae*. A separação das duas subfamílias foi estabelecida com base na estrutura e consistência dos frutos, sendo *Leptospermoideae* representada pelos frutos secos predominam na Austrália e tem nos eucaliptos seus representantes mais conhecidos. *Myrtoideae* possuem frutos carnosos representada pelas espécies que se concentram, principalmente, na América do Sul (MARCHIORI; SOBRAL, 1997).

No Nordeste, pode-se citar dentre as espécies frutíferas dessa família a jabuticabeira, jambeiro, guabirobeira, pitangueira e araçazeiro, as quais possuem além do potencial para exploração econômica dos frutos o uso farmacêutico das folhas e de outras partes das plantas, devido o potencial das substâncias antioxidantes e óleos essenciais que podem ser extraídos (FRANZON *et al.*, 2010).

4.3 O GÊNERO EUGENIA

Em média de 400 espécies são pertencentes ao gênero *Eugenia* sendo considerado um dos maiores gêneros da família Myrtaceae. A distribuição dá-se desde o Brasil até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai (FISCHER *et al.*, 2005; CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999).

As plantas deste gênero *Eugenia* têm como características árvores ou arbustos verdes durante o ano todo. O fruto é esférico, geralmente comestível, uma baga de até 3 centímetros de diâmetro, coroado pelo cálice e achatado nas extremidades (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

Muitas espécies deste gênero são apreciadas pelos frutos, os quais são usados como alimento, a exemplo de *Eugenia uniflora*, uma das espécies mais conhecidas do gênero, chamada popularmente de “pitangueira”, *Eugenia edulis*, conhecida como jaboticaba, *Eugenia jambolana*, conhecida como jambolão, e *Eugenia brasiliensis*, conhecida como grumixama (FISCHER *et al.*, 2005).

4.4 EUGENIA UNIFLORA L.

Eugenia uniflora conhecida popularmente como pitangueira e “Brazilian cherry”, é originada desde o Brasil Central até o norte da Argentina, estando praticamente estendida por todo território brasileiro e em outras partes do mundo visto que se adapta favoravelmente às diferentes condições climáticas e edáficas (BEZERRA *et al.*, 2000; DONADIO *et al.*, 2002; LIMA, 2002).

É uma árvore, com altura entre 3 a 12 m apresentando um tronco tortuoso, com manchas claras acinzentadas, com diâmetro de até 40 cm. E quando cultivada de forma isolada a copa apresenta forma arredondada. Os frutos são bagas globosas, coroadas pelo cálice persistente, com os pólos achatados e dotados de 7 a 8 sulcos no sentido longitudinal. Ao iniciar o processo de maturação, as frutas podem aparecerem com as cores alaranjadas ou avermelhadas (FRANZON, 2004).

Os frutos dessa espécie são ricos em vitaminas com um importante potencial para exploração econômica (BEZERRA *et al.*, 2000). A composição centesimal dos frutos da pitangueira consta de água (90%), resíduo mineral (0,28%), lipídios (0,23%),

proteínas (0,76%), fibras (2,10%), carboidratos totais (8,26%) e valor calórico (30 kcal100g-1), com teor de vitamina A de 990 mcg 100g-1 (VISOTTO, 2006).

Além disso, é uma das espécies estudadas que apresenta, em curto prazo, maior potencial para cultivo na região, pois há trabalhos adiantados de seleção de clones (FRANZON, 2004). Atualmente, há em torno de 150 genótipos, dentre os quais muitos poderiam ser testados para verificar as possibilidades de serem propagados como cultivares comerciais.

As flores são caracterizadas como do tipo Papaver, generalistas, com grãos de pólen como único recurso floral atrativo para os polinizadores, sendo enquadrado dentro da categoria de “flores-pólen”, o que é característico das plantas desse gênero (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Quanto as folhas, estudos apresentam que a lâmina foliar das folhas adultas é glabra, membranácea, concolor a discolor. As folhas são simples, ovaladas, providas de pontos translúcidos que são observados contra fonte luminosa (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Referente ao amplo potencial biológico das folhas dessa espécie são utilizadas na medicina tradicional como diurético, antimicrobiano e antifúngico. Os extratos dessas folhas também se mostram eficientes no tratamento de algumas enfermidades como febre, doenças estomacais, hipertensão, obesidade, reumatismo, bronquite, antiinflamatórias, dentre outras (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A tradição popular atribui algumas qualidades terapêuticas às infusões feitas com as folhas verdes dessa espécie, representando uma fonte potencial de produção de óleo essencial voltada para indústrias de cosméticos (GALLINA; REHEM, 2013), alimentícias e medicinais (ALMEIDA; FARIA; SILVA, 2012). As folhas ao passarem pelo processo de trituração têm a quantidade de óleo essencial extraída, isso ocorre porque alguma estrutura das folhas é rompida e também acontece a ruptura das células tendo a facilidade na sua extração (MAYA; MORAIS; PINHEIRO, 2007).

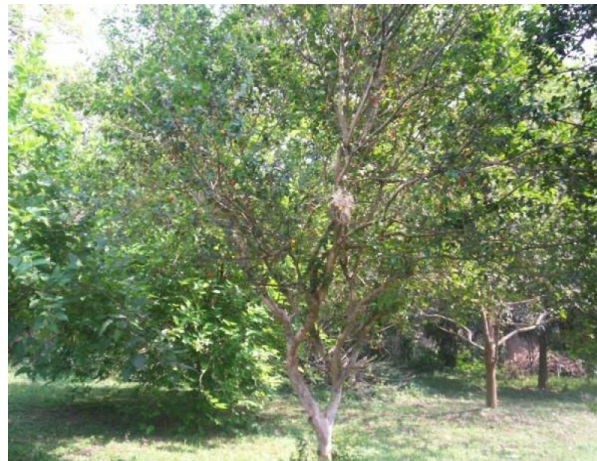
As sementes de *Eugenia uniflora* L. (Figura 1), têm importante atividade antioxidante, apresentando ácidos graxos insaturados no seu óleo e teor de compostos fenólicos totais (LUZIA; BERTANHA; JORGE, 2010). Os antioxidantes têm bastante relevância, pois tem a capacidade de diminuir ou retardar a oxidação de ácidos graxos,

lipídeos e entre outros tipos de moléculas, isso ocorre através da sua função inibitória na iniciação ou pela propagação de reações de oxidação interligadas (CAMARGO, 2007). Tendo auxílio da presença de flavonoides e taninos (AURICCHIO *et al.*, 2007). Também sendo rica em fósforo, cálcio, antocianinas, vitamina C, carotenoides e flavonóides (SILVA, 2008), e polifenóis (NASCIMENTO, 2013). Tendo também os carboidratos como um nutriente encontrado nesse fruto (BAGETTI *et al.*, 2009).

Estando totalmente relacionada ao tratamento de diversos distúrbios, como os distúrbios gastrointestinais, atividade antiinflamatória, antimicrobiana e também atua na estratégia de hipoglicemiante (SOARES, 2011), por inibir as enzimas α - glicosidase, sucrase e maltase (AURICHCHIO; BACCHI, 2003).

Os sucos desse fruto também são consumidos frequentemente, pois são enriquecidos em elementos como as pectinas e fibras, sendo elas compostas por uma matriz de formato irregular (ONGARATTO; VIOTTO, 2016). As fibras têm uma ação bastante viável, pois tem ação no trânsito intestinal, ajudando na redução da absorção de colesterol, lipídeos e carboidratos, relatando que as pectinas são fontes de fibras (CAMARGO, 2007), e estão correlacionadas hemicelulose, celulose e lignina (LIMA, 2007).

Figura 1 - Foto do arbusto *Eugenia uniflora*



Fonte: <http://www.pmf.sc.gov.br/>

4.5 EUGENIA JAMBOLANA LAM

O Jambolão (*Syzygiumcumini*(L.), que tem como sinônimos *Eugenia jambolana* (Lam.), *Myrtuscumini* L., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC e *Eugenia cumini* Druce é pertencente a família *Mirtaceae* nativa da Índia oriental, conhecida pela medicina popular indiana pelos efeitos hipoglicemiantes causados pela planta. (MARCHIORI; SOBRAL, 1997).

Possui folhas ricas em taninos e saponinas e as cascas, folhas e sementes são bastante adstringentes o que é associado a presença de Taninos onde estes são substâncias poliméricas fenólicas capazes de curtir couro ou precipitar gelatinam solução, sendo utilizada contra diarréias crônicas, disenteria e menorragia. A decocção da casca é um eficaz enxaguante bucal no tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais. Quanto ao fruto, é utilizado o suco como adstringente, diurético, antidiabético e estomáquico (KAPOOR, 1990).

No Brasil, também é utilizada por pacientes diabéticos sendo cultivada como planta ornamental. Variando a utilização de acordo com os costumes regionais, dentre os inúmeros usos de espécies de *Syzygium* destaca-se o de seu efeito anti-hiperglicêmico (TEIXEIRA *et al.*, 2000), antiinflamatório e antimicrobiano (DJIPA *et al.*, 2000; DORMAN; DEANS, 2000; SHAFI *et al.*, 2002). A forma que os chás e extratos são administrados também varia de acordo com os princípios etnobotânicos. Onde a literatura relata extratos aquosos, hidro-alcoólicos e alcoólicos em diversas proporções, feitos a partir de folhas verdes ou secas, de casca, de frutos, de sementes e, até mesmo, de botões florais (FALKENBERG *et al.*, 2002) (Figura 2).

Figura 2 – Foto das folhas e frutos da *Eugenia jambolana*



Fonte: <http://www.imraratsimamanga.org>

4.6 ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *EUGENIA*

Em média de 400 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* menos de 10% foram estudadas quimicamente e biologicamente. Das que foram analisadas, flavonóides e triterpenóides são os compostos que se destacam nas espécies do gênero *Eugenia*, sendo também encontrados chalconas e taninos (GILIOLI, 2010).

Este gênero é bastante rico em compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, o que compete às espécies pertencentes a este gênero uma importante atividade antioxidante (EINBOND *et al.*, 2004). Da *E. caryophyllata* ou cravo-da-india taninos hidrolisáveis foram isolados (TANAKA *et al.*, 1996), de *Eugenia uniflora* (LEE *et al.*, 1997) e de *Eugenia jambos* de onde foi isolado a casuarinina do extrato acetônico das folhas (YANG; LEE; YEN, 2000).

Também foi descrito pra esse gênero os triterpenos e esteroides que são compostos derivados do metabolismo dos terpenos, onde se destacam os triterpenospentacíclicos com o esqueleto lupano, oleanano e ursano (GILIOLI, 2010).

4.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais encontrados nas plantas são caracterizados como líquidos lípidos e voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos que possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides. São compostos que possuem diferentes propriedades relacionadas à sobrevivência e a defesa contra microorganismos dessas espécies vegetais dentre estas, ação como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros e insetos indesejáveis (BAKKALI *et al.*, 2008; STIEVEN *et al.*, 2009).

Estes óleos ainda são utilizados como perfumes, flavorizantes e conservantes desde a antiguidade (BAUER; GARBE, 2001). Sendo alvo de estudos centrados no uso de óleos essenciais de plantas e seus respectivos constituintes químicos como agentes com atividades biológicas significativas (RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). No entanto, suas atividades biológicas variam de acordo

com o genótipo da planta, origem geográfica, condições agronômicas ambientais, estação no ano, método de extração desse óleo e sua conservação, entre outros.

Dos 3.000 óleos essenciais reconhecidos, em média de 300 são importantes, principalmente para as indústrias farmacêutica na síntese de vitaminas, hormônios, antibióticos e antissépticos, no setor agronômico, alimentícia, e principalmente para fabricação de cosméticos e perfumes. Onde as drogas vegetais ricas em óleos essenciais são empregadas *in natura* para a preparação de infusões ou de outras formas preparações simples (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais variam de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, onde um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores concentrações e alguns em pequenas quantidades (SIMÕES *et al.*, 2007).

A família Myrtaceae se destaca dentre as famílias que concentram seus elementos voláteis nas folhas com centena de gêneros e cerca de 3.500 espécies distribuídas por todo o mundo, preferencialmente nas zonas tropicais e subtropicais da América e Austrália (JOLY, 2002).

Dos gêneros mais importantes quatro se destacam na família: *Eucalyptus*, *Melaleuca*, *Eugenia* e *Psidium*; fazendo parte dos dois últimos a goiabeira (*Psidium guajava*), um dos tipos de araçazeiro (*Psidium widgrenianum*) e a árvore de jambolão, jamelão ou azeitona (*Eugenia jambolana*, reclassificado como *Syzygium cumini*) (SIANI, 2000).

Dentre algumas atividades os de coctos de *Eugenia jambos* (jambo) e de *Eugenia uniflora* (pitanga) demonstraram atividade anti-inflamatória, diminuição do trânsito intestinal, aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital. Além disso, testes farmacológicos demonstraram em animais a partir do extrato dessa planta o uso folclórico em determinadas regiões como agente anti-hipertensivo. O extrato de folha de *Eugenia uniflora* ainda é recomendado popularmente contra a patologia gota além de ter o efeito antioxidante. (CONSOLINI *et al.*, 1999; SCHMEDA-HIRCHMANN *et al.*, 1987; CORRÊA; PENA, 1984).

No entanto, apesar de um largo espectro de atividades biológicas já ter sido descrito para os óleos essenciais, (principalmente a atividade antimicrobiana), existem poucos estudos sobre a atividade antiinflamatória desses compostos (GIL *et al.*, 1989; SIANI *et al.*, 1999). Sendo que a maior aplicação biológica é descrita sobre atividade antimicrobiana.

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas medicinais têm sido alvos de pesquisas quanto à atividade antimicrobiana que algumas espécies apresentam. Visto que, muitos países possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na sua utilização como Brasil, Cuba, Índia, México e Malásia (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

A etnobotânica é a ciência que estuda a história e relação das plantas com a sociedade, sendo importante ferramenta na procura de substâncias naturais relevantes para ação terapêutica. No entanto, a dificuldade de coleta, o uso diferente das plantas em diversas culturas, questões éticas envolvidas, limitam as investigações das propriedades terapêuticas destas substâncias (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; PERNA; LAMANO-FERREIRA, 2014)

Os extratos, óleos essenciais, frações de látex e proteínas, são os principais produtos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana e por isso as comunidades consideram estas substâncias como alternativas para cura de processos infecciosos sendo importantes fontes de novos compostos biologicamente ativos (MATOS, 2000; BASTOS, 2007).

Quanto aos óleos essenciais, possuem compostos que na grande maioria representam uma extensão de ação antimicrobiana do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos. A maior parte dos trabalhos sobre atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais descritos na literatura especializada, versam sobre este aspecto (JANSSEN *et al.*, 1987).

4.9 LUZ DE LED

O LED é um semicondutor (junção P-N) que ao ser energizado emite luz monocromática através de uma fonte elétrica denominada de eletroluminescência, ao ocorrer recombinações de lacunas e elétrons em qualquer junção polarizada. Dessa forma, a energia existente no elétron é liberada em forma de calor ou fótons de luz (SCHUBERT, 2003).

Os dispositivos a base de LEDs vêm ganhando cada vez mais espaço no mercado de iluminação visto que possuem um valor inferior quando comparado aos sistemas laser de maior coerência e também a outros tipos de fontes luminosas (MOREIRA, 2009).

Quando os elementos básicos dos transistores e diodos são compostos de arsenieto de galio (GaAs) e fosfeto de galio (GaP) o número de fótons de luz emite fótons de luzes bastante eficiente, o que ocorre de forma diferente quando os compostos são de silício e germano onde a maior parte de energia é gerada em calor (BOYLESTAD, 2004).

A cor da luz monocromática depende do cristal e da impureza da dopagem com que o aparelho é fabricado. Dessa forma, arsenieto de gálio emite radiações infravermelho, com fósforo a emissão pode ser verde ou amarelo e com o uso de outros materiais consegue produzir luzes azul, violeta e ultra-violeta. As luzes brancas são emitidas de emissores azuis revestido de camadas de fósforo que absorvem a cor azul e emite luz branca. Os LEDs que emitem diferentes cores são chamados de RGB onde possuem três chips com um microcontrolador integrado com emissão de diferentes cores em um mesmo aparelho (MARTELETO, 2011).

Os LEDs operam com nível de tensão dependendo do estado sólido variando de 1,6 a 3,3V. Com mais de 3V funcionam LEDs azuis, violeta e ultravioleta, menos de 1,5 LED vermelho e as demais luzes nesse intervalo de 1,6 a 3,3 V (MARTELETO, 2011).

Portanto, o nitrato de gálio é utilizado para produzir LEDs vermelhos, e fosfato de gálio os azuis. Os LEDs utilizados comercialmente feitos de nitreto de gálio

capazes de emitir luz na faixa do azul ao ultravioleta têm um comprimento de onda de quase 365 nanômetros quase na faixa de infravermelho (COSTA, 2005).

A aplicação do dispositivo no estado sólido no tratamento de lesões pré-malignas e malignas, a LEDterapia está ganhando força a cada dia em diferentes áreas: engenharia biomédica, odontologia, fisioterapia, estética, dentre outras (MOREIRA, 2008).

O Quadro 1 a seguir apresenta a frequência e o comprimento de cores equivalente a cada cor. Sendo que a profundidade de penetração da luz nos corpos está diretamente relacionada ao comprimento de onda, ou seja, quanto maior o comprimento de onda mais profundo é seu poder de penetração. Por isso se faz necessário, antes de iniciar a aplicação das luzes de LED, se faz necessário definir algumas variáveis e calcular o tempo de aplicação (MOREIRA, 2009).

Quadro 1 – Radiação e frequência de cada cor

RADIAÇÃO VISÍVEL EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA, COMPRIMENTO DE ONDA E COR		
MATERIAL	COMPRIMENTO DE ONDA	FREQUÊNCIA (10^{12} Hz)
VERMELHO	780-622	384-482
LARANJA	622-597	482-503
AMARELO	597-577	503-520
VERDE	577-492	520-610
AZUL	492-455	610-659
VIOLETA	455-390	659-769

Fonte: Moreira (2009).

A utilização dos emissores de luz está se expandido rapidamente e uma ampla faixa de cores têm sido desenvolvidas, conforme as informações do NIST (National Institute of Standards and Technology). Visto que a aplicação do diodo emissor é utilizada com diferentes finalidades, a exatidão se aproxima cada vez mais de acordo com a aplicabilidade, apesar das discrepâncias nos parâmetros relatadas pelos fabricantes devido a fonte de luz ser bastante diferente das lâmpadas convencionais (TSAO, 2002).

4.9.1 Principais diferenças entre LED e LASERS

As diferenças quanto às funções de LED e LASERS podem ser observadas quanto a escolha de aplicação em tecidos humanos, sendo desta forma considerados fontes de luz relativamente diferentes (CORAZZA,2005).

O LED tem uma fonte de radiação incoerente, emitindo luzes com diferentes comprimentos de onda, em uma determinada faixa, dependendo da cor da luz emitida pelo mesmo. Enquanto o laser emite radiações coerentes com uma única cor e um único comprimento de onda (ALMEIDA, 2014).

Quanto ao custo benefício, o LED é considerado economicamente conveniente, por apresentar menor custo e maior flexibilidade tendo maior abrangência na modificação de tecidos biológicos por possuir radiação incoerente bem como aumenta com o espectro de atuação. Dessa forma, os lasers estão sendo substituídos pelo LED devido este permitir um tratamento não agressivo, indolor e de baixo custo com respostas de tratamento significativas (SANTOS; GOMES FILHO; NICOLAU, 2012).

Portanto, apesar dos lasers serem mais pontuais e possuírem mais rápido tempo de cura, não podem ser aplicados em toda área de tecidos devido a penetração nestes inadequadas por conta do comprimento de onda e direcionalidade, além dos fatores térmicos que podem gerar. O que de forma diferente ocorrem com o LED que além de não fornecerem energia suficientes para gerar danos aos tecidos, fornecem energia suficiente para estimular a nível celular e assim obter respostas de cura ao paciente, e dependendo do tipo de terapia pode resultar em um tratamento mais rápido (MOREIRA, 2009).

4.9.2 Tipos de LEDs aplicados nos tecidos humanos

Dentre as técnicas utilizadas como auxílio ou como até mesmo cura através do uso de LED em pacientes que necessitam de reparação tecidual, rejuvenescimento e processo de cicatrização destacam-se: Terapia fotodinâmica e LEDterapia (XAVIER, 2010).

4.9.2.1 LEDterapia

Dentre as diferentes utilizações dos LEDs, estes podem ser aplicados no tratamento terapêuticos para auxílio de cicatrização na pele através da aplicação local com comprimento de onda específico potência e tempo determinado; tratamento de lesões para pacientes diabéticos normalizando os processos químicos e biológicos; tratamento de lesões para pacientes hemofílicos auxiliando na produção de fatores da coagulação ausentes no sangue; tratamento de câncer em procedimentos fotossensíveis e utilizando a luz para destruição de células cancerígenas (MOREIRA *et al.*, 2008).

A intensidade dos feixes de luzes os quais são emitidos pelos LEDs na pele é mais baixa que os lasers. Sendo que a luz emitida por LEDs de cor vermelha (622-780nm) auxilia na multiplicação celular, enquanto o de cor azul (455-492 nm) atua como efeito bactericida e de rejuvenescimento através de um processo denominado estresse oxidativo onde o oxigênio remove os elétrons da camada mais externa das moléculas que formam as bactérias (MACEDO, 2015).

Quanto à interação da luz com tecidos biológicos vários mecanismos biofísicos estão envolvidos, onde, estão inseridos nas categorias térmicas, mecânicas, fotoquímicas, fotoablativos onde estes provocam uma ruptura intramolecular sem causar lesões nas cadeias de polímeros.

4.9.2.2 Terapia fotodinâmica

A Terapia fotodinâmica (TFD) consiste na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz denominado de fotossensibilizador (FS) seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado (GAD *et al.*, 2004).

Na presença do oxigênio, o FS ativado reage com moléculas presentes através de transferência de elétrons ou hidrogênio formando radicais livres (reação tipo I) u por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II) o que leva a produção de oxigênio singlete. Este reage com quase todos os componentes celulares uma vez

que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à ação de $1O_2$. Como a primeira barreira para o $1O_2$ é a membrana celular e está contêm lipídeos insaturados que podem ser danificados, ocorre a inviabilidade celular. Sendo que, qualquer destes metabolismos pode causar a morte do tecido através da destruição celular (DEMIDOVA, 2005).

Este tipo de tratamento tem como vantagens citadas, sua efetividade teoricamente em todos os tipos de câncer, dispensar a especificidade dos agentes quimioterapêuticos e a radiação ionizante; procedimento pode ser repetido várias vezes, quando necessário, por não possuir efeitos tóxicos cumulativos e não invasivo. Além disso, devido ao seu baixo risco, pode ser usado em pessoas idosas ou que estão debilitadas demais para serem submetidas a uma cirurgia (CAPELLA; CAPELLA, 2003).

Microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus também podem ser destruídos por um processo denominado Inativação Fotodinâmica (“PDI, Photodynamic Inactivation”) ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (“PACT, Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy”) através da luz visível depois de tratamento com um FS apropriado e luz (WAINWRIGHT, 1998).

Raab há mais de cem anos observou a toxicidade do hidrocloreto de acridina contra *Paramecium caudatum* publicando o seu o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos (eosina e alaranjado de acridina) contra microrganismos. Von Tappeiner também relatou que esses efeitos tóxicos não se deviam apenas à presença da luz e criou o termo “reação fotodinâmica”. Após aproximadamente 20 anos após Policard publicou as primeiras observações clínicas, demonstrando a técnica em bactérias, vírus e protozoários bem antes da Segunda Guerra, mas foi abandonada devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina.

No entanto, a disseminação da AIDS devido ao HIV e o enorme crescimento das infecções hospitalares devido às bactérias resistentes aos fármacos garantiu o retorno da aplicação antimicrobiana de FS na última década (PERUSSI, 2007).

Visto que, como a evolução microbiana é muito mais rápida que a do homem ocorrendo recentemente nos hospitais, a terapia FS age na via de produção de oxigênio singlete, não interferindo na resistência microbiana natural, assim, bem como não importando se a cepa é resistente a uma ou muitas classes de agentes antibacterianos

(por ex. *Staphylococcus aureus* são resistentes à metilina), dado que o FS é capturado pelo micróbio (WAINWRIGHT, 2002).

Os fotossensibilizadores que têm sido estudados para erradicação de microrganismos pertencem a diferentes grupos de compostos, por ex., os xantenos halogenados tais como Rosa de Bengala (RB), fenotiazínicos tais como azul de toluidina O (TBO) e azul de metileno (AM) (Figura 4), acridinas e conjugados de clorina (e6) (WAINWRIGHT, 2002).

A PDI é uma proposta para tratamento antibacteriana alternativa podendo ser efetiva também para vírus e fungos bem como para infecções localizadas através de aplicação local do FS na área infectada através da tópica, instilação, injeção intersticial ou aerosol. Através dos efeitos in vivo, foi demonstrado que a PDI reduz significativamente os micróbios com pequeno efeito nos queratinócitos, sendo assim, considerada uma alternativa segura para o tratamento antimicrobiano convencional (HAMBLIN *et al.*, 2004; ZEINA *et al.*, 2002).

As diferenças estruturais nas paredes das células bacterianas podem explicar a eficiência da inativação bacteriana maior em bactérias Gram-positivas as quais são geralmente mais susceptíveis à PDI enquanto as espécies Gram-negativas significativamente resistentes a diferentes fotossensibilizadores comumente usados em TFD de tumores. Espécies Gram-positivas capturam o corante mais facilmente e sendo destruídas, enquanto bactéria Gram-negativas as quais possuem uma membrana externa complexa além das duas bicamadas lipídicas funcionam como uma barreira física e funcional (MAISCH *et al.*, 2005).

4.10 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência de patógenos a antimicrobianos é considerada um dos grandes problemas de saúde pública, e vem evoluindo rapidamente se tornando cada vez mais preocupante (MENDONÇA *et al.*, 2016; LOPES, 2009). O maior índice de infecção ocorre principalmente em ambiente hospitalar, e essa situação por muitas vezes chega a causar a mortalidade de muitas pessoas (MEYER; PICOLI, 2011), já que a maior

frequência ocorre entre patógenos potencialmente perigosos (BRITO; CORDEIRO, 2012).

Este tema 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. Tal aumento de resistência dos microrganismos aos antibióticos comumente usados é, atualmente, uma preocupação da saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos (LEANDRO *et al.*, 2013).

Existem classes de antibióticos que são frequentemente utilizados nas infecções hospitalares, como os β -lactâmicos, os quais constituem os derivados de primeira classe mais utilizados, mesmo após vários anos de descoberta da penicilina, no entanto a ocorrência da resistência vem aumentando gradativamente. O principal mecanismo de resistência nos β -lactâmicos, está na produção de enzimas denominadas β -lactamases ou as proteínas ligadoras da penicilina que sofrem alterações em suas estruturas levando à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Entre as diversas classes de antibióticos, os aminoglicosídeos, são as classes que mais sofre ação de resistência microbiana. Sendo assim, os principais meios de resistências à concentração utilizada do antibiótico, alterações mutagênicas ou estruturais nas enzimas. Em relação ao crescimento da resistência dos microrganismos patogênicos, é visto que é preciso a utilização de substâncias antimicrobiana mais eficiente e que tragam benefícios aos respectivos pacientes e que ao mesmo tempo não apresente toxicidade (SOBRAL *et al.*, 2016).

Quanto à classe das fluoroquinolonas, o alto consumo destes, bem como os erros quanto a sua utilização, tem aumentado os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da resistência bacteriana a esta classe de antibióticos. Dentre os diferentes mecanismos de resistência associado a essa classe incluem: alterações na DNA girase e topoisomerase IV sendo sítios ativos dos quinolonas; impermeabilidade

de membrana e hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo diminuindo o acúmulo de antibiótico no interior da célula bacteriana (MINARINI, 2008).

Em humanos e em animais têm sido descritos casos de fotossensibilidade relacionado ao uso de fluorquinolonas. É reconhecido que fluorquinolonas multiplamente fluorinados e 8-halogenados são potencialmente e severamente fototóxicos (Martinez *et al.*, 2005).

O ciprofloxacino é um potente antibiótico pertencente a esta classe o qual possui um amplo espectro de atividade. É eficaz para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas sua ação é bem demonstrada para microrganismos como os *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PANUTTI, 2001; SANTOS, 2001). Apesar de estudos apresentarem que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* apresentam mecanismos de resistência adquirida através da alteração dos alvos das fluoroquinolonas (MAHON; LEHMAN; MANUSELIS, 2007).

As bactérias Gram-negativas apresentam múltiplos mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos. Linhagens multirresistentes expressam enzimas capazes de provocar alterações na estrutura do antibiótico fazendo-o perder a sua funcionalidade através de reações como a acetilação, poliadenilação e fosforilação. Mecanismos como bomba de efluxo expulsa o antibiótico do o espaço periplasmático, impedindo-o que atinja o seu local de ação. As porinas, presentes na membrana plasmática das bactérias, são proteínas que formam canais com água; rege a entrada de alguns elementos, incluindo antibióticos, mudanças na conformação pode levar a membrana externa não permite a passagem de esses agentes para o espaço periplásmico (TAFUR *et al.*, 2008).

As bactérias Gram-positivas possuem ausência da membrana celular externa em que resulta numa maior sensibilidade a muitos antibióticos. Entretanto, os mecanismos de defesa e o desenvolvimento de resistência que conferem atividade contra os antibacterianos estão presentes tanto em microrganismos do ambiente como em microrganismos patogênicos (CAUMO *et al.*, 2010).

A situação atual da resistência às drogas tem sua origem em muitos fatores, incluindo a seleção de mutantes resistentes por exposição a agentes antimicrobianos, transferência de determinantes genéticos de resistência entre cepas bacterianas e

disseminação clonal de cepas resistentes entre pacientes hospitalizados e entre instituições hospitalares. Como consequência está o aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes, a redução do número de drogas utilizáveis por futuras gerações de pacientes, além do impacto econômico trazido pelos custos com infecções (MCGOWAN JR, 2004).

Substâncias que modulam ou revertem à resistência bacteriana a certos antibióticos são chamados de modificadores da atividade antibiótica, tendo como exemplos os produtos naturais de origem vegetal, como extratos e fito constituintes. Estes alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de e fluxo (GIBBONS, 2004).

4.11 BACTÉRIAS

4.11.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae e possui cerca de 33 espécies, sendo a *S. aureus* a espécie de maior interesse médico. Esta é uma bactéria Gram-positiva, de forma esférica (cocos), muito encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis, podendo causar diferentes patologias, que vão desde uma simples infecção como espinhas e celulites até infecções graves como pneumonia e meningite (SANTOS *et al.*, 2007).

A bactéria *S. aureus* apresenta grau variável de sensibilidade a antimicrobianos de amplo espectro de ação como *Staphylococcus aureus* intermediário a vancomicina(VISA), *Staphylococcus aureus* resistente a metilina/oxacilina (MRSA/ORSA), o que tem aumentado os custos nos hospitais, resultando em internação prolongada, bem como a necessidade de antimicrobianos de maior custo e medidas adicionais de controle de infecção.

4.11.2 *Escherichia coli*

A *E.coli* é uma bactéria pertencente à Família *Enterobactereacea*, O gênero *Escherichia*, compreende cinco espécies, das quais *Eschericia coli* é considerada a espécie de maior importância clínica. Bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, que se localiza principalmente na microbiota intestinal de seres humanos e de animais de sangue quente (FERREIRA, 2009).

Cerca de 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e extraintestinais. Ela é o agente etiológico mais comum em infecções do trato urinário acometendo principalmente mulheres e crianças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Sendo também considerada como principal causadora de infecções entéricas causada pela água e alimentos contaminados, principalmente em grupos populacionais que não dispõem de sistema de saneamento, ou se apresentam vulneráveis como os idosos e crianças imunocomprometidos (VIEIRA *et al.*, 2004).

O mecanismo de resistência da *Escherichia coli* atua causando alterações nos canais de porfina, as quais são proteínas da membrana, formam canais que permitem a passagem das moléculas dificultando a entrada do antibiótico na célula (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

4.11.3 Pseudomonas aeruginosa

O gênero *Pseudomonas* constitui a família denominada *Pseudomonadaceae*, os membros desta família caracterizam-se como bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos, a maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo oxidase positivos (MATA, 2007).

Pseudomonas aeruginosa pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade e dessa forma, posicionando-se entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares (NOGUEIRA *et al.*, 2009)

Além disso, outra característica marcante e preocupante desta espécie é a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência em um único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos. Esse microrganismo pode apresentar resistência

natural ou adquirida a grande número de antibióticos utilizados na prática clínica (NEVES *et al.*, 2011).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICAS DAS PLANTAS

Os materiais botânicos foram coletados na cidade do Crato, estado do Ceará – Brasil sendo comparado com uma exsicata existente no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, onde foram identificados como espécies de *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambolana* sob registro nº 12361 e 3107 respectivamente.

5.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

As extrações dos óleos essenciais das folhas frescas de *Eugenia uniflora* (OEEu) e *Eugenia jambolana* (OEEj) foram realizadas pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho tipo *Clevenger*, onde as folhas foram trituradas e colocadas em um balão de vidro de 5,0 L juntamente com de 2,5 L de água destilada, permanecendo em ebulição por 2 horas. Foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) aos óleos essenciais obtidos após extração e estes foram armazenados sob refrigeração (-4 °C) para conservação até as análises serem realizadas.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS POR CG/EM

A análise da composição química dos óleos essenciais obtidos foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) em aparelho *Shimadzu*. A identificação dos componentes foi realizada pela comparação de seus espectros de massa com os padrões relatados na literatura (ADAMS, 2007).

5.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.4.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas as linhagens bacterianas (Quadro 2) padrão de *Escherichia coli* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25853 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* EC 06, *Staphylococcus aureus* SA 358 e *Pseudomonas aeruginosa* PA 03. Para os testes disco-difusão em ágar, as linhagens foram suspendidas em tubo de ensaio com água destilada para obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^5 UFC/mL).

Quadro 2 – Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Instituto Oswaldo Cruz	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	Instituto Oswaldo Cruz	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9027	Instituto Oswaldo Cruz	-
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	Ferida Cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 03	Secreção nasal	Cf, Cfp, Cfd, Caz, Lv, Im Mero, Pip
<i>Escherichia coli</i> EC 06	Urina	Cf, Ca, Clx, Amp, Nor, Lm, Cip, Lv, Of, Ampisul

Legenda: Amp – Ampicilina; Ampisul – Ampicilina-sulbactam; Ami – Amicacina; Amox – Amoxicilina; Ca – Cefadroxil; Cfc – Cefaclor; Cf – Cefalotina; Clx – Cefalexina; Caz – Ceftazidima; Cfp – Cefepimo; Cfd – Ceftaridima; Cip – Ciprofloxacina; Im – Imipenem; Can – Canamicina; Lm – Lomefloxacina; Lv – Levofloxacina; Tob – Tobramicina; Of - Ofloxacina; Oxa – Oxacilina; Gen – Gentamicina; Mero – Meropenem; Nor – Normofloxacina; Neo – Neomicina; Para – Paramomicina; Pip – Piperacilina; But – Butirosina; Sis – Sisomicina; Net – Netilmicina.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 IRRADIAÇÃO POR LUZES DE LED

O aparelho utilizado durante o procedimento experimental foi *Light Emithing Diodes- LED*, que é um diodo emissor de luz, da marca Dermaled®. O qual possui os espectros de luz vermelha, azul e âmbar, permitindo também a combinação destas cores. As luzes utilizadas foram azul, com um comprimento de onda pré-determinado

pelo aparelho, de 470 nm luz azul e a luz vermelha 625 nm. Para realização desta Cada placa recebeu irradiação no período de dez minutos com luz azul e vermelha (Adaptado por LOPEZ *et al.*, 2001) (Figura 3).

Figura 3 – Aparelho de LED



Fonte: Elaborada pela autora.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS AMINOGLICOSÍDEOS

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços com diluições em série 1:1 (NCCLS, 2003) Culturas microbianas mantidas em ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo BHI de infusão de cérebro e coração mantidas em (BHI) e incubadas a 35°C durante 24 h. Após esse período, procedeu-se a padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão em BHI, cuja turvação fosse similar ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^5 UFC/mL) de cepas padrão e multirresistente. Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em meio BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo 1×10^4 UFC/mL, da qual foi retirado 100 μ L e adicionado em cada poço da placa acrescido de diferentes concentrações do OEEu e OEEj.

As soluções dos óleos testados foram preparadas separadamente utilizando 10 mg das amostras solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração, realizaram-se diluições em água destilada estéril para obter uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL (COUTINHO *et al.*, 2008).

Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24 h. Após esse período, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina. Esta solução foi preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µg/mL da solução indicadora foi acrescentada nas placas em cada cavidade e após uma hora em temperatura ambiente foi realizada a leitura do teste. Esta é determinada através da coloração do meio de cultura, sendo considerada positiva para os poços que não apresentaram crescimento microbiano, ou seja, permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT *et al.*, 2001).

O controle negativo do teste foi realizado com os meios de cultura contendo somente o inóculo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente.

5.7 MODULAÇÃO DOS AMINOGLICOSÍDEOS

A realização da atividade moduladora dos antibióticos foi feita com os aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) a partir da utilização de cepas de bactérias multirresistentes onde a concentração correspondeu a 1.024 µg/mL. Os antibióticos foram diluídos em um volume de 100 µL seriadamente nos poços contendo o meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* – BHI a 10% e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o OEEu na concentração subinibitória (CIM/8) (COUTINHO *et al.*, 2010). As concentrações finais 512 a 0,5 µg/mL foram dos antibióticos no meio de cultura, onde as placas foram incubadas por 24 horas 24 h a 35 ± 2 °C utilizando a resazurina sódica para evidenciar a atividade moduladora.

5.8 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA POR CONTATO GASOSO.

Para a realização atividade moduladora por contato gasoso em placas de petri contendo BHI, foi utilizada a metodologia modificada por (INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001). Para a semeadura dos microrganismos foram utilizadas placas de petri contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) ágar. O óleo essencial foi diluído em DMSO para obtenção de soluções contendo 50; 25; 12,5 e 6 e 3% deste composto e também foram utilizadas suas concentrações de 100%. Discos de papéis semelhantes os de antibiograma foram colocados nas tampas das placas sendo 10 µL do óleo acrescentados no disco. Para determinação dos halos de inibição, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicatas e para determinação dos halos foram utilizadas régua milimetrada. Para realização do controle foram utilizadas placas somente com o tensoativo DMSO.

Foram utilizados discos de antibióticos: amicacina, gentamicina e eritromicina. As placas foram invertidas e 10 µL da maior concentração onde houve crescimento nos testes de atividade antibacteriana foram acrescentados nas tampas permitindo que a partir da volatilização ocorra a interação com os discos. As demais placas foram preparadas sem o óleo contendo os discos e foram incubadas 24h a 37°C. A inibição pela ação dos antibióticos na presença e ausência dos compostos testados foi analisada através de uma régua milimetrada para medição dos halos e assim foi possível determinar o sinergismo ou antagonismo. Os testes foram realizados em triplicatas e para controle foram utilizadas placas com DMSO.

5.9 TESTE DA ATIVIDADE MODULADORA POR CONTATO GASOSO COM EXPOSIÇÃO AO LED

Para a realização destes testes foi utilizada a mesma metodologia modificada por (INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001), referente ao teste de avaliação da moduladora por contato gasoso. No entanto, os antibióticos utilizados foram da classe dos quinolonas (ciproflaxacino e norfloxacino). As placas de petri foram

subdividas em três grupos. Onde o primeiro foi submetido à luz de LED azul durante dez minutos, o segundo grupo submetido à luz de LED vermelha durante dez minutos cada placa. O terceiro grupo não foi submetido às luzes de led. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h para a realização da leitura dos testes.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos dados foram realizadas no software *Graph Pad Prism 5*. A análise estatística foi feita empregando a Two-Way ANOVA seguida do teste de Bonferroni como *post hoc*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS

A análise de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa – CG-MS (Tabela 1 e 2) mostram os percentuais dos fitoconstituintes dos óleos essenciais estudados. No OEEu o preponderantemente majoritário é o isofurane-germacrene com um percentual de 65,80 %, já no OEEj o componente majoritário foi o α -pinene com 48,09%.

Tabela 1 - Composição química do OEEu expressa em percentual

Componentes	Rt(min)	(%)
(Z)- β -elemenoo	8,98	0,39
Germacreno B	9,46	2,19
Isofurane-germacrene	10,36	65,80
Y-elemeno	11,20	3,97
β -elemenono	11,70	4,47
Germacra-3, 7,9-trien-6-one	12,96	16,19
Otherconstituents		6,09
Total(%)		99,1

Legenda: Rt= tempo de retenção (minutos)% = porcentagem do componente

Fonte: Elaborada pela autora.

Em estudo realizado por Lopes (2008), o qual realizou a identificação da composição química do óleo obtido das folhas de *Eugenia uniflora* no decorrer das quatro estações, foi observado a presença de: δ -elemenno, β - elemeno, alo-aromadendreno, (E)-cariofileno , Y-elemene, germanecreno B, germanecreno A, germacrona, viridiflorol e curzereno, sendo este ultimo o composto marjoritário. Assim, sendo todos estes compostos sesquiterpenos, sendo viridiflorol e curzerenosesquiterpenos oxigenados.

Ainda no mesmo estudo, foi possível observar que o componente germacrona está presente em todas as amostras coletadas de *Eugenia uniflora* o que pode está associado a atividade antimicrobiana (LOPES *et al.*, 2008).

Dessa forma, dados na literatura confirmam que a pitangueira é rica em sesquiterpenos, inclusive oxigenados, como germacrona, curzereno, furanodieno, entre

outros, e tem atraído a atenção da comunidade científica no estudo de seus efeitos anticancerígeno (SANTOS *et al.*, 2014), sendo assim considerado como composto bioativo, apresentando também a atividade antimicrobiana bem como utilizadas no tratamento de hepatite causadas por endotoxinas (WANG *et al.*, 2001).

Tabela 2 – Composição química do OEEj expressa em percentual

Componentes	Rt(min)	%
Hexanol	879	0.93
α -pinene	939	48.09
β -pinene	980	2.45
β -myrcene	991	0.86
α -terpinene	1016	0.04
Limonene	1031	1.39
δ -terpinene	1062	0.13
Nonalol	1103	6.76
Linalool	1098	3.57
isoborneol	1156	0.05
borneol	1166	0.16
α -terpineol	1189	1.94
tetradecane	1221	0.38
nerol	1228	7.15
geraniol	1255	0.72
(E,Z)-2,4-decadienal	1295	1.14
eugenol	1356	0.08
geranylacetate	1383	3.15
ionone	1387	1.47
damascone	1411	0.93
caryophyllene	1418	1.42
α -humulene	1451	1.25
nerolidol	1564	8.73
caryophyllene oxide	1581	3.54
globulol	1583	1.09
α -cadinol	1649	0.51
Total (%)		97.93

Legenda: As proporções relativas dos constituintes do óleo essencial foram expressas em percentagem.

R^a Índices de retenção experimental

R^b Índice de Retenção a partir da literatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da análise química do óleo das folhas de *Eugenia jambolana* realizada por Feitosa *et al.*, (2011), foi possível detectar a presença de hidrocarbonetos monoterpênicos alfa-pineno, (Z)-beta-ocimeno, (E)-beta-ocimeno e aloocimeno como os composto marjoritários. Morais (2015) também obteve a substância alfa-pineno como predominante na avaliação fitoquímica do óleo. Estes resultados são semelhantes aos obtidos nesse estudo, onde apresentou também α -pinene como componente majoritário para esta espécie.

Dessa forma, são diferentes compostos químicos que esta planta possui, o que varia com as diferentes estruturas de sua anatomia e suas diferentes aplicações na medicina tradicional, sendo no óleo essencial (α - e β -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocineno, *trans*-ocineno, γ -terpineno, acetato de bornila, α -copaeno, α -humuleno e candineno) nas sementes encontrados taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico), quercetina, antimelina, materiais resinosos e glicose, nas cascas foram encontrado ácido acetiloleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina, nas folhas foram encontrados ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina, nos frutos foram encontradas antocianidinas e nas flores foi encontrado ácido oleanólico (MIGLIATO *et al.*, 2006).

Já foi demonstrado em trabalhos anteriores que os monoterpenos, oxigenados ou não, são capazes de destruir a integridade celular, inibir a capacidade respiratória e atrapalhar o transporte iônico através das membranas celulares de bactérias (DEBA *et al.*, 2008).

6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Na avaliação da atividade antibacteriana do OEEu, por meio de microdiluição para *S.aureus* linhagem multirresistente, mostrou uma CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ e com o OEEj teve CIM ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para as linhagens padrão não houve diferenças no potencial antimicrobiano entre o OEEu e o OEEj por este método tendo obtido uma CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Já na avaliação da atividade antibacteriana do OEEu e OEEj para

E.coli e *P. aeruginosa* tanto para linhagens padrão como multirresistente foi obtido CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos Óleos essenciais da *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambolana*

ÓLEOS ESSENCIAIS	EC06	EC- ATCC9027	SA358	SA- ATCC25923	PA- 03	PA- ATCC25853
OEEu	512	≥ 1024	≥ 256	512	512	512
OEEj	256	≥ 1024	≥ 128	512	512	512

Legenda: OEEu – Óleo essencial da *Eugenia uniflora*; OEEj – Óleo essencial da *Eugenia jambolana*.
 EC- *Escherichia coli*, SA – *Staphylococcus aureus*, PA- *Pseudomonasaeruginosa*
 Fonte: Elaborada pela autora.

Este resultado é considerado importante, visto que, que *S. aureus* é uma das principais bactérias causadoras de infecções no homem, podendo atingir diversos tecidos e órgãos, com manifestações das mais brandas às mais invasivas e severas.

Em um estudo realizado por Lopes (2012), o óleo essencial da *Eugenia uniflora* apresentou atividade antibacteriana moderada contra *E.coli* e não foram ativas contra *S.aureus* o que de forma diferente ocorreu neste estudo.

A maior resistência causada pela *E.coli* na presença do produto testado pode ser justificado pelo fato das bactérias Gram-negativas apresentarem uma membrana externa a qual forma um envelope tornando-se mais resistentes à ação de produtos naturais e demais antimicrobianos (OLADIMEJI; ORAFIDIYA; OKEKE, 2004; HOLLEY; PATTEL, 2005).

Paroul (2004), ao avaliar a atividade antimicrobiana com o óleo essencial da planta *Eugenia uniflora* através da metodologia de antibiograma em discos, obteve efeitos positivos para bactérias Gram-positivas como *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis* sugerindo a atividade antimicrobiana do produto. Porém frente às bactérias Gram-negativas esta atividade foi considerada baixa quando comparada a outros óleos, principalmente em relação ao espectro de ação, pois não mostrou eficácia sobre nenhuma das bactérias Gram-negativas testadas.

Em outro estudo, os óleos essenciais de dezessete espécies de mirtáceas foram testados contra seis microorganismos, entre bactérias e fungos. Os melhores resultados revelaram as boas inibições do crescimento de *Staphilococcus aureus* semelhante a este estudo e *S. epidermidis* (LIMBERGER *et al.*, 1998).

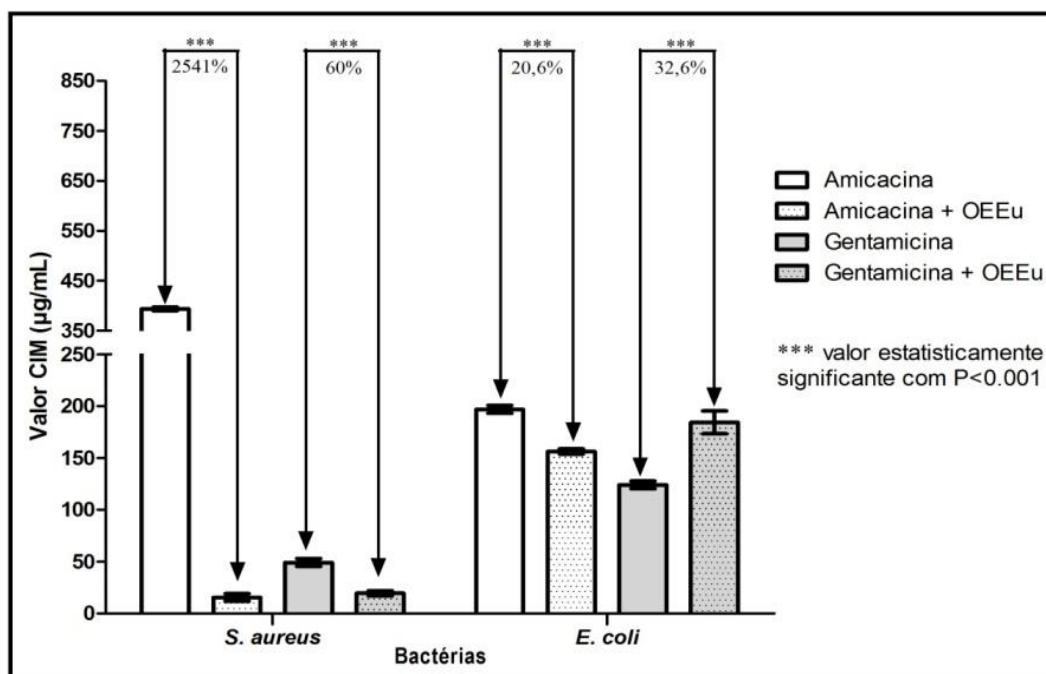
Através da mesma metodologia utilizada neste estudo resultados relevantes frente a *S. aureus* também foram obtidos por Veras (2011) onde o óleo essencial da *Lippiasidoide* timol com uma CIM de 128 µg/mL.

Matias (2010), ao trabalhar com o extrato hexânico de *Cordiaverbenacea* apresentou uma CIM de 128µg/mL frente a linhagem multirresistente de *Escherichia coli*, o que difere da atual pesquisa que obteve resultados irrelevantes para frente a esta bactéria.

6.3 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

Nos testes de modulação da resistência bacteriana pelo método de microdiluição, quando combinado o OEEu com a amicacina e a gentamicina frente a *S. aureus* e *E.coli* foi observada uma redução na concentração dos antibióticos frente as bactérias testadas, indicando sinergismo. Exceto, na combinação do óleo com a gentamicina frente a *E.coli*, houve um aumento da CIM indicando efeito antagônico (Figura 4).

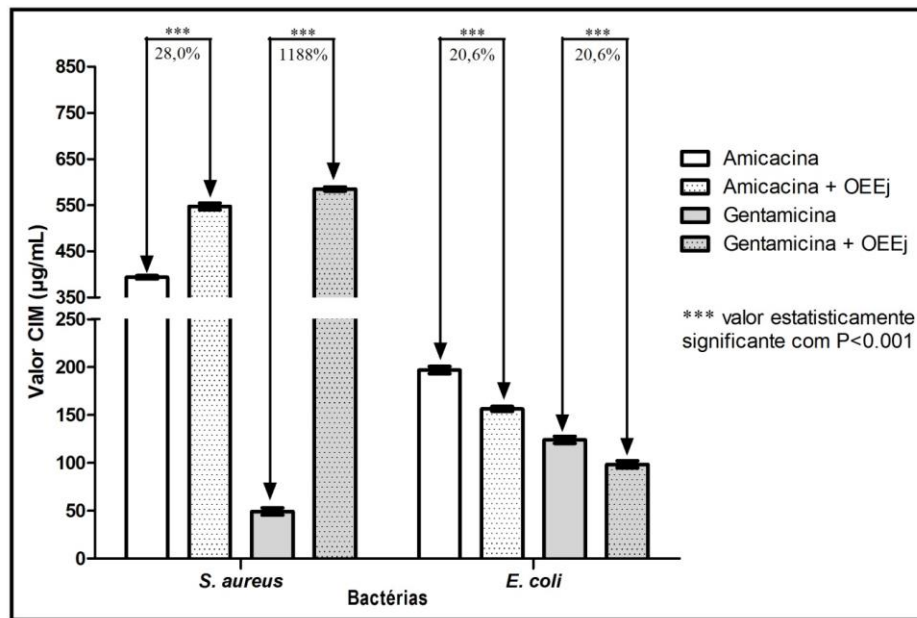
Figura 4 – Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de microdiluição (Amicacina e Gentamicina) do OEEu



Fonte: Elaborada pela autora.

Na combinação dos antibióticos amicacina e gentamicina com OEEj (Figura 5) frente às bactérias *E.coli*, foi possível observar a redução na concentração de antibióticos. No entanto, para *S.aureus* houve um aumento na CIM sendo observado antagonismo, ou seja, um aumento da concentração dos antibióticos frente a estas bactérias testadas.

Figura 5 – Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de microdiluição (Amicacina e Gentamicina) do OEEj



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar dos óleos essenciais apresentarem maior eficácia e sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos contra as bactérias Gram-positivas, neste teste foi possível observar que o óleo melhorou a atividade do antibiótico frente à bactéria Gram-negativa. Esta propriedade de certa maneira representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos (SILVA FILHO *et al.*, 2012)

Além disso, o sinergismo frente a bactérias gram-negativas pode estar associado à natureza lipofílica dos óleos essenciais, permitindo atravessar a parede celular e a membrana plasmática, rompendo a estruturada parede de diferentes polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, tornando-as permeáveis pela perda de íons e potencial de membrana e colapso de bomba de potássio (LOPES *et al.*, 2008)

De acordo com a pesquisa realizada por Sianiet *al.*, (2000) o óleo de *E. jambolana* é eficaz no controle da reação tardia de origem bacteriana, o que sugere a utilidade do deste óleo no controle do processo inflamatório acompanhado a de determinadas infecções bacterianas.

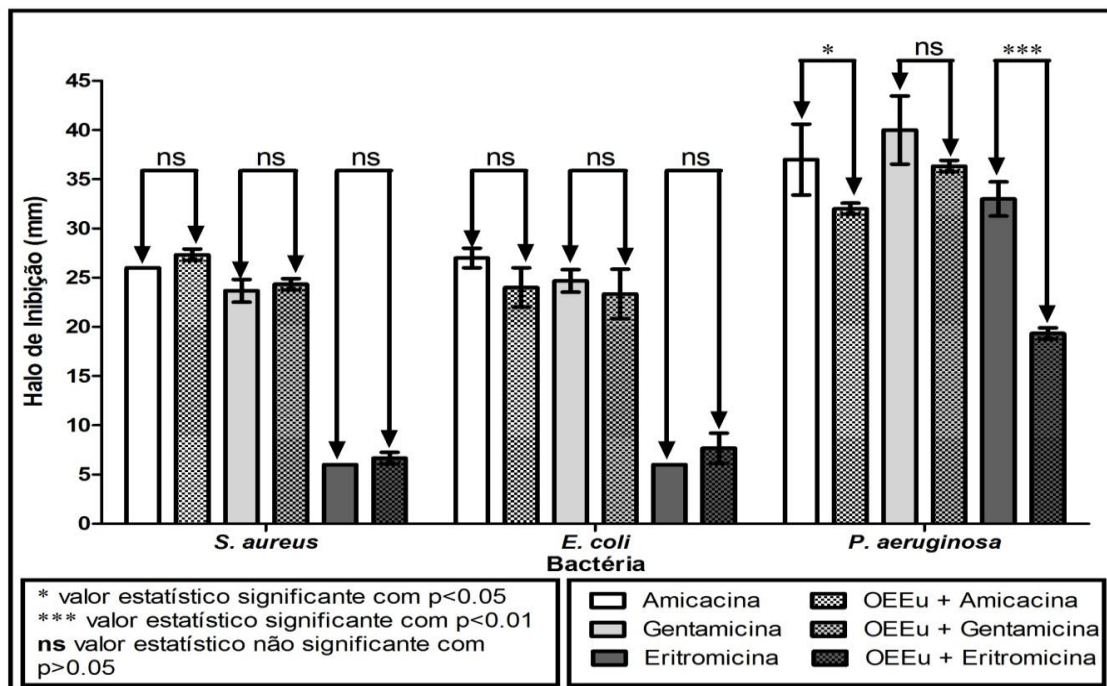
Nos testes de modulação da resistência bacteriana pelo método contato gasoso (Figura 6), quando combinado o OEEu com a Amicacina, frente às bactérias

P.aeruginosa houve antagonismo diminuindo assim os halos de inibição. Para as demais bactérias, foi identificado indiferença, ou seja, não houve aumento ou diminuição do halo de inibição.

Na modulação com Gentamicina, houve indiferença em todos os testes, não existindo aumento e nem diminuição dos halos em nenhuma das bactérias testadas obtendo-se valores não significantes estatisticamente.

Quando o OEEu foi combinado a Eritromicina frente às bactérias *P. aeruginosa*, onde ocorreu diminuição do halo de inibição. Para as demais bactérias houve insignificância de resultados não sendo considerados estatisticamente.

Figura 6 - Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de contato gasoso (Amicacina, Gentamicina e Eritromicina) do OEEu

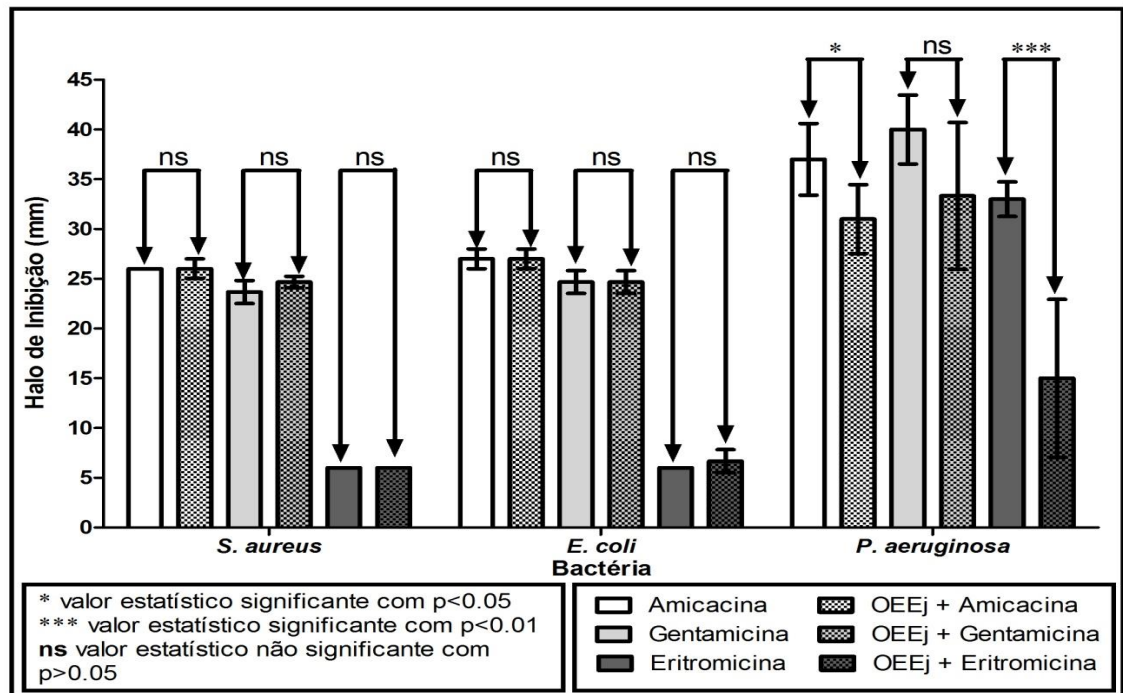


Fonte: Elaborada pela autora.

Nos testes de modulação a partir do contato gasoso (Figura 7), ao combinar o OEEj com a amicacina e eritromicina frente as bactérias *P. aeruginosa* houve diminuição de halos, indicando sinergismo, sendo observada indiferença para as demais bactérias testadas. Ao modular o OEEj com a gentamicina frente às bactérias

testadas, foram obtidos valores indiferentes, não ocorrendo nem aumento e diminuição dos halos.

Figura 7 – Atividade moduladora de resistência aos aminoglicosídeos através de contato gasoso (Amicacina, Gentamicina e Eritromicina) do OEEJ



Fonte: Elaborada pela autora.

A atividade antagônica exercida do óleo sobre os aminoglicosídeos frente à *Pseudomonas aeruginosa* também pode ser atribuída pelo sistema complexo de barreira formado pela membrana externa constituída por fosfolipídios, lipopolisacarídios e proteínas conferindo um alto grau de impermeabilidade aos antimicrobianos (JÁCOME *et al.*, 2012),

Visto que a resistência aos antimicrobianos utilizados na clínica médica tem aumentado consideravelmente, representando um problema mundial, em virtude do aumento da resistência aos antibióticos, a seleção dos mesmos na terapêutica tem se tornado uma tarefa difícil e desafiadora (MATEUS, 2014).

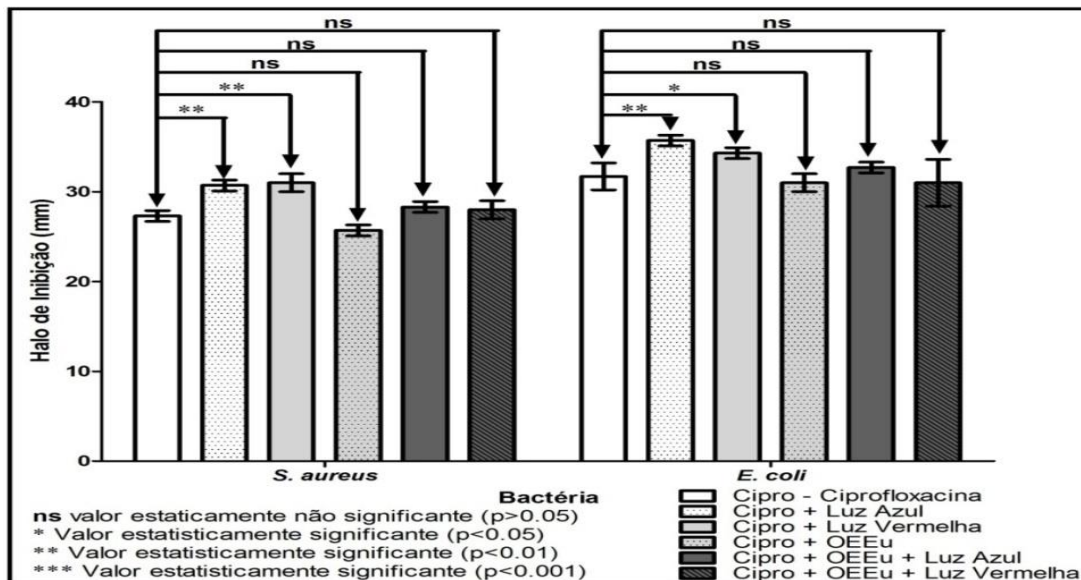
Uma estratégia que pode ser empregada para reverter os mecanismos de resistência das bactérias é utilizar a combinação entre drogas, como a associação entre

β -lactâmicos e inibidores da β -lactamase. Miranda-Novales *et al.*, (2006) demonstraram que a combinação entre amicacina e cefalotina ou dicloxacilina foi sinérgica contra a maioria das cepas resistentes de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo.

6.4 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA COM EXPOSIÇÃO AO LED.

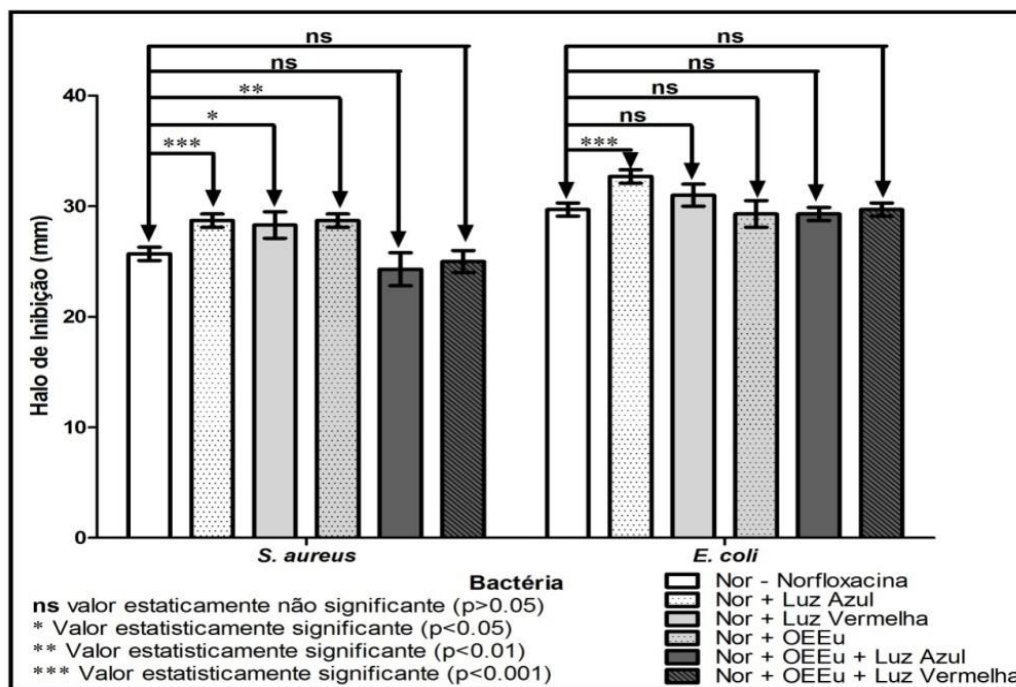
Nos testes de modulação da resistência bacteriana pelo método contato gasoso com exposição às luzes de LED, houve uma interferência do OEEu sobre a atividade do antibiótico ciprofloxacino quando associados às luzes de led vermelha e azul aumentando o halo de inibição para *S. aureus* e *E.coli*. No entanto, a presença do óleo quando associado ao antibiótico provocou indiferença nos testes quando expostos às luzes de LED. Na exposição às luzes de led, utilizando o norfloxacino frente às bactérias *S.aureus* obteve-se resultados semelhantes quando utilizado o ciprofloxacino. Além disso, o antibiótico associado ao óleo em estudo também houve resultados significativos frente a esta bactéria o que não ocorreu com o ciprofloxacino. No entanto, para *E.coli*, somente a luz de led azul interferiu na atividade do medicamento, não existindo diferenças significativas na junção do óleo e as luzes com nenhum dos antibióticos testados (Figura 8 e 9).

Figura 8 – Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao LED (ciprofloxacino) do OEEu



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 – Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao LED (Norfloxacino) do OEEu



Fonte: Elaborada pela autora.

A fototerapia pode ser considerada uma alternativa para reduzir o uso abusivo de antimicrobianos, e conseqüentemente a resistência microbiana, por sua capacidade de alterações na homeostase celular, ATP, modulação da síntese de DNA e RNA, modificações na permeabilidade da membrana, alcalinização dos citoplasmas e despolarização da membrana celular (PERUSSI, 2007; AGNE, 2013).

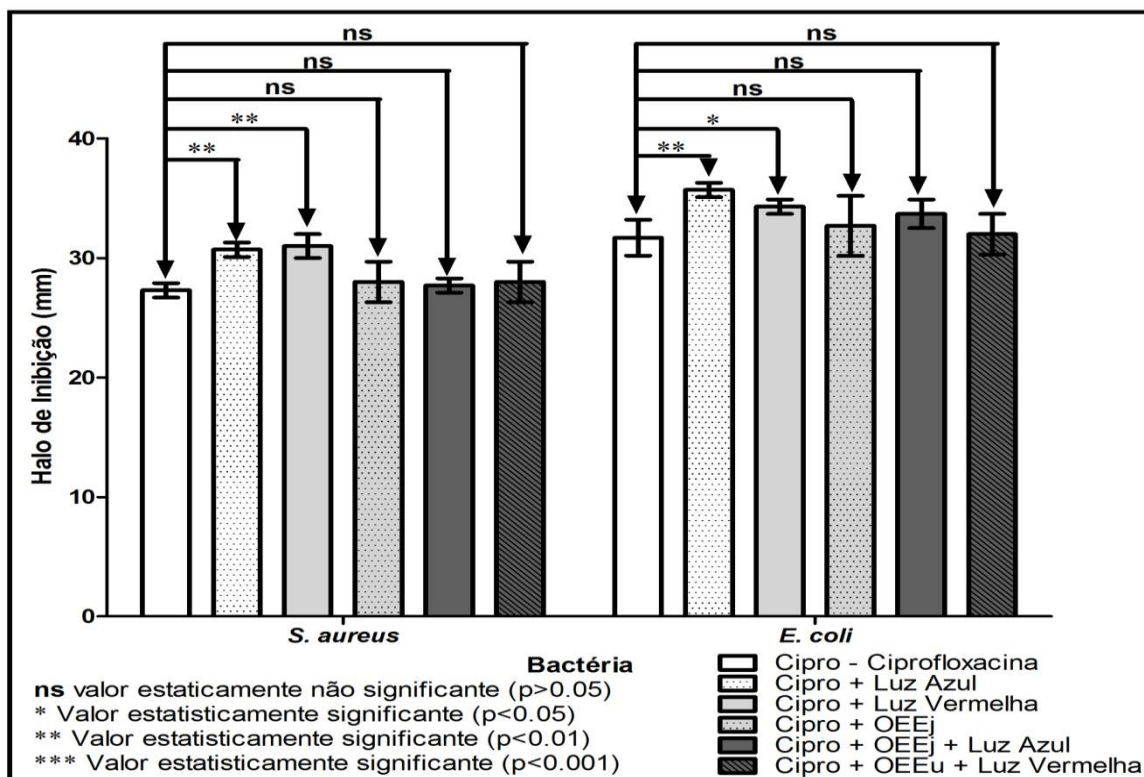
Um possível mecanismo de ação ocorrido neste estudo e que justificaria os resultados obtidos seria a sintetização da porfirina que ocorre com a interação entre as luzes e as colônias bacterianas. A porfirina é um pigmento de cor púrpura e de origem natural, responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio, oxidação intracelular, transporte de elétrons e, dentre outros, promovendo a inativação das bactérias (CHANG; GOLDSBY, 2013).

A fototerapia tem como desafio a redução de resistência bacteriana principalmente das bactérias Gram-negativas por possuírem um envelope celular com uma membrana externa complexa, composta por duas bicamadas lipídicas, funcionando como uma barreira adicional, física e funcional, entre a célula e seu ambiente (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

No entanto neste estudo percebe-se que os efeitos causados pelas luzes de LED azul frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram semelhantes. Mesmo as bactérias Gram negativas sendo consideradas, por suas características químicas, mais dificilmente penetradas pelos fótons da terapia com luz (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

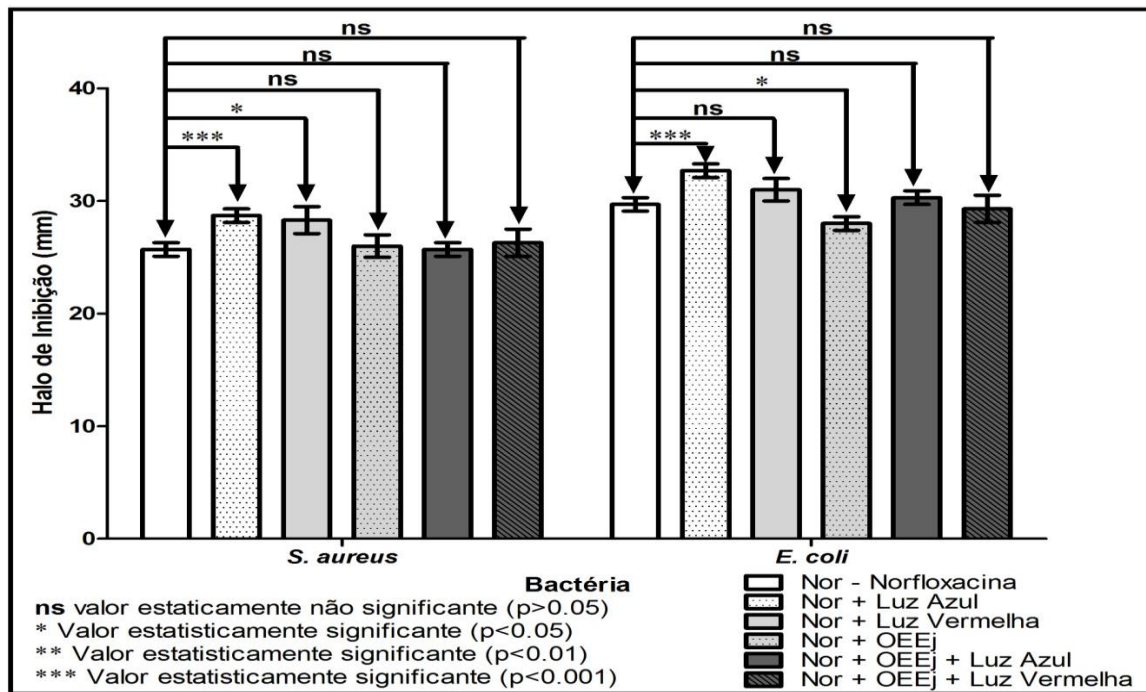
Na associação do OEEj ao antibiótico ciprofloxacino e norfloxacino a exposição das luzes de led vermelho e azul frente às bactérias *S.aureus* e *E.coli* não houve sinergismo, semelhante aos resultados com o OEEu, entretanto o contrário foi observado na associação das luzes com os antibióticos testados (Figura 10 e 11).

Figura 10 – Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao led (ciprofloxacino) do OEEj



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 – Atividade moduladora de resistência aos fluoroquinolonas através de contato gasoso com exposição ao led (norfloxacino) do OEEj



Fonte: Elaborada pela autora.

Em estudo realizado por Moreira (2009) a ação sinérgica apresentada nos testes na presença da luz de led azul pode ser justificada pela ação bactericida da luz, através de um mecanismo denominado stress oxidativo a luz produz a inativação da bactéria *Propionibacterium acnes*. Pela remoção dos elétrons das camadas externas das moléculas que formam a membrana citoplasmática da bactéria, através da ação do oxigênio.

A fototerapia a partir do uso do LED e a inativação fotodinâmica (IFD) são alvos de investigações pelos pesquisadores para controle de atividade bacteriana (HAMBLIM; HASAN, 2004) as quais a utilizam luz visível com comprimento de onda específico e IFD com certos tipos de drogas denominadas fotossensibilizantes (GAD *et al.*, 2004).

Lipovsky *et al.*, (2010) ao identificar o comprimento de onda específica com atividade bactericida frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizando 415 e 455 nm com o LED, puderam concluir que o comprimento de onda 415

pode ser utilizado para erradicar as bactérias. Ainda ressalta que, a baixa intensidade de luz visível pode promover também proliferação celular.

Além disso, pesquisas *in vitro* avaliam a eficácia da inativação de microrganismos utilizando a terapia fotodinâmica na presença de um agente fotossensibilizante, através da produção excessiva de oxigênio reativo modificando a membrana citoplasmática e levando a morte do microrganismo (GIANSANTE, 2014).

Em um trabalho realizado por Jori (2006) relatou a resistência de *S. aureus* a diversos antimicrobianos e a eficácia da quimioterapia fotodinâmica. Tem-se acreditado que um mecanismo universal fotobiológico exista em relação à ação da luz sobre a cadeia respiratória em células eucarióticas e procarióticas. São denominadas fotoaceitadores enzimas terminais da cadeia respiratória como, por exemplo, a citocroma C oxidase e o citocromabd, usados na radiação na região do vermelho ao infravermelho (HASHIMOTO, 2005).

Já em relação à região da luz azul na presença do fotossensibilizante violeta, foram identificados outros fotoaceitadores como flavoproteínas, em outras etapas da cadeia respiratória, o efeito pode ocorrer devido a mudanças bioquímicas na membrana celular, causando a lise da célula; impedindo a respiração celular, quando afeta a mitocôndria; atinge o DNA, impedindo o processo de divisão celular; também pode inativar enzimas responsáveis pelo metabolismo celular e pelo aumento da permeabilidade celular (GREBENOVÁ *et al.*, 2003; KARU; KOLYAKOV, 2005).

A modulação da luz azul quando associada aos antibióticos em todos os testes realizados, pode ser atribuída pela ação bactericida dessa luz, promovendo a foto-inativação das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Enquanto, a indiferença da luz vermelha nesse teste para *E.coli*, pode ser justificado pela resistência da bactéria por sua estrutura, além da atividade da luz vermelha ser associada à multiplicação celular e efeito antiinflamatório (MOREIRA, 2009).

Em estudo realizado por Oplanderet *al.*, (2011) foi observado que radiações (410 e 420 nm) provocam estresse oxidativo a célula. Quanto aos efeitos tóxicos são dependentes da dose e comprimento de onda. Onde a luz azul em diferentes comprimentos de onda pode reduzir graus de variações no estresse oxidativo celular

em diferentes resultados fisiológicos e comprimentos de ondas menores que (410, 420, 453 nm) reduz a capacidade antioxidativa dos fibroblastos.

7 CONCLUSÃO

- a) A composição química do óleo essencial de *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambolana* é caracterizada por conter o Isofurano – germacreno e o α -pinene como componentes majoritários, apresentando 68,9% e 48,09% respectivamente da composição química, que estão em conformidade com outros trabalhos relatados para essas espécies.
- b) Tanto o OEEu quanto o OEEj apresentaram atividade antibacteriana frente a bactérias *S. aureus* da linhagem multirresistente, o que pode estar associada pela presença dos compostos majoritários Germacreno B e α -pinene.
- c) Na avaliação da atividade moduladora aos aminoglicosídeos o OEEu e OEEj por contato direto conseguiu diminuir a concentração do antibiótico frente a algumas bactérias, porém pelo método de contato gasoso houve antagonismo quando associados os óleos com os antibióticos amicacina e eritromicina frente a *P. aeruginosa*.
- d) Na avaliação da atividade moduladora aos fluoroquinolonas testados pelo método contato gasoso com exposição à luz de LED, foi possível observar sinergismo em todos os testes quando associados os antibióticos e a luz de LED azul. Este fato, deve-se a própria característica bactericida relacionada à este tipo de luz.
- e) Por outro lado, ao associar os antibióticos com os óleos e as luzes de LED frente às bactérias testadas, houve indiferença nos testes, com exceção do efeito antagônico da associação do antibiótico norfloxacino, OEEj e luz de led azul.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream, USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.; NURIT, K.; COELHO, V. P.; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, RJ, v.11, n.3, p. 323-330, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.678-689, dez. 2006.
- ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 1, p. 177-193, jan./abr. 2012.
- ALMEIDA, P. S. **Síntese de conversores ressonantes com alto fator de potência e alta eficiência para o acionamento de diodos emissores de luz**. 2014. 187f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2014.
- ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco. Sapotaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, RJ, v.61, p. 303-318, 2010.
- AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de Dados Epidemiológicos Relativos à Ocorrências/ Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAS) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez. 2006.
- ANDRADE, S. R. A. **Atividade Antimicrobiana In Vitro de Extratos Hidroalcoólicos Sobre Cepas Resistentes de *Escherichia Coli*, *Proteus Mirabilis* e *Providencia Rettgeri***. 2013. 19 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2013.
- ASSIS, A. L. A. **Secagem, embalagem e armazenamento de folhas de Pitangueira**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora*L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n.1, p. 185-194, jan./mar. 2006.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M. da.; RESSEL, L. B. Plantas Medicinais: O Saber Sustentado na Prática do Cotidiano Popular. **Revista Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, RJ, v. 15, n. 1, p. 132-139, jan./mar. 2011.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B.; VIZZOTO, M.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Revista Ciência Rural**, v. 39, n.8, p. 2504-2510, nov. 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils– A review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.

BAPTISTA, M. G. de F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 2013.

BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, v.13, n. 2, p. 85-102,1997.

BAUER, K.; GARBE, D. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses**. 4. ed. New York: Wiley-VCH, 2001.

BESCHORNER, Amanda B. Análise histológica foliar da *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). In: XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, CIÊNCIA, DESENVOLVIMENTO, SOCIEDADE, 1. ,2014, Campus do Vale, Porto Alegre - RS. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2014.

BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F.; LEDERMAN, I. E. **Frutas Nativas. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: Funep, 2000. 30 p. (Série Frutas Nativas pitanga, 1).

BEZERRA, N. A.; FELISMINO, D de C.; CHAVES, T. P.; ALENCAR, L. C. B.; DANTAS, I. C.; SOBRINHA, L. C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. **Revista de Biologia & Farmácia e Manejo Agrícola**, v. 8, n. 2, p. 40-48, ago./out. 2012.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. de S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 63, n.2, p. 263-277, jul./dez. 2008.

BOYLESTAD, R. L. **Introdução à análise de circuitos elétricos**. 10.ed. São Paulo: Prentice-Hall do Brasil, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

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

BRASILEIRO, B.G.; PIZIOLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira Ciências Farmacêutica**, v. 42, n. 2, p. 195-202, abr./jun. 2006.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 247-249, jan./ago. 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, ago. 2004.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261-279, out. 2001.

CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **Journal of Biomedical Science**, v.10, n. 4, p.361-366, jul./ago. 2003.

CAMARGO, G. A.; CONSOLI, L.; LELLIS, I. C. S.; MIELP, J.; SASSAKI, E. K. Bebidas Naturais de Frutas: Perspectivas de Mercado, Componentes Funcionais e Nutricionais. **Revista de Bio Engenharia**, v. 1, n. 2, p. 181-205, mai./ago. 2007.

CARRAWAY, M.S.; WETLY-WOLF, K.E.; MILLER, D.L.; ORTEL, T. L.; IDELL, S.; GHIO, A. J.; PETERSEN, L. C.; PIANTADOSI, C. A. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, n. 9, p.1200-1209, mai. 2003.

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, Brasília, DF, v. 48, n. 2, p. 219-237, 2010.

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

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 183-190, jul./dez. 2010.

CHANG, R.; GOLDSBY, K. A. **Química**. 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013. 1168 p.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, jun. 2001.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora*L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, jul. 1999.

CORAZZA, A. V. **Fotobioestimulação comparativa do LASER e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos**. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-graduação Interunidade em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CORRÊA, M. P.; PENA, L. de A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: MINAGRI, 1984. 311 p.

COSTA, D. P. **Influência do biótipo de cor de fruta e da sazonalidade no óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora***. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade federal de Goiás, Goiás, GO, 2009.

COSTA, G.J. C. **Iluminação econômica Cálculo e Avaliação**. 3. ed. Porto Alegre: EDPURCRS, 2005. 591 p.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 6, p. 467–471, dez. 2010.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, ago. 2008.

CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear edema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, n. 1-2, p. 69-76, fev. 1987.

CUNHA, F.A.B.; WALLAU, G. L.; PINHO, A. I.; NUNES, M. E. M.; LEITE, N. F.; TINTINO, S. R.; COSTA, G. M.; ATHAYDE, M. L.; BOLIGON, A. A.; COUTINHO, H. D. M.; PEREIRA, A. B.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 634-644, 2015.

DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. **Food Control**, v. 19, n. 4, p. 346–352, abr. 2008.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, jun. 2005.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S.; MENEZES, M. F. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia**, v. 1, p. 1-11, dez. 2010.

DJIPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, jul. 2000.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, fev. 2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUQUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais. CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 06-08, 2004.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 141-164, mai. 2001.

FAILACHE, Horácio; GEIDO, Daniel. Fuente de fototerapia en base a LEDs. In: XV SEMINARIO DE INGENIERÍA BIOMÉDICA 2006 FACULTADES DE INGENIERÍA Y MEDICINA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA O. DEL URUGUAY, 5., 2006, Montevideo. **Anais...** Montevideo, abr. 2006.

FEIJÓ, A. M.; BUENO, M. E.N.; CEOLIN, T.; LINCK, C. L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S. M. K.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L.; HEIDIEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 50-56, 2012.

FELIPPI, M. **Morfologia da flor, do fruto e da plântula; ontogênese e germinação de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.)**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências Florestais) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

FETROW, C. W.; ÁVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. 143 p.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 5, p. 499-500, 2005.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. de O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multi Ciência: construindo a historia dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, out. 2006.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S. BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, n. 2, p. 201-208, mar./abr. 2008.

FRANZON, R. C. **Caracterização de mirtáceas nativas do Sul do Brasil**. 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

FRANZON, R. C. ; GONÇALVES, R. Da S. ; ANTUNES, L. E. C. ; RASEIRA, M. C. B. Propagação vegetativa de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora*L.) do sul do Brasil por enxertia de garfagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n.1, p.262-267, mar. 2010.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; HAMBLIM, M. R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram- positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 48, n.6, p.2173-2178. jun. 2004.

GALLINA, Elias S.; REHEM, BrunaC. Caracterização Química e Anatômica De *Eugenia uniflora* (*Myrtaceae*). In: 64º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1. ,2013, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2013.

GIL, M. L., JIMENEZ, J., OCETE, M. A.; ZARZUELO, A.; CABO, M. M. Comparative study of diferente essential oilsof *Bupleurum gibraltarium* Lamark. **Pharmazie**,v. 44, n. 4, p. 284-287, abr. 1989

GILIOLI, A. **Análise fitoquímica e atividade biológica de Eugenia umbeliflora**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GREBENOVÁ , D.; KUZELOVÁ, K.; SMETANA, K.; PLUSKALOVÁ, M.; CAJTHAMLOVÁ, H.; MARINOV, I.; FUCHS, O.; SOUCEK, J.; JAROLÍM, P.; HRKAL, Z.

Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 69, n.2, p. 71-85, fev. 2003.

GUENTHER, E. **The essential oils**. v. III. New York: D. Van Nostrand Company, 1974, 777 p.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAMBLIN, M. R; HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical e Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p.436-450, mai. 2004;

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3. ed. London: Chapman and Hall, 1999, 302 p.

HASHIMOTO, M.C.E. **Redução Bacteriana Com Diodo Emissor De Luz azul Associado Ao Fotossensibilizador Rodamina Ácida B: Estudo *In Vitro* Sobre *Streptococcus Mutans***. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado Profissional Lasers em Odontologia) – Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HELLWIG, T. C.; UENO, B. Levantamento de Fitopatógenos Causadores de Doenças em Frutíferas Nativas na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 1560-1564, 2009.

HOEFFEL, J. L. M.; GONÇALVES, N. M.; FADINI, A. A.; SEIXAS, S. R. C. 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, p. 1-25, set. 2011.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n.4, p. 273-292, ago. 2005.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, mai. 2001.

JÁCOME, P. R. L. D. A.; ALVES, L. R.; CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. S.; MACIEL, M. A. V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 707-712, nov./dez. 2012.

JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobial activities of essential oils. **Pharmaceutisch Weekblad**, v. 9, n. 4, p. 193- 197, ago. 1987.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. São Paulo: Nacional, 2002, 777 p.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, n. 5, p.468-481, jun. 2006.

KAPOOR, L. D. **Handbook of ayurvedic medicinal plants**. Boca Raton: CRC, 1996, 416 p.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 355-361, ago. 2005.

LEANDRO, L. M. G.; AQUINO, P. E. A.; MACEDO, R. O.; RODRIGUES, F. F. G.; GUEDES, T. T. A. M.; FRUTUOSO, A. D.;COUTINHO, H. D. M.; BRAGA, J. M. A.; RIBEIRO, T. R. G.; MATIAS, E. F. F. Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylonobtusifolium*. **Revista e-Ciência**, v.1, n.1, 13 p, out. 2013.

LEE, M.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.; YEN, A. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic drolis abletannindimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1343-1349, abr. 1997.

LEITE, G. B. **Análise de Portadores Assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília**. 2008.101 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2008.

MAHON, C. R.; LEHMAN, D.C; MANUSELIS, G. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. Estados Unidos: Saunders Elsevier. 2007. 1026 p.

LIMA, M. de. S. **Isolamento da Pectina em Frutas e sua Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho**. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

LIMA, V. L. A. G. de; MELO, E. de A.; LIMA, D. E. da S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agrícola**, v. 59, n. 3, p. 447-450, jul./set. 2002.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. S.; HENRIQUES, A. T. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, p. 49-52, 1998.

LIPOVSKY, A. et al. Visible light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p.157- 165, 2010.

LOPES, A. C. A.; MARTINS, L. M.; GATTI, M. S. V.; FALAVINA DOS REIS, C. M.; HOFER, E.; YANO, T. Diarrhea Outbreak In Pernambuco, Brazil, Associated With A Heat-Stable Cytotoxic Enterotoxin Produced By *Aeromonas caviae*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 349-351, jul./ago. 2015.

LOPES, H. V. Antibióticos, resistência e novos mecanismos de ação. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo - SP, v. 11, n. 2, p. 67-68, 2009.

LOPEZ, A.; HUDSON, J.B; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.189-196, out. 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUZIA, D. M. M.; BERTANHA, B. J.; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.2, p. 175-180, 2010.

MACEDO, Y. C. L. **Proposta e análise de um circuito para neoformação tecidual**. 2015. 45f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Eletrônica) — Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MAGINA, M. D. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero Eugenia**. 2008. 199 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

MAIA-FILHO, A.L.M.; SILVA, V.S.; BARROS, T.L.; COSTA, C.L.S.; MAIA, E.P.V.D.; ARAÚJO, K.S.; SANTOS, I.M.S.P.; VILLAVARDE, A.G.J.B.; CARVALHO, F.A.S.; CARVALHO, R.A. Efeito do gel da babosa (*Aloe barbadensis*, Mill.) associado ao ultrassom em processo inflamatório agudo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, SP, v. 13, n. 2, p.146-150, 2011.

MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 947-983, jul. 2009

MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R. M.; LEHN, N.; ABELS, C. Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1542-1552, 2005.

MARCHIORI, J.N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: Myrtales**. Santa Maria: UFSM. 1997. 304 p.

MARINHO, M. G. V.; SILVA, C. C.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 170-182, 2011.

MARQUES, J. B. **Comércio e conservação de três espécies vegetais da Caatinga ameaçadas de extinção e de uso medicinal em duas áreas do Cariri oriental Paraibano**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Programa Regional de Pós-Graduação em desenvolvimento e Meio ambiente, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2008.

MATA, P.T.G.; ABEGG, M.A. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2007.

MATEUS, E. F. **Ervas que curam: da " terra das ervanárias" à produção de plantas medicinais e de conhecimento**. 2014. 393 f. Tese (Doutorado em Antropologia da Saúde) – Doutoramento em Antropologia Especialidade Antropologia da Saúde, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenácea* DC. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 6, p.1049-1052, fev. 2010.

MARTELETO, D. C. **Avaliação do diodo emissor de luz (LED) para iluminação de interiores**. 2011. 96 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Elétrica) –Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER R. Pharmacology of the Fluorquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v.172, n. 1, p. 10-28, jul. 2006.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, jul./set. 2010.

MAY, A.; MORAES, A. R. A.; PINHEIRO, M. Q. Teor de óleo essencial de pitanga. Em função de tratamentos pós-colheita. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 3, p. 186-190, jul./set 2007.

McGOWAN Jr, J.E. Minimizing antimicrobial resistance: The key role of the infectious diseases Physician. **Clinica Infectious Disease**, v. 38, n. 7, p.939-942, abr. 2004.

MEDEIROS, M. I. M.; FILHO, A. N.; SOUZA, V de.; MELO, P. de C.; FERREIRA, L. M.; CANELEJO, L. M. M. Epidemiologia Molecular Aplicada ao Monitoramento de Estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n.1, p. 98-105, jan./mar. 2013.

MENDONÇA, A. T.; CARVALHO, A. R.; FERREIRA, M. C.; RESENDE JÚNIOR, M. C. A utilização dos extratos hidroalcoólico e alcoólico de *Eugenia uniflora L.* como agente antibacteriano. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, MG, v. 14, n.1, p. 826-833, jan./jul. 2016.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. **Naturwissenschaften**, n. 48, p. 569-570, 1961.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, v. 47, n.1, p. 25-31, jan./fev. 2011.

MEYER, P. F. ; ARAÚJO, H. G. de. ; CARVALHO, M. G. F. ; TATUM, B. I. S. ; FERNANDES, I. C. A. G. ; RONZIO, O. A. ; PINTO, M. V. M. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v.11, n. 6, nov./dez. 2010.

MINARINI, L.A.R. **Estudo dos mecanismos de resistências as quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns Estados Brasileiros**. 2008. 128 f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008.

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

MOREIRA, M. C.; CERVI, M.; MARCHEZAN, T.B.; CAMPOS, A.; PRADO, R.N. Aplicação de LEDs de alto brilho no tecido humano e sua interação terapêutica. In: 5ª SEMANA NACIONAL DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 1.,2008, Chapecó, SC. **Anais...** Chapecó: CEFET/SC, Unidade Chapecó, out. 2008.

MOREIRA, M. C.; CERVI, M.; MARCHEZAN, T. B.; CAMPOS, A.; PRADO, R.N. Aplicação de LEDs de Alta intensidade no tecido humano e sua interação terapêutica. In: IIª JORNADA NA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA DA REGIÃO SUL, 1., 2008, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas, RS, ago. 2008.

MOREIRA, M.C. **Utilização de conversores eletrônicos que alimentam Leds de alto brilho na aplicação em tecido humano e sua interação terapêutica**. 2009. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

NADER, T. T. **Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2010.

NARCISO, A.; LITO, L.; CRISTINO, J. M.; DUARTE, A. *Escherichia coli* Uropatogénica: Resistência aos Antibióticos *Versus* Factores de Virulência. **Revista Actas Urológicas**, Lisboa, Portugal, v. 27, n. 2, p. 11-20, jul. 2010.

NASCIMENTO, A. L. D. R. **Ação Antimicrobiana do Extrato de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) Sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli***. 2013. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia Generalista) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2013.

NATTINAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standart M7- A6, 2003. 50-62 p.

NEU, R. A new Reagent For differentiating and Determining Flavones on Paper Chromatograms. **Naturwissenschaften**, n. 43, p. 82, 1956.

NEVES, P. R. **Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem**. 2010. 115 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Programa de Pós-graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas, universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

NEVES, P. R. ; MAMIZUKA, E. M. ; LEVY, C. E. ; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, SP, v. 47, n. 4, p. 409-420, ago. 2011.

NOGUEIRA, P. S. F.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO, W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem UERJ**, v.17, n. 1, p.96-101, jan./mar. 2009.

OESTERHELT, H.B.; BEYER, D.; HEIN-PETER, K.; ENDERMAN, R.; LADEL, C.; SCHROEDER, W.; HINZEN, B.; RADDATZ, S.; PAULSEN, H.; HENNINGER, K.; BANDOW, J. E.; HANS-GEORG, S.; LABISCHINSKI, H. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. **Nature Medicine**, v.11, p.1082-1087, out. 2005.

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, L.O.; OKEKE, I.N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 2, p. 162-168, 2004.

ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade e os teores de fibra e pectina em suco de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, SP, v. 18, n. 3, p. 231-238, jul./set. 2015.

OPLANDER, C.; HIDDING, S.; WERNERS, F. B.; BORN, M.; PALLUA, N.; SUSCHECK, C. V. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.103, n. 2, p. 118-125, mai. 2011.

PAIM, R. S. P.; LORENZINI, E. Estratégias para Prevenção da Resistência Bacteriana: Contribuições para a Segurança do Paciente. **Revista CUIDARTE**, Porto Alegre, RS, v. 5, n. 2, p. 757-764, 2014.

PALAZZO, F. M. A.; DIAS-NETO, A. O.; MONTEIRO, M. H. D. A.; ANDREATA, R. H. P. Sinopse comentada de Sapotaceae no município de Rio das Ostras (RJ, Brasil). **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, n. 61, p.293-306, 2010.

PAROUL, Natalia; MOSSI, Altemir; CANSIAN, Rogério L.; EMMERICH, Daniel; MALVESTI, Álvaro L.; BOSSETTO, Daiane L.; RIGO, Juliane. Avaliação química e antimicrobiana do óleo essencial de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). In: 27ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA – SBQ, 2., 2004, Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA, 2004. p. 1-2.

PERNA, T. A.; LAMANO-FERREIRA, A. P. Revisão Bibliométrica Sobre o Cultivo de Plantas Medicinais em Quintais Urbanos em Diferentes Regiões do Brasil (2009-2012). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 1, p.61-7, 2014.

PEDROSA, K. M.; GOMES, D. S.; LUCENA, C. M.; PEREIRA, D. D.; SILVINO, G.S.; LUCENA, R. F. P. Uso e disponibilidade local de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. PENN. (Quixabeira) em três regiões da depressão sertaneja da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Farmácia - Biofar**, v. especial, p. 158-183, 2012.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, jul./ago. 2007.

PLAZA, Carenina V.; SILVA, Dulce H. S.; PAULETTI, Patr M. Antioxidantes Presentes em Folhas e Frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). In: 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 1., 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2007. p. 1-2.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; de ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.21, n. 2, p. 183-186, nov. 1987.

QUARESMA, S. L. B. **Identificação de *Staphylococcus aureus* e Avaliação do Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos e aos extratos de *Eugenia uniflora* L.** 2014. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PR, 2014.

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 2, p. 126-135, 2008.

REIS, M. do C. dos. **Sistema indutor de neoformação tecidual para pé diabético com circuito emissor de luz de LEDs e utilização do látex natural.** 2013. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ROCHA, D. P. ; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.de.; GUERRA, W. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, nov. 2011.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 34, n. 1, p. 297-299, jan./fev. 2004.

RODRIGUES, N. M.; SANDINI, T. M.; PEREZ, E. Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., *Myrtaceae* (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR. **Revista Biosáude**, Londrina, PR, v. 12, n. 1-2, p. 1- 13, 2010.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

RÜCKER, G.; ASSIS, E. S. B.; BAUER, L.; SCHIKARSKI, M. New constituents of *Stenocalyxmichelii*. **Planta Médica**, v. 31, n. 4, p. 322-327, 1977.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 293-297, mai. 2001.

SANTOS, A. L. dos.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. de.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, jan./dez. 2007.

SANTOS, E.B.; DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZI, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p.321-324. jan./mar. 2009.

SANTOS, M. C. M.; FILHO, F. da C. G.; NICOLAU, R. A. Efeitos Terapêuticos Do Diodo Emissor De Luz-Led Em Mastites Lactacionais. **Revista Univap**, v. 18, n. 32, p. 42-51, dez. 2012.

SCALON, S. P. Q.; FILHO, H. S.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia Uniflora L.*) Sobre condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 652-655, dez. 2001.

SCHUBERT, E.F. **Light Emitting Diodes**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 434 p.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; de ARIAS, A. R.; SCHUTZ, A.R. **Introdução a Botânica Sistemática**. 5 ed. Porto Alegre: Ed UFRGS, 1980.

SHAFI, P. M. ; ROSAMMAN, M. K. ; JAMIL, K. ; REDDY, P. S. Antibacterial activity of *Syzygiumcumini* and *Syzygiumtravancorium* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 414-416, ago. 2002.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F.; MENEZES-DE-LIMA, O. JR.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. Z.; ZOQHBI, M. G.; HENRIQUES, M. G. Evaluation of antiinflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n. 1, p. 57-69, jul. 1999.

SIANI, A. C.; SAMPAIO A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, M.D. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco**. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2008.

SILVA, S. D. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 1-59, 2006.

SILVA, S. M. P. de. M. **Potencial Antibacteriano e Modulador de Resistência a Drogas de Extratos e Constituintes de Algas Marinhas em *Staphylococcus Aureus***. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Molecular) – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013.

SILVA, V. A. ; FREITAS, A. F. R. ; PEREIRA, M. S. V. ; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. ; PEREIRA, A. V. ; HIGINO, J. S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato

da *Lippiasidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora UFSC, 2003. 1102 p.

SOARES, E. C. de. L. **Isolamento de Endofíticos de *Eugenia Uniflora* L. (pitanga) e avaliação da bioatividade**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2011.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. 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. 642-654, 2008.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 31-38, 2002.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRANSPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 262-271, 1991.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis*Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Ecletica Química**, v. 34, n. 3, p.7-13, 2009.

TEIXEIRA, C.C. ; FUCHS, F.D. ; BLOTTA, R. M. ; KNIJNIK, J. Effect of tea prepared from leaves of *Syzygiumjamboson* glucose tolerance in non-diabetes subjects. **Diabetes Care**, v.13, n. 8, p.907-908, ago. 1990.

TSAO, J.Y. **Light Emitting Diodes (LEDs) for General Illumination Technology Roadmap Update**. Full ed. Connecticut: OIDA OptoelectronicsIndustryDevelopmentAssociattion, nov. 2002. 112 p.

VEIGA-JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, abr./jun. 2008.

VELOSO, J. H. **O Gênero *Eugenia*: da Química à Farmacologia**. 2016. 89 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Curso de Licenciatura em Química,

Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP, 2016.

VERAS, H. N.H.; RODRIGUES, F. F.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippiasidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508–512, abr. 2012.

VERAS, H.N.H. **Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antiinflamatória tópica do óleo essencial de Lippiasidoides Cham. (verbenaceae)**. 2011. 142 f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, CE, 2011.

VIANA, A. L. M. **Detecção e Caracterização de Determinantes de Resistência aos Antibióticos B-Lactâmicos e Quinolonas Em bactérias Gram-Negativas Isoladas de Amostras Clínicas**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis – a thin layer chromatography atlas**. Springer. 2. ed. Munich: Springer Science & Business Media 1996. 384 p.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, jul. 1998.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, dez. 1962.

XAVIER, J. B. E. **Estudo comparativo das respostas terapêuticas do laser diodo visível e do Led no tratamento do foto envelhecimento induzido em camundongos**. 2010. 86 f. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, Centro Universitário de Caratinga, UNEC, Caratinga, MG, 2010.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 157, n. 1, p. 65-75, ago. 2000.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; CORRY, D.; PURCELL, W. M. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. **British Journal of Dermatology**, v.146, n. 4, p. 568, abr. 2002.

APÉNDICE

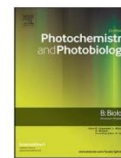
APÊNDICE A – Artigo publicado

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 174 (2017) 144–149



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

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

Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights



Nara L.F. Pereira^a, Pedro E.A. Aquino^a, José G.A.S. Júnior^b, Janyketchuly S. Cristo^b, Marcos A. Vieira Filho^b, Flávio F. Moura^b, Najla M.N. Ferreira^b, Maria K.N. Silva^a, Eloiza M. Nascimento^a, Fabrina M.A. Correia^a, Francisco A.B. Cunha^c, Aline A. Boligon^d, Henrique D.M. Coutinho^{c,*}, Jaime Ribeiro-Filho^a, Edinardo F.F. Matias^a, Maria I.F. Guedes^c

^a Centro Universitário Dr. Leão Sampaio – UNILEÃO, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^b Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, CE, Brazil

^c Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, CE, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Eugenia jambolana
Antibacterial activity
Modulation
Bacterial resistance
LED lights

ABSTRACT

Bacterial resistance has risen as an important health problem with impact on the pharmaceutical industry because many antibiotics have become ineffective, which has affected their commercialization. The Brazilian biodiversity is marked by a vast variety of natural products with significant therapeutic potential, which could bring new perspectives in the treatment of infections caused by resistant microorganisms. The present study aimed to evaluate the antibacterial effect of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* (EjEO) using the method of microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The modulatory effect of this oil on antibiotic activity was determined using both the broth microdilution and gaseous contact methods. The antibacterial effect of the association of the gaseous contact and the use of a LED unit with red and blue lights was also determined. The chemical components of the EjEO were characterized by HPLC, which revealed the presence of α -pinene as a major constituent. The EjEO presented a MIC ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ against *S. aureus* and ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ against *E. coli*. The combination of the EjEO with antibiotics presented synergism against *E. coli* and antagonism against *S. aureus*. An antagonistic effect was obtained from the association of EjEO with amikacin and erythromycin by the method of gaseous contact. On the other hand, the association of EjEO with ciprofloxacin presented a synergistic effect against *S. aureus* and *E. coli* exposed to LED lights. A similar effect was observed in the association of the EjEO with norfloxacin presented synergism against *S. aureus* in the same conditions. In conclusion, our results demonstrated that the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* interfere with the action of antibiotics against bacteria exposed to LED lights. Thus, further researches are required to elucidate the mechanisms underlying these effects, which could open new perspectives in the development of new antibacterial therapies.

1. Introduction

Medicinal plants have represented an important source of new substances for drug development since the beginning of the XIX century [1]. Currently, natural products stand out in the pharmaceutical industry, accounting for about 45% of all pharmaceutical products [2].

In recent years, the increase in bacterial resistance to conventional antibiotics has stimulated the development of research aimed at the development of new antibiotics. In addition, in the face of the side effects caused by conventional drugs, natural products represent a

promising source of novel molecules for the development of antimicrobial drugs [3]. In this context, essential oils (also known as volatile oils), which can be obtained from various plant structures, including flowers, leaves, seeds, fruits and roots, have demonstrated significant pharmacological activity in association with antibiotics [4,5].

In addition to the use of medication, it has been demonstrated that the use of the Light Emitting Diodes (LED) apparatus promotes a beneficial effect in the management of cutaneous infections and tissue healing. However, the mechanisms underlying the antimicrobial

* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Universidade Regional do Cariri – URCA, Av. cel. Antonio Luiz, 1161, Pimenta, Crato, CE CEP: 63105-000, Brazil.

E-mail address: hdmcoutinho@urca.br (H.D.M. Coutinho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.027>

Received 21 March 2017; Received in revised form 24 June 2017

Available online 26 July 2017

1011-1344/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

activity of the LED lights alone or in combination with drugs remain to be elucidated [6].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial and modulatory activity of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* (EjEO) in association with antibiotics against bacteria exposed to LED lights *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Collection and Identification of the Plant

The leaves of *Eugenia jambolana* were collected in the city of Crato, Ceará state – Brazil. The material was identified by comparison with a sample of the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade-Lima n° 3107.

2.2. Extraction of the Essential Oil From the Leaves of *Eugenia jambolana* (EjEO)

The essential oil was extracted from fresh leaves of *Eugenia jambolana* by hydrodistillation, using a Clevenger type device. Briefly, the leaves were crushed and placed in a 5 L flask with 2.5 L of distilled water to boil for 2 h. Then, the essential oil was added with Anhydrous sodium sulphate (Na₂SO₄) and stored under refrigeration (– 4 °C) until analysis.

2.3. Chemicals

Antibiotics (soluble and disc) and Resazurin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.), culture media were purchased from HIMEDIA (India) and Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Merck (Germany).

2.4. Identification of the Chemical Components

2.4.1. Gas Chromatography (GC)

Gas chromatography (GC) analyses were carried out using an Agilent Technologies 6890N GC-FID system, equipped with a DB-5 capillary column (30 m × 0.25 mm; film thickness 0.25 mm) and connected to a FID detector. The injector and detector temperatures were set to 280 °C. The carrier gas was helium, at a flow rate of 1.3 mL/min. The thermal programmer was 50–300 °C at a rate of 5 °C/min. Two replicates of the samples were processed in the same way. The relative concentrations of the components were calculated based on GC peak areas without correction factors. The injected volume was 1 µL of the essential oil diluted in hexane (1:1) [7].

2.4.2. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS)

GC–MS analyses were performed using a GC–MS system (Agilent Technologies AutoSystem XL) operating in the EI mode at 70 eV, equipped with a split/splitless injector (250 °C). The transfer line temperature was 280 °C. Helium was used as carrier gas (1.3 mL/min) and the capillary columns used were HP 5MS (30 m × 0.25 mm; film thickness 0.25 mm) and HP Innowax (30 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.50 mm). The temperature program was the same of the GC analyses. The injected volume was 1 µL of the essential oil diluted in hexane (1:1).

2.5. Evaluation of Antimicrobial Activity

2.5.1. Bacterial Strains

Standard bacterial cultures of *Escherichia coli* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25853 and multiresistant strains from clinical isolates of *Escherichia coli* EC 06, *Staphylococcus aureus* SA 358 and *Pseudomonas aeruginosa* PA 03 (Table 1) were supplied by the Oswaldo Cruz Institute. For the agar disc-diffusion tests, the strains were suspended in a test

Table 1
Source bacterial and profile antibiotic resistance.

Bacteria	Source	Profile of resistance
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9027	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	Surgical wound	Oxa, Gen, Tob, Ami, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 03	Nasal discharge	Cf, Cfp, Cfd, Caz, Lv, Im Mero, Pip
<i>Escherichia coli</i> EC 06	Urine	Cf, Ca, Clx, Amp, Nor, Lm, Cip, Lv, Of, Ampsul

Amp – ampicillin; Ampsul – ampicilina-sulbactam; Ami – amikacin; Amox – amoxicillin; Ca – cefadroxil; Cfc – cefaclor; Cf – cefalotin; Clx – cefalexin; Caz – ceftazidim; Cfp – cefepime; Cfd – ceftaridima; Cip – ciprofloxacin; Im – imipenem; Can – canamicina; Lm – lomefloxacin; Lv – levofloxacin; Tob – tobramicin; Of – ofloxacin; Oxa – oxacilin; Gen – gentamicin; Mero – meropenem; Nor – normofloxacin; Neo – neomicina; Para – paramomicin; Pip – piperacilin; But – butirosin; Sis – sisomicin; Net – netilmicin.

tube with distilled water to obtain a turbidity equivalent to 0.5 of the McFarland scale (1 × 10⁵ CFU/mL).

2.5.2. Irradiation

This test was carried out using the LED apparatus (Dermaled®), with semiconductor diodes, which has red, blue and amber spectra and allows a combination of these colors. The lights used were blue (with a wave length of 470 nm) and red (at 625 nm), pre-determined by the apparatus. Each plate received irradiation for 10 min with blue and red lights.

2.5.3. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Modulation of the Activity of Aminoglycosides

The MICs were determined using the broth microdilution technique in sterile 96-well plates with serial dilutions (1:1) [8]. Microbial cultures kept under refrigeration in agar medium were transferred to brain heart infusion broth (BHI) medium and incubated at 35 °C for 24 h. Then, the inoculum was standardized by preparing a suspension in BHI with turbidity equivalent to 0.5 of the McFarland scale (1 × 10⁵ CFU/mL) tube. This suspension was diluted 100 times in BHI, corresponding to approximately 1 × 10³ CFU/mL. From this suspension, 100 µL were removed and added to each well in the plate, in contact with variable concentrations of the EjEO.

The EjEO solutions used in the tests were prepared separately utilizing 10 mg of the solubilized samples in 1 mL of dimethyl sulphoxide (DMSO) to obtain an initial concentration of 10 mg/mL. From this concentration, we performed dilutions in sterile distilled water to obtain a stock solution of 1024 µg/mL. The final concentrations of the samples in the culture medium were 512, 256, 128, 64, 32, 16 and 8 µg/mL.

In this study, all tests were performed in triplicates. The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. Then, a solution of Resazurin 0.01% (w/v) was prepared in sterile distilled water and was used as an indicator. Following incubation, 20 µg/mL of the indicator were added to each well, and 1 h later the readings were performed in a room temperature. Thus, the wells in blue indicated absence of microbial growth, whilst those in red indicated presence of microbial growth [9]. Culture medium containing the inoculum was used as positive control. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration capable of completely inhibiting microbial growth in the microdilution wells, as detected macroscopically due the change of the colour of the resazurin, an indicator dye to detect the bacterial growth.

The modulation of the activity of antibiotics was evaluated using aminoglycosides (gentamicin and amikacin) against multiresistant bacterial strains in a concentration of 1.024 µg/mL. The antibiotics

were serially diluted into the wells in a volume of 100 μL containing 10% BHI, the suspension of the multiresistant strain, and the EjEO in a sub inhibitory (MIC/8) concentration [8]. The final concentrations of the antibiotics in the culture medium ranged from 512 to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h and the readings were performed using Sodium Resazurin as indicator.

2.5.4. Evaluation of Antibacterial and Modulatory Activities by the Method of Gaseous Contact

To seed the microorganisms, petri dishes containing BHI-agar were used. The essential oil was diluted in DMSO to obtain solutions containing 50; 25; 12.5 and 6.25% of the EjEO. Solutions containing 100% of the oil were also used. Antibiogram discs with antibiotics and blank discs containing 10 μL of the oil were used in the tests. The halos of inhibition were determined using millimetric rulers after incubation at 37 °C for 24 h. The tests were performed in triplicates and dishes containing only DMSO were used as control.

The analysis of the modulatory activity was also performed using the methodology of gaseous contact in petri dishes containing BHI, as described by Inouye and colleagues [10] with adaptations. The following antibiotic discs were used: amikacin (10 mg), gentamicin (30 mg) and erythromycin (15 mg). The plates were inverted and 10 μL of the EjEO (we used the highest concentration at which bacterial growth was observed) were added to the lids to interact with the discs through volatilization. The remaining discs were prepared without addition of the oil and incubated at 37 °C for 24 h. The effect of the antibiotics, in the presence or absence of the compounds, was analyzed by measuring the halos of inhibition with a millimetric ruler. The tests were performed in triplicates and DMSO was used as control.

2.5.5. Evaluation of Antibacterial and Modulatory Activities Through Gaseous Contact and Exposure to LED

In this test, we used the methodology described in the last session. However, here we used quinolone class antibiotics (ciprofloxacin [5 mg] and norfloxacin [10 mg]). The petri dishes were subdivided into three groups. The first group was exposed to blue LED light; the second group was exposed to red LED light for a period of 10 min for each dish. The third group was not exposed to LED lights. The dishes were incubated at 35 ± 2 °C, for 24 h before the readings.

2.6. Statistical Analysis

The data were analyzed using the *GraphPad Prism* 5.0. software. The differences were determined the Two-Way ANOVA test, followed by Bonferroni's *post hoc* test.

3. Results and Discussion

3.1. Identification of the Compounds

The constituents were identified according to their retention indexes (RI), with reference to the homologous series of *n*-alkanes, C_7 – C_{30} , under identical experimental conditions, comparing with the mass spectra library search (NIST and Wiley), and with the mass spectra literature. The relative amounts of the individual components were calculated based on the CG peak area (FID response). As shown in Table 2, we identified 26 constituents in the EjEO, representing 98.93% of the composition, being the α -pinene (48.09%) and Nerolidol (8.73%) the main phytocompounds observed.

3.2. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration

In the microdilution test we demonstrated that EjEO presented MIC = 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *S. aureus* and ≥ 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *E. coli*, demonstrating that this *in vitro* treatment was more effective against *S. aureus*, whose value is considered clinically relevant and promising for

Table 2
Composition of *Eugenia jambolana* essential oil.

Compounds	RI ^a	RI ^b	Essential oil
			%
Hexanol	885	879	0.93
α -Pinene	938	939	48.09
β -Pinene	979	980	2.45
β -Myrcene	995	991	0.86
α -Terpinene	1018	1016	0.04
Limonene	1029	1031	1.39
δ -terpinene	1061	1062	0.13
Nonalol	1105	1103	6.76
Linalool	1099	1098	3.57
Isoborneol	1154	1156	0.05
Borneol	1169	1166	0.16
α -Terpineol	1187	1189	1.94
Tetradecane	1226	1221	0.38
Nerol	1228	1228	7.15
Geraniol	1259	1255	0.72
(E,Z)-2,4-decadienal	1298	1295	1.14
Eugenol	1356	1356	0.08
Geranyl acetate	1384	1383	3.15
Ionone	1387	1387	1.47
Damascene	1409	1411	0.93
Caryophyllene	1417	1418	1.42
α -Humulene	1453	1451	1.25
Nerolidol	1569	1564	8.73
Caryophyllene oxide	1580	1581	3.54
Globulol	1583	1583	1.09
α -Cadinol	1645	1649	0.51
Total identified (%)			98.93

Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages.

^a Retention indices experimental (based on homologous series of *n*-alkane C_7 – C_{30}).

^b Retention indices from literature.

in vivo tests.

A previous study demonstrated that an essential oil obtained from the leaves of *Eugenia jambolana* effectively inhibited the growth of *Vibrio cholerae* at a dilution of 1:500 and presented caused a moderate inhibition at 1:1000 [11]. In another study, the essential oils obtained from 17 species of the family Myrtaceae were tested against six microorganisms, including bacteria and fungi. It was demonstrated that the treatments presented best results against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, supporting the data found in the present study [12]. Noteworthy results were also obtained with an essential oil obtained from *Lippia sidoides* and the constituent thymol, which presented a MIC of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *S. aureus*. On the other hand, extracts obtained from other plant species, such as *Cordia verbenacea* [14] presented significant inhibitory effects against multiresistant strains of *Escherichia coli*, in contrast with the EjEO, which was not effective against this bacterium.

3.3. Modulation of Antibiotic Activity

In the method of microdilution by direct contact (Fig. 1), the combination of EjEO with amikacin or gentamicin caused a reduction in the MIC of these antibiotics against *E. coli*, indicating that the association between these treatments presented a synergistic effect. However, the combination of EjEO with the same antibiotics caused an increase in their MIC against *S. aureus* indicating that the association between these treatments presented a synergistic effect.

The resistance of *E. coli* to the treatments performed in this work might be justified by the presence of an external membrane in this Gram-negative bacterium, which forms an envelope and thus, difficult the action of natural products and other antimicrobial drugs [15,16]. Although essential oils usually present higher efficacy against gram-positive bacteria, we demonstrated that the EjEO improved the activity

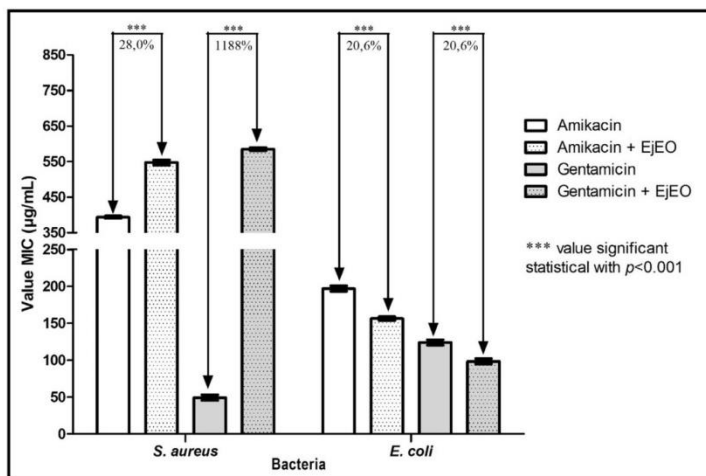


Fig. 1. EjEO (*Eugenia jambolana* essential oil) of leaves in association with antimicrobials against different strains of *E. coli* and *S. aureus*.

of the antibiotics against the gram-negative bacteria, which could be justified by the role that essential oils play in defending plants from phytopathogenic bacteria and fungi [17].

According to the research performed by Siani and collaborators [18] the EjEO is also effective in the control of the delayed reaction triggered by stimuli of bacterial origin, suggesting that this oil could be effective in the control inflammatory responses associated with bacterial infections.

In the modulation assays by the method of gaseous contact, the combination of the EjEO with amikacin or erythromycin against *P. aeruginosa* decreased the halos (Fig. 2), indicating that these associations presented synergistic effects. However, no noteworthy modulator effect was obtained from the association of EjEO with gentamicin. The association of the EjEO and ciprofloxacin and norfloxacin through gaseous contact against *S. aureus* and *E. coli* under exposure to red and

blue LED lights caused an increase in halo, indicating that these treatments presented synergism. However, no difference was shown between this result and the addition of the EjEO to these treatments (Figs. 3 and 4).

Phototherapy can be considered an alternative to reduce the abusive use of antimicrobials, with impact on microbial resistance. The effectiveness of this modality of therapy is possibly associated with the following mechanisms: alteration of cellular homeostasis, modulation of DNA and RNA synthesis, modifications of the membrane permeability, alkalization of the cytoplasm and cell membrane depolarization [19,20].

In this study, we demonstrated that the exposure to blue LED lights had similar effects against gram-positive or gram-negative bacteria. Even though the gram-negative bacteria are considered (due to their physical characteristics) harder to penetrate by the photons of the light

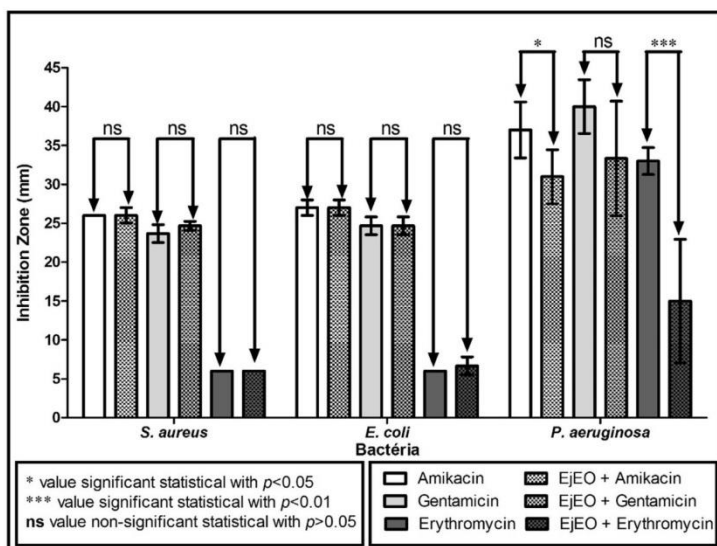


Fig. 2. EjEO (*Eugenia jambolana* essential oil) of leaves in association with antimicrobials against different strains of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

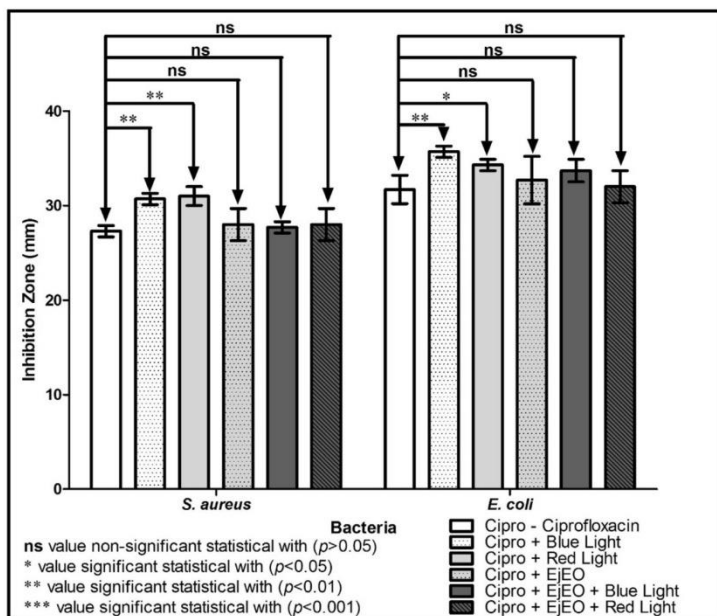


Fig. 3. EjEO (*Eugenia jambolana* essential oil) of leaves in association with antimicrobial and LED against different strains of *E. coli* and *S. aureus*.

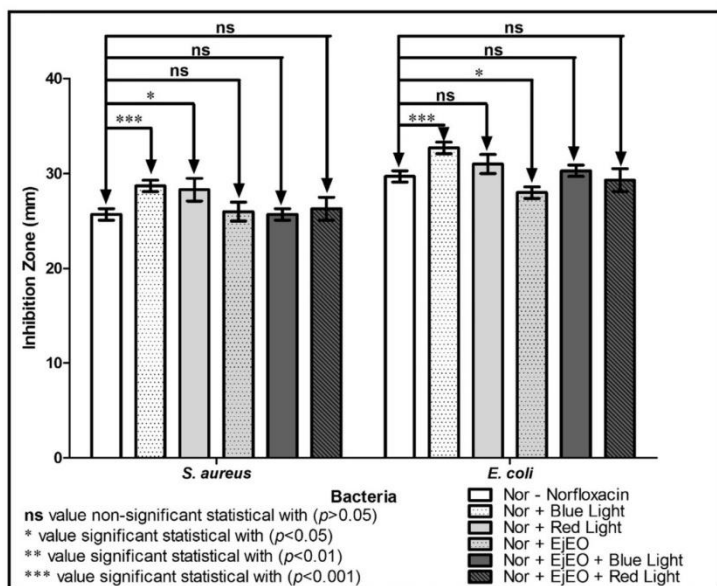


Fig. 4. EjEO (*Eugenia jambolana* essential oil) of leaves in association with antimicrobial and LED against different strains of *E. coli* and *S. aureus*.

therapy [21]. In addition, the synergistic effects obtained with the use of blue LED light may be due to a bactericidal action via induction of oxidative stress. In fact, it was previously reported that the light caused inactivation of *Propionibacterium acne* by inducing the removal of the external layer of electrons (especially of the oxygen atoms) of the molecules that form the cytoplasmic membrane of the bacteria [22].

4. Conclusion

The results obtained in this study demonstrated that the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* as well as the exposure to LED lights interfere with the action of antibiotics. These findings represent promising results in the search for new therapies for antibiotic-resistant bacterial infections. Finally, further research elucidating the

modulatory effects of the oil upon association with the LED lights is suggested.

Funding

This work supported by UNILEÃO (University Center Dr. Leão Sampaio-CE), URCA (University Regional of Cariri) and FUNCAP (Ceará Foundation for Research Support).

Competing interest

None of the authors had any conflict of interest to disclose.

References

- [1] U.P. De Albuquerque, N. Hanazaki, As pesquisas etnobotânicas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas, *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (2006) 678–689.
- [2] P.D.S. Santana, R.S. Andreza, V.I. Leite, P. Caracas, V. De Sousa, A. Aragão, Efeito antibacteriano e antifúngico de extratos etanólico, hexânico e metanólico a partir de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Malva corama) contra cepas multi-resistentes a drogas, *Biota Amazônia* (2016) 64–69.
- [3] H. Brötz-Oesterhelt, D. Beyer, H.-P. Kroll, R. Endermann, C. Ladel, W. Schroeder, B. Hinzen, S. Raddatz, H. Paulsen, K. Henninger, J.E. Bandow, H.-G. Sahl, H. Labischinski, Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics, *Nat. Med.* 11 (2005) 1082–1087.
- [4] S.C. Argenta, L.C. Argenta, S.R. Giacomelli, V.S. Cezarotto, Plantas medicinais: cultura popular versus ciência, *Rev. Eletrônica Extensão Da URI* 7 (2011) 51–60.
- [5] H.N.H. Veras, F.F.G. Rodrigues, A.V. Colares, I.R.A. Menezes, H.D.M. Coutinho, M.A. Botelho, J.G.M. Costa, Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol, *Fitoterapia* 83 (2012) 508–512.
- [6] P.F. Meyer, D. Sc, H.G. De Araújo, M. Goretti, F. Carvalho, B. Ingrid, S. Tatum, I. Cynthia, D.A. Gomes, O.A. Ronzio, M. Vinicius, D.M. Pinto, Artigo original Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar assessment of effects of LED on skin wound healing in Wistar rats, *Fisioterapia Brasil* 11 (2010) 428–432.
- [7] S.R. Tintino, F.A.B. da Cunha, K.K.A. dos Santos, G.M. de M Guedes, C.E.S. Souza, E.F.F. Matias, M.F.B. Moraes-Braga, J.C. Andrade, J.M. da Costa, M.A. de Freitas, H.D. de M Coutinho, Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas, *Rev. Bras. Biociências* 11 (2013) 157–162.
- [8] H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, E.O. Lima, Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (2010) 467–471.
- [9] A. Salvat, L. Antonnacci, R.H. Fortunato, E.Y. Suarez, H.M. Godoy, Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity, *Lett. Appl. Microbiol.* 32 (2001) 293–297.
- [10] S. Inouye, T. Takizawa, H. Yamaguchi, Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, *J. Antimicrob. Chemother.* 47 (2001) 565–573.
- [11] A. Bag, S.K. Bhattacharyya, N.K. Pal, R.R. Chattopadhyay, In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens, *Microbiol. Res.* 167 (2012) 352–357.
- [12] M.S. Baliga, H.P. Bhat, B.R.V. Baliga, R. Wilson, P.L. Palatty, Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1776–1789.
- [13] E.F.F. Matias, K.K.A. Santos, T.S. Almeida, J.G.M. Costa, H.D.M. Coutinho, Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenacea* DC, *Lat. Am. J. Pharm.* 29 (2010) 1049–1052.
- [14] F.A. Oladimeji, L.O. Orafidiya, I.N. Okeke, Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke, *Int. J. Aromather.* 14 (2004) 162–168.
- [15] R.A. Holley, D. Patel, Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, *Food Microbiol.* 22 (2005) 273–292.
- [16] H.N.H. Veras, A.R. Campos, F.F. Rodrigues, M.A. Botelho, H.D. Coutinho, J.G. da Costa, *Lippia alba* (Mill.) N.E. essential oil interfere with aminoglycosides effect against *Staphylococcus aureus*, *J. Essent. Oil Bear. Plants* 14 (2011) 574–581.
- [17] A.C. Siani, S. A.L.F., M.C. de Souza, M.G.M.O. Henriques, M.F.S. Ramos, Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório, *Biotechnol. Ciência Desenvolv.* 16 (2000) 38–43.
- [18] J.R. Perussi, Inativação Fotodinâmica de microrganismos, *Quim Nova* 30 (2007) 988–994.
- [19] H. Wagner, Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, *Fitoterapia* 82 (2011) 34–37.
- [20] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2329–2335.
- [21] T. Dai, A. Gupta, C.K. Murray, M.S. Vrahas, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist. Updat.* 15 (2013) 223–236.