



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



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS
NATURAIS SOBRE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS

MARIANA OLIVEIRA ARRUDA

SÃO LUÍS - UFMA
JUNHO/2016

MARIANA OLIVEIRA ARRUDA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS
NATURAIS SOBRE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Maria
Mendonça do Amaral

SÃO LUÍS - UFMA
JUNHO/2016

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

OLIVEIRA ARRUDA, MARIANA.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE
PRODUTOS NATURAIS SOBRE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS / MARIANA
OLIVEIRA ARRUDA. - 2016.

113 p.

Coorientador(a): FLÁVIA MARIA MENDONÇA DO AMARAL.

Orientador(a): VALÉRIO MONTEIRO NETO.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS,
2016.

1. Bixa orellana. 2. Chenopodium ambrosioides. 3.
Infecções respiratórias. 4. Mentha piperita. 5. Psidium
guajava. I. MENDONÇA DO AMARAL, FLÁVIA MARIA. II.
MONTEIRO NETO, VALÉRIO. III. Título.

MARIANA OLIVEIRA ARRUDA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS
NATURAIS SOBRE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral

Banca examinadora

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Orientador- Presidente da banca

Profa. Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim
Examinador 1 – interno

Profa. Dra. Silvana Amado Libério
Examinador 2 – interno

Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto
Examinador 3 – interno

Profa. Dra. Cristina de Andrade Monteiro
Examinador 4 – externo

SÃO LUÍS-UFMA
JUNHO/2016

À Deus, minha fonte de forças,
pela concretização de mais um sonho.
Aos meus pais, a quem amo profundamente, exemplo
de honestidade, determinação e amor, por terem me
apoiado ao longo de toda essa jornada.
A minha avó Mariana (*in memoriam*), exemplo de
vida e amor, minha grande companheira e
incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e me permitiu chegar até aqui, me dando sabedoria, paciência e força para superar os obstáculos e realizar essa conquista.

Aos meus amados pais, Raimundo Arruda e Eliene Oliveira, pelo exemplo de vida, pelo amor incondicional, carinho, preocupação, conselhos e por confiar que eu seria capaz de concretizar esse sonho. Por serem meu porto seguro e grandes incentivadores. Por terem acreditado no meu potencial, quando eu mesmo duvidava. Obrigada por tudo! Vocês são a razão do meu viver. Amo vocês!

Ao meu orientador prof. Dr. Valério Monteiro Neto, responsável pelo meu interesse na área de Microbiologia, com quem muito aprendi e tenho enorme admiração, agradeço por todo apoio, incentivo, pela valiosa orientação e confiança depositada, sem dúvida é um exemplo de profissional.

Aos professores da Rede Bionorte com os quais tive a oportunidade e o prazer de aprender, em especial à profa. Dra. Patrícia Albuquerque, coordenadora estadual do doutorado (Maranhão), pelo seu empenho, dedicação e competência para o funcionamento do programa.

As secretárias do Bionorte (Maranhão), Dayane Serra e Cleidiane Serra, pela atenção, dedicação e eficiência na resolução das etapas burocráticas.

Aos membros da banca de qualificação (profa. Dra. Elisabeth Fernandes; profa. Dra. Flávia Nascimento e profa. Dra. Silvana Libério) e de defesa por terem aceitado gentilmente participar da avaliação deste trabalho, por todas as correções e sugestões.

À profa. Dra. Elisabeth Fernandes por seu carinho, dedicação, simpatia, acompanhamento e inestimável ajuda na realização dos testes imunológicos e correções na escrita dos artigos. A senhora e seus alunos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Obrigada por tudo!

Aos professores da Universidade Ceuma, em especial profa. Dra. Maria Rosa Bomfim pelo carinho, carisma, preocupação e ajuda e ao prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto pela disponibilidade em sempre ajudar e por ter cedido a cepa de *Streptococcus pneumoniae*.

A toda minha família, em especial meus irmãos (Geraldo Arruda, Tamara Arruda, Viviane Arruda e Eva Arruda) e minha avó Eva Oliveira pela torcida, carinho e apoio incansável em todos os momentos.

A minha avó Mariana Arruda (*in memoriam*), pelo lindo exemplo de vida e de fé em Deus, por ter sido esse exemplo de mulher guerreira e de superação, que mesmo com todas as dificuldades vividas nunca se deixou abater. A minha eterna gratidão pelos

valiosos ensinamentos. Saudades sem fim. Você bem que tentou esperar esse momento, mas Deus precisou que você brilhasse lá no céu para iluminar os meus dias. Um dia nos reencontraremos minha amada avó.

A uma pessoa querida e amada, Hermínio Mendes, meu companheiro de longas datas, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, enxugando minhas lágrimas quando o desespero tomava conta de mim, e sorrindo comigo quando a vida me fazia sorrir. Obrigada por sempre poder contar com você, por todo apoio, ajuda, carinho, compreensão e por ter me dado força de chegar até aqui.

Aos colegas de doutorado, em especial Ana Carolina Dias, Bruno Abreu, Rosiane Penha e Suelen Ferreira pela amizade, carinho, conselhos e ajuda durante todo esse tempo.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa da Universidade Ceuma, em especial Monique Santos, Artur Castro, Saulo Figueiredo e Domingos Magno, pela amizade, carinho e pela indispensável colaboração na execução dos experimentos, sem vocês não conseguiria finalizar alguns testes. Saulo, você foi um grande parceiro!

À Margareth Penha, pessoa cativante, obrigada por todas as palavras de apoio e toda ajuda proporcionada durante a realização desta pesquisa.

À Soraia Silveira, com quem iniciei a pesquisa, um exemplo de pessoa determinada e compromissada, obrigada por toda a colaboração, amizade e carinho.

Ao Rômulo Vieira, meu companheiro de pesquisa, que muito me ajudou, obrigado por todo apoio no decorrer do projeto, por toda palavra de apoio e pelas risadas no momento de angústia.

À minha co-orientadora profa. Dra. Flávia Amaral, por todos os ensinamentos transmitidos.

À profa. Dra. Maria Nilce e seus alunos Ludmila Mesquita e José Wilson Mesquita pela atenção, ajuda e valiosa contribuição nas análises de cromatografias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa conquista, muito obrigada!

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

RESUMO

As infecções respiratórias são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Quando há o envolvimento de uma etiologia bacteriana, os antibióticos são geralmente indicados no tratamento dessas infecções. Por outro lado, o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem propiciado o desenvolvimento de resistência bacteriana, que representa um sério problema de saúde pública. Desta forma, existe a necessidade de investigação de novas alternativas para o controle dessas infecções, como por exemplo, produtos naturais para fins terapêuticos. Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de quatro espécies vegetais: *Bixa orellana* L. (urucum), *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Mentha piperita* L. (hortelã) e *Psidium guajava* L. (goiaba). A partir dos extratos hidroalcoólicos de *B. orellana* (sementes), *C. ambrosioides* (folhas), *M. piperita* (folhas) e *P. guajava* (folhas) foram realizadas investigação da atividade antimicrobiana *in vitro* pelo ensaio de difusão em ágar, seguido pela microdiluição em caldo, contra sete cepas bacterianas causadoras de infecções respiratórias, incluindo: *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. A atividade antimicrobiana sobre biofilme foi avaliada contra cepas de referência de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* produtoras de biofilme. Os extratos que apresentaram melhores atividades foram submetidos a caracterização química pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ensaio de citotoxicidade e avaliação da atividade anti-inflamatória pela dosagem de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, bem como análise da fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongo. Os resultados mostraram que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra, pelo menos, um dos microrganismos testados. O extrato de *B. orellana* apresentou o maior halo de inibição (16 mm) contra *S. pyogenes*, enquanto o menor halo (8 mm) foi verificado no extrato de *M. piperita* contra *B. pertussis* e *S. pyogenes*. O método de microdiluição em caldo foi mais sensível, tendo demonstrado que os extratos de *B. orellana*, *M. piperita* e *P. guajava* apresentaram atividade contra todos os patógenos testados. A menor concentração inibitória detectada foi de 0,5 mg/mL do extrato de *P. guajava* frente as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os extratos de *P. guajava* e *B. orellana* foram os únicos que apresentaram atividade sob a formação de biofilme, principalmente *B. orellana* com taxas de redução de 95% sob o biofilme formado por *P. aeruginosa* e de 93% sob o biofilme formado por *S. aureus*, ambos na concentração de 64 mg/mL. Dos quatro extratos estudados, destaca-se *M. piperita*, uma vez que apresentou atividade antimicrobiana contra todas as cepas estudadas e também reduziu a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados obtidos indicam o potencial dessa espécie vegetal na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e anti-inflamatório.

Palavras chave: Infecções respiratórias, *Mentha piperita*, *Psidium guajava*, *Chenopodium ambrosioides*, *Bixa orellana*.

ABSTRACT

Respiratory infections are leading causes of morbidity and mortality worldwide. The presence of a bacterial etiology generally leads to an intervention with antimicrobial therapy in these infections. Moreover, the abusive and indiscriminate use of antibiotics has produced bacterial resistance, which currently represents a serious public health problem. Thus, natural products may be new therapeutic options to combat drug-resistant bacteria. Given the above, this study aimed to investigate the antimicrobial and anti-inflammatory of four plant species: *Bixa orellana* L. (annatto), *Chenopodium ambrosioides* L. (American wormseed), *Mentha piperita* L. (peppermint) and *Psidium guajava* L. (guava). From the hydroalcoholic extracts of *B. orellana* (seeds), *C. ambrosioides* (leaves), *M. piperita* (leaves) and *P. guajava* (leaves) *in vitro* antimicrobial activity was determined by agar diffusion assay, followed by the broth microdilution assay, against seven bacterial strains causing respiratory infections, including: *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. The antimicrobial activity on biofilm formation was evaluated against reference strains of biofilm-producing *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The most promising extracts were subjected to chemical characterization by high-performance liquid chromatography (HPLC), cytotoxicity, and anti-inflammatory activity test by evaluation of nitric oxide and hydrogen peroxide inhibition as well as their effects on phagocytosis in mice peritoneal macrophages. The tested plant extracts showed antimicrobial activity against at least one of the microorganisms tested. The *B. orellana* extract showed the highest inhibition zone (16 mm) against *S. pyogenes*, while the smaller one (8 mm) was found in *M. piperita* extract against *B. pertussis* and *S. pyogenes*. The broth microdilution method was more sensitive, it was demonstrated that extracts of *B. orellana*, *M. piperita*, and *P. guajava* showed activity against all tested pathogens. The lowest inhibitory concentration detected was 0.5 mg/ml *P. guajava* extract front bacteria *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *P. guajava* and *B. orellana* extracts were able to reduce biofilm formation by *P. aeruginosa* in 95% and by *S. aureus* in 93%, both at a concentration of 64 mg/ml. Of the four plant extracts, the one from *M. piperita* was the most promising, since showed both antimicrobial activity against all the strains studied and the ability to reduce nitric oxide production in macrophages stimulated with LPS. The results indicate a potential of this plant species in the research and development of new antimicrobial agents against the major respiratory pathogens and their associated disease.

Key words: Respiratory infections, *Mentha piperita*, *Psidium guajava*, *Chenopodium ambrosioides*, *Bixa orellana*.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

FIGURA 1 – Modelo representativo do trato respiratório	18
FIGURA 2 – As principais causas de morte no mundo no ano de 2012	20
FIGURA 3 – Modelo de formação de biofilme	30
FIGURA 4 – Frutos e sementes de <i>Bixa orellana</i> L.	35
FIGURA 5 – Folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	37
FIGURA 6 – Folhas de <i>Mentha piperita</i> L.	38
FIGURA 7 – Folhas e frutos de <i>Psidium guajava</i> L.	40

ARTIGO 1

FIGURA 1 – Effect of hydroalcoholic extract of <i>Bixa orellana</i> (A) and <i>Psidium guajava</i> (B) against biofilms formed of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	81
---	----

ARTIGO 2

FIGURA 1 - Chromatographic profile of the hydroalcoholic extract of <i>Mentha piperita</i>	95
FIGURA 2 - Chromatographic profile of the hydroalcoholic extract of <i>Psidium guajava</i>	97
FIGURA 3 - Effect of the hydroalcoholic extract of (A) <i>P. guajava</i> and (B) <i>M. piperita</i> on the viability of peritoneal macrophages of Swiss mice cultured <i>in vitro</i> with or without LPS stimulation. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS ⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS ⁺ group. Each group contained four animals.....	99

FIGURA 4 - Effect of the hydroalcoholic extract of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* on the production of nitric oxide by peritoneal macrophages from Swiss mice cultured *in vitro* with or without LPS stimulation. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals..... 100

FIGURA 5 - Effect of the extract of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* on the production of hydrogen peroxide by peritoneal macrophages of Swiss mice cultured *in vitro* with or without LPS stimulation. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals..... 101

FIGURA 6 - Phagocytic profile of the extracts of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* expressed as the percentage of cells containing beads after the stimulation of peritoneal macrophages with LPS. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals..... 102

FIGURA 7 - Phagocytic profile of extracts of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* expressed as the bead/cell ratio after the stimulation of peritoneal macrophages with LPS. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicate a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals..... 103

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1 – Bacterial inhibition zones formed upon exposures to hydroalcoholic extracts from <i>B. orellana</i> (HAEB), <i>C. ambrosioides</i> (HAEC), <i>M. piperita</i> (HAEM), and <i>P. guajava</i> (HAEP) at concentrations of 16 mg/ml	78
TABLE 2 – Minimum inhibitory and bactericidal concentration values (mg/ml) of the plant extracts against respiratory tract bacterial pathogens	79
TABLE 3 – Phytochemical composition of hydroalcoholic extracts from <i>B. orellana</i> (HAEB), <i>C. ambrosioides</i> (HAEC), <i>M. piperita</i> (HAEM), and <i>P. guajava</i> (HAEP)	80

ARTIGO 2

TABELA 1 – Identification of the chemical compounds of the hydroalcoholic extract of <i>Mentha piperita</i> by high-performance liquid chromatography	96
TABELA 2 – Identification of the chemical compounds of the hydroalcoholic extract of <i>Psidium guajava</i> by high-performance liquid chromatography	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDP – Atenção Integrada às Doenças Prevalentes na Infância

AS – ágar Sangue

BG – ágar Bordet-Gengou

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IRAs – Infecções respiratórias agudas

ITRI – Infecções do trato respiratório inferior

ITRS – Infecções do trato respiratório superior

LPS – lipopolissacarídeo

MC – ágar MacConkey

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 – difeniltetrazólio

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Infecções respiratórias	18
2.2 Epidemiologia	19
2.3 Etiologia das infecções respiratórias	21
2.4 Principais bactérias associadas a IRAs	22
2.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	22
2.4.2 <i>Bordetella pertussis</i>	22
2.4.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
2.4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.4.6 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
2.4.7 <i>Streptococcus pyogenes</i>	27
2.5 Biofilmes bacterianos	28
2.5.1 Formação de biofilme.....	29
2.6 Resistência aos antimicrobianos.....	31
2.7 Profilaxia e tratamento.....	32
2.8 Produtos naturais	32
2.8.1 <i>Bixa orellana</i> L.....	34
2.8.2 <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	36

2.8.3 <i>Mentha piperita</i> L	38
2.8.4 <i>Psidium guajava</i> L	39
2.9 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos.....	43
4 JUSTIFICATIVA	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO 1: Screening of plant extracts from the Northeastern Brazil for antimicrobial activity against bacterial pathogens of the respiratory tract (Artigo enviado à revista <i>Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine</i>).	59
CAPÍTULO 2: Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of <i>Mentha piperita</i> L. and <i>Psidium guajava</i> L. leaves in murine peritoneal macrophages (Artigo a ser enviado à revista <i>International Immunopharmacology</i>).....	82
CAPÍTULO 3: Infecções respiratórias agudas virais: estudo clínico e epidemiológico (Livro publicado)	104
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
ANEXOS	110
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Ceuma	111

1 – INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias são enfermidades frequentes na população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento e correspondem ao primeiro motivo de consulta em ambulatorios e serviços de urgência, sendo responsável por um grande número de óbitos na população, principalmente em menores de um ano (ZAR; FERKOL, 2014).

Devido aos elevados índices de mortalidade, essas infecções têm despertado o interesse de pesquisadores no mundo inteiro por representarem um grave problema de saúde pública (MACEDO et al., 2003; RAJATONIRINA et al., 2013; SELVARAJ et al., 2014; ZAR; FERKOL, 2014). Apesar de muitas vezes serem autolimitadas, havendo uma regressão dos sintomas sem tratamento específico, outras vezes requerem o uso de antibióticos, principalmente quando o diagnóstico é de infecção do trato respiratório inferior.

Com a introdução dos antibióticos na década de 40, foi observada uma redução no número de mortes por infecções bacterianas em todo o mundo. Na atualidade, tem sido relatada uma elevação da frequência de casos de resistência bacteriana aos antibióticos, o que têm contrariado os avanços no tratamento dessas infecções (CHROMA; KOLAR, 2010; DAVIES; DAVIES, 2010).

Diante desse cenário, a procura por fontes alternativas de substâncias farmacologicamente ativas, tem despertado interesse na comunidade científica. As plantas de uso medicinal foram e continuam sendo utilizadas no tratamento e prevenção de diversas patologias (ROJAS et al., 2006; NEIVA et al., 2011; ROBINSON; ZHANG, 2011).

A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas, provavelmente tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. Desta forma e, considerando o potencial que o Brasil possui em relação à sua biodiversidade vegetal, considerada uma das maiores do mundo, torna-se necessário a bioprospecção de novas moléculas com propriedades antibióticas e anti-inflamatórias provenientes de produtos naturais da nossa flora, em especial aquelas indicadas no uso popular para infecções respiratórias, como: *Bixa orellana* L. (urucum), *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Mentha piperita* L. (hortelã) e *Psidium guajava* L. (goiaba).

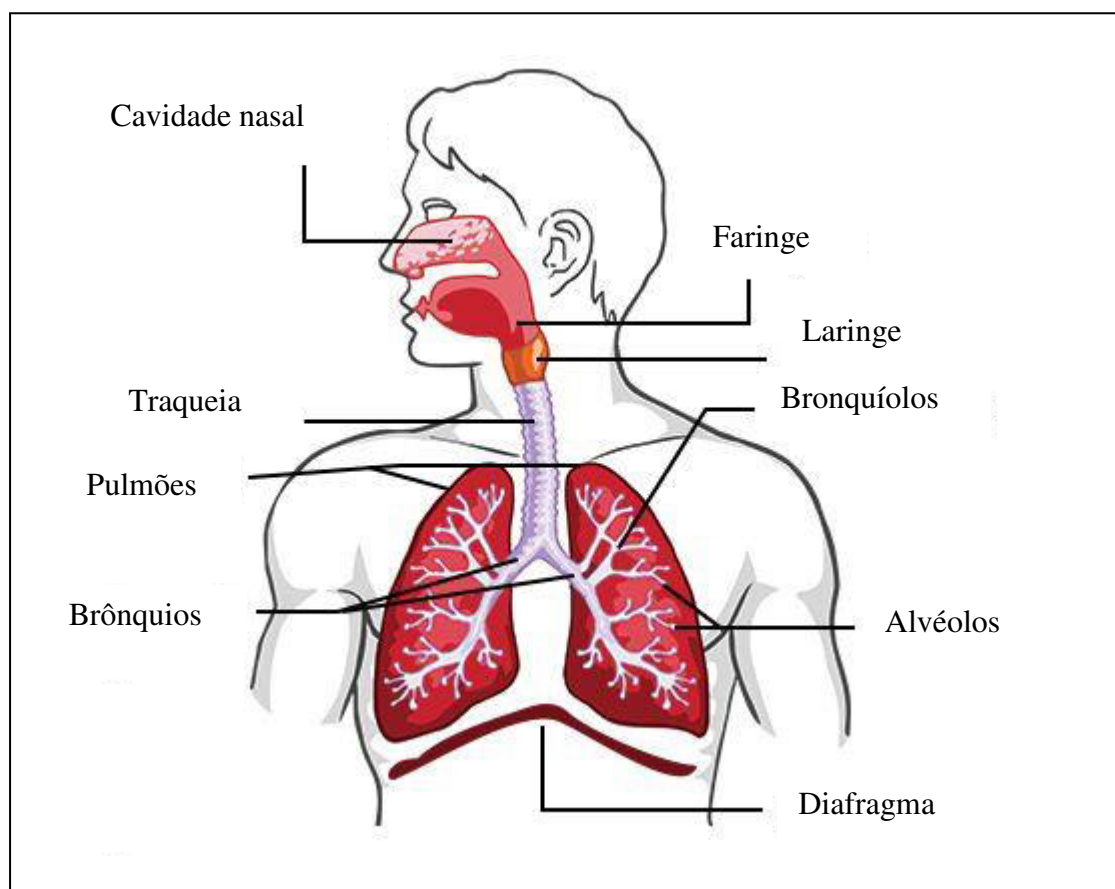
2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1– Infecção Respiratória

As infecções respiratórias agudas (IRAs) representam um importante problema de saúde pública e, mundialmente, estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade infantil, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos de idade (ZAR; FERKOL, 2014).

As IRAs são classificadas como infecções do trato respiratório superior (ITRS), e infecções do trato respiratório inferior (ITRI), dependendo dos principais órgãos afetados. O trato respiratório superior consiste das vias aéreas desde as narinas até as cordas vocais na laringe, incluindo os seios paranasais e o ouvido médio, enquanto que o trato respiratório inferior abrange a traqueia, os brônquios, além dos bronquíolos e pulmões (Figura 1) (BELLOS et al., 2010).

Figura 1. Modelo representativo do trato respiratório.



Fonte: Adaptado de www.pinterest.com

O espectro da doença pode variar desde infecções agudas como um simples resfriado até doenças graves, representadas por pneumonia, asma e bronquiolite (ZAR; FERKOL, 2014). Diferentes fatores podem levar ao agravamento dessas infecções e contribuir para o aumento das taxas de hospitalização. Entre estes fatores estão o baixo peso ao nascer, a desnutrição, a falta de imunização e baixa imunidade, tabagismo domiciliar, fatores sociais (como a renda familiar limitada, baixo nível de escolaridade dos pais, aglomeração) e fatores ambientais (como a poluição atmosférica) (PRIETSCH et al., 2008; KARR et al., 2009; SMITH et al., 2011).

2.2 – Epidemiologia

As IRAs acometem indivíduos de ambos os gêneros e de todas as idades, de recém-nascidos a idosos, com o maior número de casos detectados nos extremos de idade (OLIVEIRA et al., 2004). São mais frequentes nos meses frios e nas estações chuvosas das regiões temperadas e tropicais, respectivamente. Uma possível explicação para essa maior ocorrência seria o fato das pessoas ficarem mais tempo dentro de casa e nesses ambientes fechados, existe uma maior facilidade de transmissão de patógenos respiratórios, uma vez que os principais meios de transmissão são por aerossóis, contato com objetos contaminados ou por inalação de gotículas de secreções eliminadas durante a fala, tosse ou espirro (MURRAY et al., 2011).

As infecções respiratórias correspondem ao primeiro motivo de consulta em ambulatórios e serviços de urgência, representando a principal causa de internação hospitalar e a segunda causa de óbito em menores de um ano. Segundo um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença pulmonar crônica e infecções respiratórias inferiores continuam sendo as principais causas de morte detectadas na última década (Figura 2) (WHO, 2012).

Mundialmente, as IRAs são responsáveis por aproximadamente 20% dos óbitos em crianças pré-escolares (CAI et al., 2014). Apesar do número mundial de mortes em crianças abaixo de cinco anos ter declinado de 12,5 milhões, no ano de 1990, para menos de 9 milhões, no ano de 2008, estima-se que cerca de 4 milhões

ainda morrem anualmente por essas infecções. Os principais acometidos são os lactentes com menos de seis meses de vida, sendo a maioria, em decorrência de pneumonia (NAIR et al., 2010).

Figura 2. As principais causas de morte no mundo no ano de 2012.



Fonte: WHO, 2012

Na América Latina, a frequência das IRAs demonstra ser a principal causa de consulta ambulatorial pediátrica, chegando a representar 40 a 60% dos motivos de consulta (MACEDO et al., 2003). No Brasil, as doenças respiratórias são responsáveis por aproximadamente 10% das mortes entre os menores de um ano de idade, sendo a segunda causa de óbito na população de zero a um ano de idade e a primeira causa entre crianças de um a quatro anos. Com relação às regiões do país, segundo dados fornecidos pelo DATASUS, no ano de 2011 foram registrados 2.435 óbitos em crianças nessa faixa etária, destacando-se a Região Nordeste que apresentou o maior número de óbitos. Entre os estados dessa região, o Maranhão ocupou a primeira posição, com um total de 169 óbitos (DATASUS, 2012).

2.3 Etiologia das Infecções Respiratórias

As IRAs podem ser causadas por diferentes microrganismos, tais como: bactérias, vírus e fungos. Os vírus são os principais agentes etiológicos dessas infecções - responsáveis por 50 a 90% dos casos em crianças (NOHYNEK et al., 2009). Entre esses pode-se citar: vírus sincicial respiratório, vírus influenza, parainfluenza, adenovírus e metapneumovírus humano (MACEDO et al., 2003; CHUNG et al., 2007). Atualmente, são reconhecidos centenas de vírus identificados como agentes responsáveis pelo desenvolvimento de quadros respiratórios, seja como patógeno principal ou como coadjuvante, a infecções bacterianas secundárias em 20 a 30% dos casos que podem evoluir para óbito (MONTÓ, 2004).

As IRA de origem bacteriana apesar de ocupar o segundo lugar, representam a maior causa de letalidade, principalmente nos países em desenvolvimento. Entre as bactérias envolvidas nessas infecções pode-se mencionar: *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* (BENNETT et al., 2014).

No entanto, outras bactérias evidenciadas no passado como raras também podem estar envolvidas nessas infecções, como: *Escherichia coli*, *Chlamydia* e *Mycoplasma*. Isso foi demonstrado em alguns estudos realizado em hospitais, sendo estas bactérias responsáveis por mais de 10% dos casos de pneumonia (TANEJA et al., 2009; GRASSI et al., 2014; SELVARAJ et al., 2014). Além disso, o ressurgimento de doenças já controladas no passado, como a coqueluche, causada pela *Bordetella pertussis*, exige alerta ao sistema de saúde e atenção imediata para uma revisão no Plano Nacional de Vacinação (SELVARAJ et al., 2014).

Por outro lado, os fungos raramente causam infecções do trato respiratório na população em geral, entretanto algumas espécies têm sido associadas com comprometimento pulmonar em humanos imunocomprometidos, como: *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis carinii* (SAUBOLLE, 2000; CHEN et al., 2001).

2.4 - Principais bactérias associadas a IRAs

2.4.1 *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* é classificado na família Moraxellaceae, ordem Gammaproteobacteria e inclui os gêneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados. Este gênero compreende 31 espécies, sendo que 17 ainda não foram nomeadas e a espécie *Acinetobacter baumannii* é clinicamente, a mais importante (PELEG et al., 2008).

O gênero *Acinetobacter* compreende cocobacilos Gram-negativos, estritamente aeróbios, não fermentadores, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. Cultivadas, essas bactérias formam colônias de 1-2 mm de diâmetro, arredondadas e mucóides, bastante semelhante às colônias formadas pela família Enterobacteriaceae. Apresentam um bom crescimento em meios de cultura convencionais (água Sangue, água MacConkey) utilizados em laboratórios clínicos, à uma temperatura de 37°C de incubação (KONEMAN et al., 2012).

A espécie *A. baumannii* é identificada como frequente colonizadora em doentes hospitalizados e ambientes de prestação de cuidados de saúde, sendo comumente isolada de equipamentos tais como: raios-X, bancadas, leitos, ventiladores e sistemas de circulação de ar (FOURNIER; RICHET, 2006; BARCHITA et al., 2009). Classicamente associada a infecções nosocomiais, são responsáveis por vários tipos de infecções, como: sepse, pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremias, meningites e infecções urinárias (MARTINS; BARTH, 2013). A pneumonia nosocomial é a mais importante infecção causada por esse microrganismo, apresentando como fatores de risco a idade avançada, doença pulmonar crônica, imunossupressão, cirurgia e presença de tubos gástricos e endotraqueais (XIE et al., 2011).

2.4.2 *Bordetella pertussis*

A espécie *Bordetella pertussis* foi descoberta no ano de 1900 e isolada pela primeira vez em 1906 por Bordet e Gengou. Inicialmente, esta bactéria foi incluída no gênero *Haemophilus*, sendo posteriormente criado o gênero *Bordetella* em

homenagem a Bordet (GUIISO, 2009). As chamadas espécies clássicas do gênero *Bordetella*: *B. pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Bordetella avium* causam infecções do trato respiratório em diferentes hospedeiros, com exceção de *B. pertussis* que infecta somente seres humanos (GROSS et al., 2010).

Morfológicamente são caracterizadas como cocobacilos Gram-negativos fastidiosos, imóveis, encapsulados, aeróbios, não fermentam carboidratos e são catalase e oxidase positivas, redutoras de nitrato a nitrito, além de apresentarem exclusivo tropismo à camada mucosa do trato respiratório humano (KONEMAN et al., 2012).

B. pertussis é exigente nutricionalmente, portanto são empregados meios seletivos e enriquecidos como o Bordet-Gengou (BG) (a base de amido) ou o Regan-Lowe (a base de carbono). Nas culturas, o crescimento é lento e as colônias são visualizadas depois de dois a quatro dias de incubação. No ágar BG as colônias são descritas como lisas e brilhantes, com centro elevado, em forma de cúpula, classicamente semelhantes a pequenas gotas de mercúrio, podendo ser ligeiramente β -hemolíticas, sobretudo nas áreas mais confluentes de crescimento ou após incubação prolongada (KONEMAN et al., 2012).

A doença causada por esta bactéria é a coqueluche também denominada tosse comprida. É uma doença de notificação compulsória, que possui distribuição universal, altamente transmissível e contagiosa em especial nos lactentes, caracterizada por espasmos de tosse intensa (paroxismos). Os paroxismos são contínuos, sem inspiração até o final e, muitas vezes, seguidos pelo guincho inspiratório característico e/ou vômito pós-tosse (CDC, 2000; GUERRA, 2006).

A coqueluche representa um crescente problema de saúde pública em vários países do mundo, sendo considerada a terceira causa de morte entre as doenças imunopreveníveis. Estima-se que sua ocorrência anual global seja da ordem de 50 milhões de casos e, aproximadamente 300 mil mortes, com uma letalidade estimada em 1% em países em desenvolvimento e 0,04% em países desenvolvidos (WHO, 2005).

Apesar da incidência da coqueluche ter diminuído substancialmente devido a efetiva proteção em crianças, a prevalência em grupos de maior idade como adolescentes e adultos, tem aumentado em vários países, principalmente Estados

Unidos e Canadá. Na realidade, desde 2001, as taxas nesse grupo são mais elevadas do que em outras faixas etárias (LUTSAR et al., 2009). A coqueluche em adultos e adolescentes tem sido evidenciada como um dos fatores que condicionam a persistência da enfermidade em comunidades com baixas taxas de cobertura vacinal (BRICKS, 2007).

2.4.3 *Klebsiella pneumoniae*

A espécie *Klebsiella pneumoniae* pertence à família Enterobacteriaceae, morfologicamente estas bactérias são caracterizadas por apresentarem formato de bastonete, são imóveis, encapsuladas e não esporuladas. Em meios de cultura seletivos e diferenciais, como ágar MacConkey (MC), as colônias são tipicamente grandes, brilhantes, quase sempre de aspecto mucoide e coloração rosada pela fermentação da lactose. Apesar de serem anaeróbias facultativas essas bactérias crescem melhor em condições de aerobiose. Na coloração de Gram, são visualizadas como bacilos Gram-negativos, isolados, aos pares ou em cadeias curtas (KONEMAN et al., 2012).

Esses microrganismos são ubiqüitários, podendo ser encontrados em quase todos os ambientes naturais, e adicionalmente como colonizadores de mucosas em animais e seres humanos. Além de representarem importante causa de septicemia, abscessos abdominais, pneumonias e infecções dos tratos gênito-urinário e respiratório, tanto de pacientes normais quanto imunocomprometidos (PATERSON, 2006; LANDMAN et al., 2007), sendo uma das principais causadores de infecções hospitalares, chegando a ser responsável por até 29% dessas infecções (PEREIRA et al., 2003).

2.4.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa pertencente ao gênero *Pseudomonas*. Apresenta-se sob a forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, podendo ser encontradas isoladas, aos pares ou, ocasionalmente, em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríquio (KONEMAN et al., 2012).

Esse microrganismo é um aeróbio obrigatório que cresce à temperatura de 37° a 42°C. Pode ser cultivado em vários meios de cultura, produzindo algumas vezes, um odor adocicado ou semelhante ao de uva. Na cultura, observa-se colônias lisas e redondas, com coloração esverdeado-fluorescente, devido a produção de um pigmento chamado pioverdina, algumas também produzem um pigmento azulado não-fluorescente (piocianina), outras cepas produzem o pigmento vermelho (piorrubina) ou negro (piomelanina) (KONEMAN et al., 2012).

Essa espécie encontra-se amplamente distribuída na natureza e costuma ser encontrada em ambientes úmidos, nos hospitais e também como parte da microbiota do ser humano, podendo ser encontrada na pele e garganta de indivíduos sadios (MATA; ABEGG, 2007). No ambiente hospitalar, pode ser isolada a partir de instrumentos, tais como umidificadores, colchões e outros equipamentos, bem como a partir da pele dos profissionais de saúde, tendo o potencial de se espalhar horizontalmente através de fômites (MELLMANN et al., 2009; CHAWLA et al., 2013).

Essa bactéria é resistente a diversos fármacos e capaz de produzir fatores de virulência, causando uma variedade de infecções que compreendem desde infecções superficiais de pele até sepse fulminante, sendo comumente associada com infecções do trato respiratório (FERREIRA; LALA, 2010).

2.4.5 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexander Ogston. Esse gênero pertence à família Micrococcaceae e possui 33 espécies, sendo *S. aureus* a espécie de maior interesse clínico (SANTOS et al., 2007).

S. aureus são caracterizados morfológicamente como cocos Gram-positivos que podem ser encontrados isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados, cujo arranjo celular assemelha-se a cachos de uva. Quanto as suas características bioquímicas são imóveis, não esporulados, geralmente não encapsulados, catalase-positiva e oxidase-negativa. A temperatura ótima de crescimento é entre 35° a 37°C e crescem em uma faixa de pH entre 4 e 9, sendo o ótimo entre 6 e 7 (KONEMAN et al., 2012).

O gênero *Staphylococcus* forma colônias arredondadas, lisas, opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie e do meio de cultura. Em ágar Sangue (AS), algumas cepas produzem β -hemólise, formando uma zona transparente ao redor da colônia (SANTOS et al., 2007).

A espécie *S. aureus* é capaz de provocar uma variedade de infecções desde intoxicações alimentares a pneumonias (GORDON; LOWY, 2008). Como agente de infecções associadas a serviços de saúde, denominadas infecções hospitalares ou nosocomiais, é o patógeno isolado com maior frequência, realçando o seu papel como agente etiológico das principais infecções hospitalares, tais como infecções de sítio cirúrgico, endocardites, pneumonias e bacteremias. Percebe-se ainda, uma marcante tendência desse microrganismo em desenvolver resistência aos antimicrobianos (GRUNDMANN et al., 2010).

Um aspecto importante de *S. aureus* é o estabelecimento de uma relação comensal com os seres humanos, com a colonização assintomática de indivíduos. As narinas são o local de colonização mais frequente, mas a orofaringe, as axilas, a vagina, o trato digestivo e a pele também são colonizadas com frequência (WERTHEIM et al., 2005).

2.4.6 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ou pneumococo é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e encapsulada. Geralmente ocorre aos pares em arranjo de diplococos lanceolados, podendo ocasionalmente ser encontrada de forma isolada ou em pequenas cadeias. Suas colônias são esféricas, planas e, quando cultivada em meio AS produz uma hemólise parcial denominada de α -hemólise, que é evidenciada pela formação de uma área esverdeada ao redor da colônia (KELLOGG et al., 2001).

Essa bactéria foi isolada pela primeira vez na década de 80 pelo médico e bacteriologista americano George M. Sternberg e pelo químico e bacteriologista francês Louis Pasteur, sendo nesse mesmo período identificada como a maior causadora de pneumonia humana (LÓPEZ, 2006). Possui mais de 90 sorotipos imunologicamente distintos, e mundialmente possui grande importância epidemiológica na distribuição de doenças pneumocócicas invasivas (pneumonias,

meningite, sepse e artrite) e não-invasivas (sinusite, otite média aguda, conjuntivite e bronquite) (JAUNEIKAITÉ et al., 2015).

As doenças causadas pelo pneumococo, especialmente as pneumonias, constituem um dos principais problemas de saúde pública na infância, devido as elevadas taxas de morbimortalidade. A doença pneumocócica é a principal causa de óbitos por doenças imunopreveníveis na infância (O'BRIEN et al., 2009; WALKER et al., 2013). Segundo a OMS, no ano de 2008 cerca de 500 mil crianças menores de 5 anos de idade morreram em decorrência de infecções por *S. pneumoniae* (WHO 2008). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença incluem idade menor de 2 anos, desnutrição, baixo nível sócio-econômico e presença de comorbidades, tal como infecção pelo vírus HIV (LE ROUX et al., 2015).

O elevado número de episódios anuais de pneumonia em crianças é responsável por grande parte dos atendimentos nos diferentes níveis de atenção à saúde, mesmo em países desenvolvidos. Em 2011 foram estimados 120 milhões de casos de pneumonia em crianças menores de 5 anos de idade em todo o mundo, dos quais 14 milhões progrediram para doença grave com necessidade de hospitalização e 1,3 milhões evoluíram para óbito; a maior parte das mortes ocorreu em menores de 2 anos de idade (81%) e em países em desenvolvimento (99%) (WALKER et al., 2013).

Além das altas taxas de incidência e óbito relacionadas a pneumonia, a morbidade da doença na população pediátrica é considerada extremamente elevada em todos os continentes, principalmente em regiões de baixa e média renda. A maior carga de hospitalização por pneumonia ocorre em crianças menores de 12 meses de idade, residentes em países em desenvolvimento como o Sudeste Asiático, Pacífico, África, e Américas Central e do Sul, onde são estimados até 5.200/100.000 hospitalizações por pneumonia, enquanto nos países desenvolvidos, a estimativa é de menos de 2.000 casos por 100.000 habitantes (NAIR; NIEDERMAN, 2013).

2.4.7 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes é uma bactéria Gram-positiva, pertencente à família Streptococcaceae. Morfologicamente é caracterizada como cocos de 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, os quais frequentemente formam agrupamentos aos pares ou em cadeias.

São anaeróbias facultativas, catalase-negativa, imóveis e crescem otimamente à 37°C. Suas necessidades nutritivas são complexas, mas de modo geral, crescem bem em AS, formando colônias β -hemolíticas (CHANG et al., 2011; KONEMAN et al., 2012).

Essa bactéria possui relevância clínica em todo o mundo, sendo responsável por várias infecções, que podem variar desde infecções leves, como faringite e impetigo, até infecções graves, representadas pela fascíte necrosante e a síndrome do choque tóxico estreptocócica (WALKER et al., 2014).

O principal sítio de infecção dessa bactéria é o trato respiratório superior, portanto, comumente estão associadas às infecções primárias da faringe e amígdalas. A faringite estreptocócica pode acometer todas as faixas etárias, porém são mais comuns em crianças e adolescentes com idade entre 5 e 15 anos. Em torno de 30 a 40% das faringoamigdalites agudas, a etiologia é estreptocócica, sendo estimado que ocorram globalmente mais de 600 milhões de casos por ano (CARAPETIS et al., 2005). A maior preocupação frente a esse dado é a ocorrência de complicações causadas por esse agente patogênico, como por exemplo, a glomerulonefrite e a febre reumática, esta última representando 90% das indicações de cirurgia para troca de valvas cardíacas em crianças no Brasil (VIEIRA et al., 2006).

2.5 Biofilmes bacterianos

As bactérias são microrganismos que possuem relativa simplicidade morfológica e grande diversidade genética e metabólica, razão pela qual se adaptam a diversas condições no planeta, como: concentrações reduzidas de nutrientes, extremos de temperatura, pH, salinidade, entre outras, e podem existir em dois estados de vida básicos: como células planctônicas, também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também denominadas biofilmes (TRENTIN et al., 2013).

Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade séssil, caracterizada por células que formam microcolônias, irreversivelmente aderidas a um substrato biótico ou abiótico, embebidas numa complexa matriz extracelular polimérica, composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (DONLAN, 2002).

Os biofilmes são estruturas biológicas com elevado grau de organização, onde os microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais, podendo desenvolver-se em qualquer superfície úmida, seja ela biótica ou abiótica,

como na pele, mucosas, nos dentes, cateteres e implantes médicos (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002).

De acordo com o *National Institute of Health*, nos EUA, aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a microrganismos produtores de biofilmes, especialmente, envolvendo biomateriais. Na década de 90, a importância dos biofilmes bacterianos foi destacada por Costerton (1999), o qual salientou que a formação de biofilmes e a sua inerente resistência aos antimicrobianos constituem a causa de muitas infecções crônicas e persistentes, como doença periodontal, endocardites, infecção pulmonar crônica, infecções de cateter, infecções de ouvido médio, entre outras (DONLAN, 2001).

As infecções causadas por bactérias produtoras de biofilme representam um sério problema de saúde pública, pois os biofilmes prejudicam a penetração de antibióticos por causa dos componentes da matriz, dificultando as respostas imunológicas normais, levando com isso, a um aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos infectados (CHAIGNON et al., 2007).

Uma das mais importantes características dos biofilmes bacterianos é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos. Bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica, indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de bactérias planctônicas aos mesmos agentes (MAH; O'TOOLE, 2001).

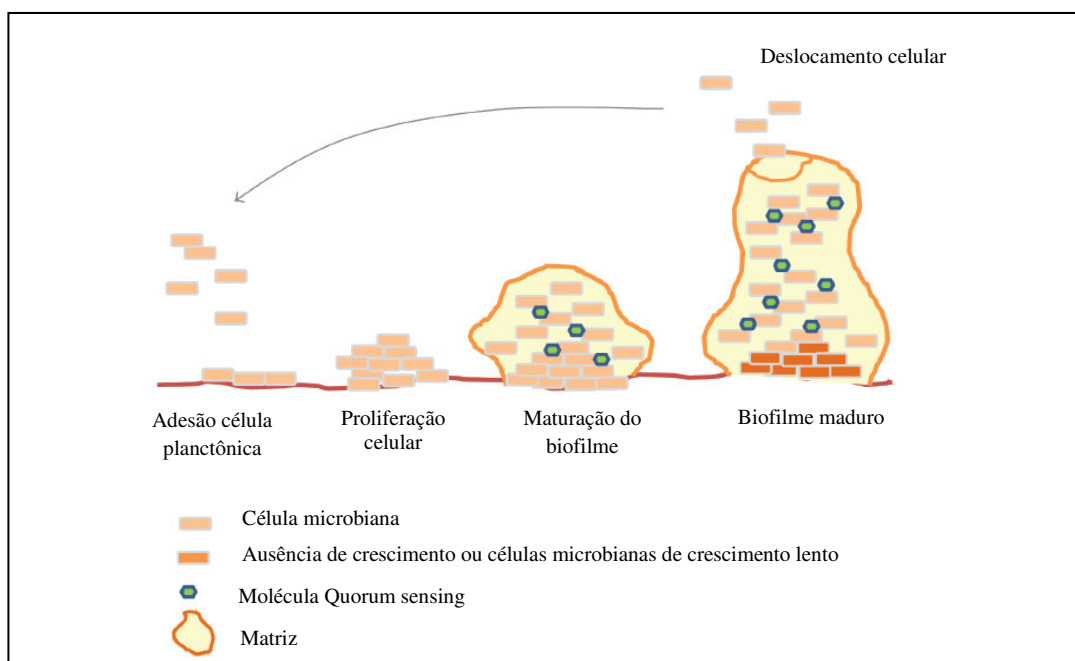
Bactérias em biofilmes apresentam alterações fenotípicas e genotípicas que as diferem das células planctônicas, podendo ser estratégias de sobrevivência dos microrganismos às condições ambientais adversas (COSTERTON, 1999).

2.5.1. Formação de Biofilme

Os biofilmes bacterianos são formados quando microrganismos unicelulares se tornam irreversivelmente aderidos a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares (MAH; O'TOOLE, 2001).

O primeiro estágio para formação de biofilmes (Figura 3) é a adesão primária, também conhecida como adesão reversível, a qual pode ocorrer tanto em superfície abiótica quanto biótica. O segundo estágio é a adesão secundária ou irreversível, onde ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou proteica produzido pela bactéria. Nessa fase, as fímbrias poliméricas ligam a célula bacteriana ao substrato, tornando difícil a remoção do biofilme (STOODLEY et al., 2002). Portanto, a adesão bacteriana é um processo bastante complexo que envolve a interação multifacetada de três componentes: a bactéria, a superfície (biótica ou abiótica) e o microambiente em que eles se encontram (DAROUICHE, 2001). O terceiro e último estágio evidencia a colonização ou crescimento e divisão de organismos sobre a superfície. Finalmente, quando o biofilme atinge uma etapa de amadurecimento, a massa bacteriana é liberada e os microrganismos desprendidos poderão colonizar novos ambientes causando contaminação (DONLAN, 2001).

Figura 3. Modelo de formação de biofilme.



Fonte: Adaptado Taraszkiewicz et al., 2012

2.6 Resistência aos antimicrobianos

A descoberta dos antibióticos revolucionou a história da medicina. Na realidade, pode-se afirmar que foi o avanço mais importante da ciência no século XX, considerando os efeitos da inovação científica, os benefícios para a saúde pública e, conseqüentemente, o ganho econômico (PITA; PEREIRA, 2009).

Desde então, esses fármacos têm contribuído para diminuir o número de mortes por infecções bacterianas. No entanto, a sua utilização indiscriminada tem dificultado o tratamento dessas infecções, tendo em vista a emergência de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado, diminuindo assim as opções terapêuticas (SANDER; GALES, 2008; CHROMA; KOLAR, 2010; DAVIES; DAVIES, 2010).

Nas últimas décadas tem ocorrido um crescente aumento na resistência bacteriana entre os principais patógenos causadores de infecções respiratórias em crianças, com relevantes repercussões clínicas (JACOBS, 2003). Este fato se deve a diversos fatores, entre eles a dificuldade de se estabelecer na prática clínica a etiologia dessas infecções; o uso abusivo ou inadequado de fármacos; a globalização, facilitando a transmissão de patógenos resistentes de um país a outro, através de viajantes infectados; a falta de um sistema global de vigilância epidemiológica da resistência bacteriana aos antimicrobianos, que possa gerar informação para a tomada de decisões e elaboração de políticas terapêuticas e reguladoras (MAcFARLANE; HOLMES, 1997).

Estudos de vigilância de resistência aos antimicrobianos têm mostrado que o nível de resistência das principais bactérias envolvidas em infecções respiratórias frente aos diversos agentes antimicrobianos, principalmente os beta-lactâmicos tem aumentado significativamente nos últimos anos (BAQUERO et al., 1998; MENDES et al., 2002). Embora este problema de aumento de resistência não seja recente, pode-se ter futuramente, um impacto clínico bastante preocupante, com cada vez mais respostas terapêuticas inadequadas.

Diante do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, como as plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas. Na sociedade moderna, é crescente o interesse em terapias alternativas e uso terapêutico de produtos naturais. Desde a antiguidade as plantas são utilizadas

com propósitos terapêuticos, estando envolvidas no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (KINGSTON, 2011).

2.7 Profilaxia e Tratamento

Considerando a IRA como um sério problema de saúde pública, a OMS juntamente com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e o Fundo das Nações Unidas implantou um programa de prevenção e controle dessas infecções denominado Atenção Integrada às Doenças Prevalentes na Infância (AIDPI), que foi adotado no ano de 1996 pelo Ministério da Saúde (ALBUQUERQUE, 2006). Esse programa visa diminuir a taxa de mortalidade infantil por doenças respiratórias, além de permitir a diferenciação entre crianças que necessitam de internação hospitalar, as que precisam de tratamento antimicrobiano e aquelas que podem ser tratadas em casa, com medidas para aliviar os sintomas (BENGUIGUI, 2003).

A lavagem das mãos é apontada como um dos procedimentos mais importantes para a prevenção da transmissão de patógenos do trato respiratório. No entanto, essa prática simples, considerada como um princípio universal de higiene, é uma das mais difíceis de ser realizada por parte das crianças e adultos (VICO; LAURENTIL, 2004).

A maioria dos casos de infecções do trato respiratório é usualmente autolimitada e não existe tratamento específico, apenas procedimentos de suporte e paliativos. Os antimicrobianos normalmente não são recomendados para o tratamento de IRTS, diferentemente das ITRI, que geralmente são mais graves e necessitam de medicamentos, no entanto, esses devem ser prescritos por médicos (LI et al., 2014)

2.8 Produtos naturais

O emprego de plantas como medicamentos se dá desde o início da história da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas, provavelmente tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (KINGSTON, 2011).

As plantas de uso medicinal são frequentemente utilizadas no tratamento e prevenção de diversas patologias, sendo consideradas fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em matérias-primas ou protótipos para síntese de novos fármacos. Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos comercializados sejam provenientes direta ou indiretamente de plantas medicinais (ROBINSON; ZHANG, 2011).

Nesse contexto, cabe ressaltar as diferenças conceituais entre medicamento fitoterápico e planta de uso medicinal. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 14 (2010) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas e sem agregação de nenhuma substância farmacologicamente ativa, enquanto planta de uso medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2010b).

O interesse popular no uso de planta medicinal para fins terapêuticos tem sido muito significativo, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. De acordo com a OMS, entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI et al., 2007).

Nos países em desenvolvimento, especialmente na Ásia, África, América Latina e Oriente Médio cerca de 70% a 95% da população, dependem da medicina tradicional para a atenção básica de saúde. Contudo, em alguns países desenvolvidos como Canadá, França, Alemanha e Itália o uso de medicamentos tradicionais é igualmente significativo, sendo utilizado pela população sob os títulos de “complementar”, “alternativos” ou “não convencionais” (ROBINSON; ZHANG, 2011).

O Brasil é um país privilegiado por possuir a maior biodiversidade do planeta, com mais de 55.000 espécies de plantas catalogadas, correspondendo a 20% da flora mundial, tornando-se um patrimônio genético de grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Por outro lado, apenas uma pequena parcela, em torno de 8% dessa biodiversidade, foi estudada até o momento (GIULIETTI et al., 2005; FRANCISCO, 2010).

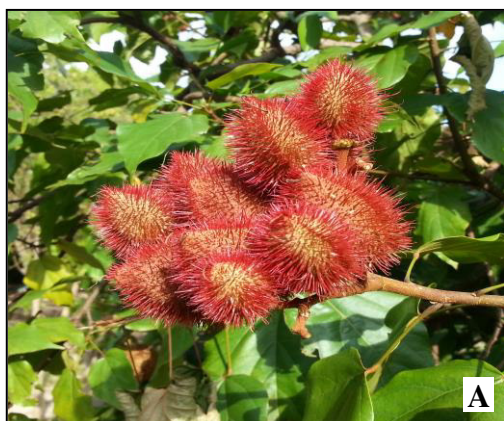
Os biomas brasileiros são muito diversificados e ricos, muitas plantas encontradas nesse ecossistema são usadas na medicina tradicional no tratamento de doenças tropicais, incluindo infecções bacterianas (FRANCISCO, 2010). Apesar do enorme potencial que o Brasil possui quanto a sua biodiversidade vegetal, como fonte de novos compostos para o desenvolvimento de fármacos, ainda existe uma grande dependência tecnológica de outros países. As investigações científicas são limitadas, e ainda não existem estudos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número de plantas, isso ocorre pela falta de investimentos das indústrias farmacêuticas brasileiras em pesquisa e desenvolvimento ou pela modesta política de incentivo à biotecnologia nacional (DRUMMOND et al., 2009).

Considerando que as plantas são conhecidas como a principal fonte de drogas utilizadas na terapia, com comprovação de ações farmacológicas relevantes, faz-se necessário o reconhecimento e validação dessas informações e a procura por novas estratégias derivadas de produtos naturais para o controle de algumas doenças infecciosas incluindo as infecções respiratórias, com elevada prevalência no Nordeste brasileiro, particularmente no estado do Maranhão.

2.8.1 *Bixa orellana* L.

A espécie botânica *Bixa orellana*, pertence à família Bixaceae, ordem Malvales e é popularmente conhecida como urucum, urucuzeiro, anoto, colorau, falso-açafrão. Originária de florestas tropicais da América Sul, América Central e Ásia é uma planta ornamental, pela beleza e colorido de suas flores e frutos, possui um desenvolvimento rápido, podendo atingir entre três e seis metro de altura dependendo das condições ecológicas. As folhas são simples e glabras. Suas flores são levemente rosas e o fruto é uma cápsula deiscente ovoide, chamada de “cachopas” (Figura 4), cobertos por espinhos e comportam em seu interior uma média de 30 sementes (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 4. Frutos e sementes de *Bixa orellana*: (A) Cachopas; (B) sementes.



Fonte: Autora

As sementes de *B. orellana* são revestidas externamente por pigmentos avermelhados, constituídos principalmente pelos carotenoides bixina e norbixina, amplamente empregados pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e têxteis (JAKO et al., 2002; KIOKIAS; GORDON, 2003).

Além de corante natural na culinária, *B. orellana* é utilizada na medicina popular, principalmente para doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias, queimaduras, como cicatrizante, laxante e afrodisíaco (CASTELLO et al., 2002; GÓMEZ et al., 2012). Suas sementes possuem funções condimentares, estomáquicas, laxativas, cardiotônica, hipotensora e expectorantes, podendo agir também como anti-inflamatório. A infusão das folhas tem ação contra bronquites, faringite e inflamação dos olhos (LORENZI; MATOS, 2008).

Alguns estudos têm demonstrado atividade antimicrobiana do extrato de *B. orellana*. No estudo de Irobi et al. (1996), utilizando extrato etanólico das folhas de *B. orellana* relataram atividade contra *Bacillus subtilis* e *S. aureus*. Silva et al. (2010) detectaram atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da raiz, caule e folha de *B. orellana* frente as cinco bactérias testadas: *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Proteus mirabilis* e *P. aeruginosa* pelo método de difusão em ágar. Várias são as propriedades atribuídas a esta planta e que são exploradas pela medicina tradicional das quais já mencionado acima, por isso a importância de mais estudos para comprovar a sua viabilidade terapêutica.

2.8.2 *Chenopodium ambrosioides* L.

Chenopodium ambrosioides é conhecida popularmente como erva de Santa Maria, mastruz, mastruço, erva-de-bicho, ambrosina, erva do formigueiro e quenopódio, pertence à família Amaranthaceae, subfamília Chenopodioideae e gênero *Chenopodium*. É uma planta nativa da América, originária, provavelmente do México, possui distribuição cosmopolita, sendo encontrada em regiões de climas tropical, subtropical e temperado (LORENZI; MATOS, 2008; MONZOTE et al., 2009) e, no estado do Maranhão é considerada exótica, porém bastante cultivada devido aos seus efeitos terapêuticos.

É uma planta perene ou anual, muito ramificada, de hábito herbáceo e aromática, possui folhas simples, alternadas, pecioladas e providas de pelos (Figura 5). Exibe um caule, cuja altura pode variar desde 0,20 a 1,50 m, as flores são pequenas, verdes, dispostas em espigas axilares densas. Os frutos são muito pequenos e do tipo aquênio, esféricos, rico em óleo e muito numerosos, geralmente confundidos com sementes. Vale ressaltar que toda a planta tem um odor forte e característico (LORENZI; MATOS, 2008).

A composição química de extratos e óleo essencial de *C. ambrosioides* tem sido alvo de muitos estudos. Investigações fitoquímicas sobre essa espécie revelaram grande variedade de compostos orgânicos, destacando: terpenos, esteroides, saponinas, flavonoides e alcaloides (KOKANOVA-NEDIALKOVA et al., 2009). Cavalli et al. (2004) analisaram o óleo essencial de *C. ambrosioides* de Madagascar, identificando as substâncias: ascaridol (41,8%), isoascaridol (18,1%) e p-cimeno (16,2%). Jardim et al. (2008) avaliaram o óleo essencial de *C. ambrosioides* do Brasil e identificaram Z-ascaridol (44,4%), E-ascaridol (30,2%) e p-cimeno (25,4%).

Na medicina popular essa espécie vegetal é utilizada no tratamento de verminoses, giardíase e leishmaniose (COUTINHO et al., 2002; BEZERRA et al., 2006; NEIVA et al., 2011; MONZOTE et al., 2014). Estudo realizado por Mello et al. (2006) demonstraram que o extrato aquoso de *C. ambrosioides* possui ação nematicida *in vitro* quando estocado por 24 horas nas concentrações de 2 e 20%, sobre *Pratylenchus brachyurus*, sendo uma opção para seu controle. No estudo de Reis et al. (2010), o extrato hexânico de *C. ambrosioides* mostrou atividade anti-

helmíntica *in vitro* e adicionalmente reduziu a reação inflamatória produzida pela infestação de larvas de *Toxocara canis in vivo*.

Figura 5. Folhas de *Chenopodium ambrosioides*.



Fonte: Autora

Com relação a atividade antimicrobiana, Shah et al. (2014) testando o extrato metanólico da raiz de *C. ambrosioides* contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*, encontraram atividade para todos os microrganismos testados. Enquanto Brito et al. (2007) não encontraram atividade antimicrobiana para o extrato aquoso das folhas de *C. ambrosioides* contra *E. coli* e *S. aureus* pelo método de difusão em ágar.

Os testes *in vitro* para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana são fundamentais para uma adequada antibioticoterapia, pois contribuem para escolha de uma melhor alternativa de tratamento, reduzindo a possibilidade de falha terapêutica. Diante disto e, adicionalmente, sabendo que essa espécie vegetal está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS), implementado pelo governo brasileiro como possibilidade de serem usadas como fitoterápicos e medicamentos, ressalta-se a importância desse estudo, uma vez que realiza uma avaliação da atividade antimicrobiana dessa espécie contra as principais bactérias associadas a infecções respiratórias.

2.8.3 *Mentha piperita* L.

As plantas do gênero *Mentha*, conhecidas popularmente no Brasil como hortelã ou menta, compreendem cerca de 30 espécies pertencentes à família Lamiaceae. Essas plantas são originárias da região Mediterrânea e parte da Ásia, sendo atualmente distribuída por todo o mundo. Foram trazidas para o Brasil no período da colonização (DORMAN et al., 2003; WATANABE et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2008).

As espécies desse gênero apresentam grande complexidade botânica, são plantas herbáceas e perenes, de crescimento rápido e fácil, com caules violáceos e ramificados, folhas opostas, serradas, pecioladas e cor variando entre verde-claro e verde-escuro, flores lilases ou azuladas dispostas em espigas terminais e fruto tipo aquênio (Figura 6) (WATANABE et al., 2006).

Figura 6. Folhas de *Mentha piperita*



Fonte: autora

A composição do óleo essencial de *M. piperita* pode variar em função de diferentes fatores abióticos e, geralmente são encontradas uma variedade de substâncias, entre elas: pineno, mirceno, cimeno, sabineno, limoneno, 1, 8-cineol (eucaliptol), mentona, mentofurano, isomentona, mentil acetato, neomentol, mentol,

ocimeno, terpineno, terpinoleno, fenchona, linalool, terpineol, aldeído cumínico, pulegone, trans-piperitol, neral, carvone, geranial, timol, carvacrol, eugenol, ocimenona, 6-OH-carvotonacetona, piperitenona, oxido de piperitenone, geranil acetato, cariofileno, calameneno, globelol, espatulenol, eudesmol, cubenol, e outros (DIMANDJA et al., 2000; SARTORATTO et al., 2004).

Essas plantas são usadas para fins medicinais desde a Antiguidade, como analgésico, estomacal, estimulante das funções cardíacas, gastrite, cólicas e gases (GRISI et al., 2006), possuem propriedade broncodilatadora, anti-helmíntica (LORENZI; MATOS, 2008; AHMAD et al., 2013), atividade antimicrobiana (IŞCAN, et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004), anti-inflamatória e antioxidante (SUN et al., 2014), sendo seus efeitos medicinais associados à presença de óleos essenciais, o que gera interesse econômico pela exploração comercial de seu óleo essencial, devido principalmente à presença de compostos terpênicos como o mentol, mentona e o limoneno (LORENZI; MATOS, 2008).

Estudos tem demonstrado a eficácia do extrato etanólico de *M. piperita* contra *Candida albicans* (IŞCAN et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004). Vidal et al. (2007) demonstraram atividade anti-giardia, *in vitro* e *in vivo*, de extrato e frações de *M. piperita*. O óleo essencial extraído das folhas de *M. piperita* é muito utilizado para produtos farmacêuticos, perfumes, e para alimentos (MCKAY; BLUMBERG, 2006), sendo uma das ervas mais utilizadas popularmente para chás.

2.8.4 *Psidium guajava* L

A goiabeira (*Psidium guajava*) pertence à família Myrtaceae e, é considerada nativa da América Tropical. Encontra-se distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e Austrália (LORENZI; MATOS, 2008; BISWAS et al., 2013). O Brasil é um dos maiores produtores de goiaba do mundo, juntamente com Índia, México, Egito e Venezuela. No Brasil sua produção concentra-se principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste (MANTOVANI et al., 2004).

A espécie *P. guajava*, é um arbusto de pequeno porte, que atinge menos de 10 m de altura, apresenta caule tortuoso, recoberto por casca fina muito aderente e seus

ramos direcionam-se paralelamente ou perpendicularmente ao solo. As folhas são opostas, pecioladas, glabras, aromáticas e de textura coriácea e o fruto é globoso ou piriforme, amarelado, de 3 a 6 cm de diâmetro (Figura 7) (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 7. Folhas e fruto de *Psidium guajava*.



Fonte: Autora

Estudos demonstram que as folhas de *P. guajava* são constituídas de óleo essencial rico em cineol, taninos, triterpenóides, flavonóides, resina, ácido málico, clorofila, sais minerais e uma série de outras substâncias fixas que podem apresentar componentes bioativos (NCUBE et al., 2008; BISWAS et al., 2013). Alguns estudos relatam que além do óleo essencial, as folhas de *P. guajava* apresentam compostos como aminoácidos, triterpenóides (ácido oleânico, ácido ursólico, ácido catecólico, ácido maslínico, ácido elágico), esteróides, compostos fenólicos, saponinas, carotenóides, ácidos voláteis, ácidos graxos, cumarinas, taninos, flavonoides, 1,8-cineole β -sitosterol e lectinas (GONÇALVES et al., 2008; KHADHRI, et al., 2014).

Esta espécie é reconhecida popularmente como de uso medicinal, sendo utilizada contra cólicas e diarreias, prática herdada originariamente da medicina asteca no México (LOZOYA et al., 2002). Extratos e metabólitos desta planta, particularmente os obtidos de folhas e frutos possuem atividades biológicas relevantes, tais como antimicrobiana (HOLETZ et al., 2002; RIBEIRO et al., 2009;

CHOUDHURY et al., 2012), antioxidante (GUTIÉRREZ et al., 2008), ação diurética (ALMEIDA et al., 1995), no tratamento de *diabetes mellitus* (GUTIÉRREZ et al., 2008), dentre outras.

Com base no exposto, esta espécie vegetal foi selecionada para o presente estudo, devido suas importantes atividades biológicas e farmacológicas, além de estar incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), um programa do governo brasileiro implementado no ano de 2008, cuja a finalidade é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença. Portanto, este estudo pretende confirmar a potencialidade desta planta como uso medicinal, justificando a importância da investigação da sua viabilidade tecnológica.

2.9 Citotoxicidade *in vitro*

A realização da avaliação citotóxica é muito importante na pesquisa de substâncias com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Testes *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto causar morte celular como consequência de danos às funções básicas celulares (EISENBRAND et al., 2002).

Os efeitos tóxicos nem sempre resultam imediatamente em morte celular, sendo que as células podem apenas sofrer alterações metabólicas ou alterações no ciclo celular sem nenhuma diminuição da viabilidade celular aparente. Muitos métodos de análise podem ser usados para medir o nível de citotoxicidade celular. Um dos procedimentos largamente utilizados é o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um corante amarelo, que é reduzido pela célula que mantém a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. Somente células viáveis reduzem MTT para formazan e, portanto, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes. Esta análise tem sido usada com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade (KIM et al., 2009).

Outro corante também utilizado é o Alamar Blue, conhecido como resazurina, é um indicador colorimétrico de óxido-redução, o qual em presença de células em proliferação reduz-se. Quando apresenta-se na sua forma oxidada sua coloração é azul (não fluorescente/célula não é viável) e quando na forma reduzida sua coloração é rósea (célula viável/fluorescente) assim, sua redução indica proliferação celular que é indício de que as células estão consumindo oxigênio para seu metabolismo. Trata-se de um teste eficiente, simples, sensível, rápido, seguro, não tóxico para as células e não necessita provocar morte celular para a obtenção dos resultados. Pode ser utilizado para avaliação da citotoxicidade, determinação da função mitocondrial e proliferação e viabilidade celular (O'BRIEN et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a bioprospecção de espécies vegetais nativas e exóticas do estado do Maranhão com potencial antibacteriano e anti-inflamatório para as principais bactérias associadas a infecções do trato respiratório.

3.2 Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Bixa orellana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Mentha piperita* e *Psidium guajava* sobre as principais bactérias envolvidas em infecções respiratórias;
- Analisar a ação dos extratos brutos hidroalcoólicos em modelos de biofilmes bacterianos;
- Realizar a triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos hidroalcoólicos;
- Identificar os constituintes químicos dos extratos hidroalcoólicos mais ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos em macrófagos peritoneais de camundongos suíços;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos hidroalcoólicos mais promissores em macrófagos peritoneais de camundongos suíços estimulados por lipopolissacarídeo (LPS).

4. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a crescente resistência dos patógenos aos antimicrobianos e o aumento da população de pacientes imunocomprometidos tem estimulado a busca de compostos terapêuticos alternativos, principalmente a partir da bioprospecção de diversas espécies vegetais.

A resistência aos antimicrobianos é um problema grave e requer não somente o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas, mas também a pesquisa para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, possibilitando a identificação de novos alvos terapêuticos e, mais tarde, para o desenvolvimento de drogas mais seletivas e eficazes contra várias doenças, inclusive as infecções do trato respiratório.

O Brasil é um dos países detentores da maior diversidade vegetal do mundo, no entanto, ainda é carente de pesquisas, principalmente sobre conhecimento botânico e uso sustentável. Tal situação tende a perpetuar a dependência externa do país, onde cerca de 80% dos fármacos são importados, com 75% da produção brasileira de fármacos estando nas mãos de empresas multinacionais (BRASIL, 2013).

Tendo em vista que as plantas de uso medicinal produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatória, espera-se que novas investigações científicas possam revelar compostos para o desenvolvimento de novos fármacos, que tenham menos efeito adverso e que tais compostos atinjam nas células bacterianas, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos e sejam ativos contra patógenos resistentes.

Diante do exposto, justifica-se a importância da realização de estudos que buscam novas abordagens terapêuticas a partir do enorme potencial vegetal do nosso país, em especial da região Amazônica, impulsionando a estruturação de cadeias produtivas e a expansão de centros de pesquisas biotecnológica direcionados para atividade de bioprospecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, J; TANVEER, S; ZARGAR, BA. In vitro anthelmintic activity of *Mentha longifolia* (L.) leaves against *Ascaridia galli*. **Global Veterinaria**, v. 11, n. 1, p. 112-117, 2013.

ALBUQUERQUE, AMV. **Estudo dos problemas respiratórios em crianças de 0 a 12 anos no Hospital Municipal Materno Infantil do município de Cacoal – RO dos anos de 2002 a 2004**. 52 p. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília, 2006.

ALBUQUERQUE, UP. Quantitative ethnobotany or quantification in ethnobotany? **Ethonobotany Research and applications**, v. 7, n. 1, p. 1-3, 2009.

ALMEIDA, CE; KARNIKOWSKI, MGO; FOLETO, R; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 428-433, 1995.

BAGATINI, MD; SILVA, ACF; TEDESCO, SB. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3 p. 444-447, 2007.

BAQUERO, F; BARRETT, JF; COURVALIN, P; MORRISSEY, I; PIDDOCK, L; NOVICK, WJ. Epidemiology and mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 4, (Suppl. 2), p. 19-26, 1998.

BARCHITA, M; CIPRESSO, R; GIAQUINTA, L; ROMEO, MA; DENARO, C; PENNISI, C; AGODI, A. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, n. 3, p. 330-337, 2009.

BELLOS, A; MULHOLLAND, K; O'BRIEN, KO; QAZI, SA; GAYER, M; CHECCHI, F. The burden of acute respiratory infections in crisis-affected populations: a systematic review. **Conflict and Health**, v. 4, n. 3, 2010.

BENNETT, JE; DOLIN, R; BLASER, MJ. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. Elsevier Saunders, Philadelphia, 8th edition, 2014.

BENGUIGUI, Y. Acute respiratory infections control in the context of the IMCI strategy in the Americas. **Revista Brasileira Saúde Materno Infantil**, v.3, n.1, p. 25-36, 2003.

BEZERRA, JL; COSTA, GC; LOPES, TC; CARVALHO, ICDS; PATRÍCIO, FJ; SOUSA, SM; AMARAL, FMM; REBELO, JMM; GUERRA, RNM; RIBEIRO, MNS; NASCIMENTO, FRF. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2006.

BISWAS, B; ROGERS, K; MCLAUGHLIN, F; DANIELS, D; YADAV, A. Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two Gram-Negative and Gram-Positive bacteria. **International Journal of Microbiology**, 2013.

BOGDAN, C., RÖLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 17-26, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2010. Nota técnica N° 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por micro-organismos multirresistentes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/servicosdesaude>. Acessado em 20 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 14, de 31 de março de 2010. (2010b). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0014_31_03_2010.html>. Acessado em 16 maio 2014.

BRICKS, LF. Vacinas acelulares pertussis para adolescentes e adultos: revisão. **Pediatria**, v. 29, n. 3, p. 208-215, 2007.

BRITO, MVH; CARVALHO, DS; ALBUQUERQUE, AMM. Efeito do extrato de mastruz em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, p. 1-5, 2007.

CAI, XY; WANG, Q; LIN, GY; CAI, ZW; LIN, CX; CHEN, PZ; ZHOU, XH; XIE, JC; LU, XD. Respiratory virus infections among children in South China. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 7, p. 1249-1255, 2014.

CARAPETIS, JR; STEER, AC; MULHOLLAND, EK; WEBER, M. The global burden of group A streptococcal diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 685-94, 2005.

CASTELLO, MC; PHATAK, A; CHANDRA, N; SHARON, M. Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa orellana* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, n. 12, p. 1378-1381, 2002.

CATÃO, RMR; BARBOSA-FILHO, JF; LIMA, EOL; PEREIRA, MSVP; SILVA, MAR; ARRUDA, TA; ANTUNES, RMP. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CAVALLI, J-F; TOMI, F; BERNADINI, A-F; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical analysis**, v. 15, p. 275-279, 2004.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Immunization Program. **Guidelines for the control of pertussis outbreaks**. Atlanta, 2000. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pertussis-guide>>. Acesso em: 20 set. 2012.

CHAIGNON, P; SADOVSKAYA, I; RAGUNAH, CH; RAMASUBBU, N; KAPLAN, JB; JABBOURI, S. Susceptibility of Staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiol. And Cell Physiology**, v. 75, n. 1, p. 125-132, 2007.

CHANG, H; SHEN, X; HUANG, G; FU, Z; ZHENG, Y; WANG, L; LI, C; LIU, L; SHEN, Y; LIU, X; YANG, Y. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from chinese children with pharyngitis. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 69, n. 2, p. 117-122, 2011.

CHAWLA, K; VISHWANATH, S; MUNIM, FC. Nonfermenting Gram-Negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. causing respiratory tract infections in a tertiary care center. **Journal of Global Infectious Disease**, v. 5, n. 4, p. 144-148, 2013.

CHEN, KY; KO, SC; HSUEH, PR; LUH, KT; YANG, PC. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. **Chest**, v. 120, n. 1, p. 177-184, 2001.

CHOUDHURY, S; SHARAN, L; SINHA, MP. Phytochemical and Antimicrobial Screening of *Psidium Guajava* L. Leaf Extracts against Clinically Important Gastrointestinal Pathogens. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 2, n. 4, p. 524-529, 2012.

CHROMA, M; KOLAR, M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum β -lactamases. **Biomedical Papers of Medical Faculty University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 154, n. 4, p. 289-296, 2010.

CHUNG, JY; HAN, TH; KIM, SW; KIM, CK; HWANG, ES. Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 8, p. 1238-1243, 2007.

CROW, M.C. Structure and function of macrophages and other antigen-presenting cells. In: KOOPMAN, W.J., MORELAND, L.W. **Arthritis and allied conditions**. 15.th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 14, p. 305-14, 2005.

COSTERTON, JW. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 217-221, 1999.

COUTINHO, DF; TRAVASSOS, LMA; AMARAL, FMM. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no Estado do Maranhão-Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 3, p. 7-12, 2002.

COUTINHO, MAS; MUZITANO, MF; COSTA, SS. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CUNHA, BA. Antibiotic side effects. **The Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 1, p. 149-185, 2001.

DAROUCHE, R. Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1567-1572, 2001.

DATASUS, Brasil: Ministério da Saúde Indicadores e Dados Básicos Brasil 2012. [acesso em: 30 mai. 2013]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotics resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, n.3, 2010.

DIMANDJA, J-MD; STANFILL, SB; GRAINGER, J; PATTERSON JR, DG. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) to the qualitative analysis of essential oil. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 3, p. 208-214, 2000.

DONLAN, RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n.8, p. 1387-1392, 2001.

DONLAN, RM. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881– 890, 2002.

DORMAN, HJD; KOSAR, M; KAHLOS, K; HOLM, Y; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

DRUMMOND, GM; MARTINS, CS; GRECO, MB; VIEIRA, F. Biota Minas: diagnóstico de conhecimento sobre a biodiversidade no estado de Minas Gerais – Subsídio ao Programa BIOTA MINAS. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009.

EISENBRAND, G; POOL-ZOBEL; B; BAKER, V; BALLS, M; BLAAUBOER, BJ; BOOBIS, A; CARERE, A; KEVEKORDES, S; LHUGUENOT, JC; PIETERS, R; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

FAHEY, JW; ZALCMANN, AT; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 5-51, 2001.

FERREIRA, H; LALA, ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: an alert to the professionals of health. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.

FOURNIER, PE; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 692-699, 2006.

FRANCISCO, KSF. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n.1, 2010.

GAUTAM, R; JACHAK, SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p.767-820, 2009.

GERTSCH, J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. **Planta Medica**, v. 74, n. 6, p. 638-650, 2008.

GIULIETTI, AM; HARLEY, RM; QUEIROZ, LP; WANDERLEY, MGL; BERG, CVD. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.

GÓMEZ, C; PÉREZ, L; SÁNCHEZ, GM. Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: a potential natural food preservative. **Interciência**, v. 37, n. 7, 2012.

GONÇALVES, FA; ANDRADE NETO, M; BEZERRA, JNS; MACRAE, A; SOUSA, OV; FONTELES-FILHO, AA; VIEIRA, RH. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp. *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 11-15, 2008.

GORDON, RJ; LOWY, FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, n. S5, p.S350-S359, 2008.

GRASSI, T; MANCINI, F; CIERVO, A; VESCIO, MF; GHAZAL, A; ASHOUR, H; SALEH, E; EL ZALABANI, M; DONATELLI, I; EL SAWAF, G; REZZA, G. *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and influenza in children with respiratory infections in Alexandria, Egypt. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 3, p. 379-383, 2014.

GRISI MCM; SILVA DB; ALVES RBN; GRACINDO, LAMB; VIEIRA, RF. Avaliação de genótipos de Menta (*Mentha* sp) nas condições do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 33-39, 2006.

GROSS, R; KEIDEL, K; SCHMITT, K. Resemblance and divergence: the “new” members of the genres Bordetella. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 199, n. 3, p. 155-163, 2010.

GRUNDMANN, H; AANENSEN, DM; VAN DEN WIJNGAARD, CC; SPRATT, BG; HARMSSEN, D; FRIEDRICH, AW; The European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. **Plos Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2010.

GUERRA, JC. Quimioprofilaxis en coqueluche: sacar agua a canastros? **Revista Chilena de Infectología**, v. 23, n.1, p. 60-68, 2006.

GUERRA, JA; MOLINA, MF; ABAD, MJ; VILLAR, AM; BERMEJO, P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from *Tanacetum microphyllum*. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1723–1728, 2006.

GUISO, N. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 49, n. 10, p. 1565-1569, 2009.

GUTIÉRREZ, RMP; MITCHELL, S; SOLIS, RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 117, p. 1-27, 2008.

HALL-STOODLEY, L; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 228-233, 2002.

HOLETZ, FB; PESSINI, GL; SANCHES, NR; CORTEZ, DA; NAKAMURA, CV; FILHO, BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027–1031, 2002.

HOLLAND, S.M.; VIZI, E.S. Immunomodulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p.425- 427, 2002.

IROBI, ON; MOO YOUNG, M; ANDERSON, WA. Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. **International Journal of Pharmacognosy.**, v. 34, n. 2, p. 87-90, 1996.

İŞCAN, G; KİRİMER, N; KÜRKÇÜOĞLU, M; BAŞER, K.H; DEMİRCİ, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3943–3946, 2002.

JACOBS, M. Worldwide trends in antimicrobial resistance among common respiratory tract pathogens in children. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 22, n. 8, p. S109- S119, 2003.

JAKO, C; COUTU, C; ROEWER, I. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v. 163, p. 141-145, 2002.

JARDIM, CM; JHAM, GN; DHINGRA, OD; FREIRE, MM. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1213-1218, 2008.

JAUNEIKATE, E; TOCHEVA, AS; JEFFERIES, JM; GLADSTONE, RA; FAUST, SN; CHRISTODOULIDES, M; HIBBETD, ML; CLARKE, SC. Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal Microbiological Methods**, v. 113, p. 41-49, 2015.

KARR, CJ; RUDRA, CB; MILLER, KA; GOULD, TR; LARSON, T; SATHYANARAYANA, S; KOENIG, JQ. Infant exposure to fine particulate matter and traffic and risk of hospitalization for RSV bronchiolitis in a region with lower ambient air pollution. **Environmental Research**, v. 109, n. 3, p. 321–327, 2009.

KELLOGG, JA; BANKERT, DA; ELDER, CJ; GIBBS, JL; SMITH, MC. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3373-3375, 2001.

KHADHRI, A; MONKNI, RE; ALMEIDA, C; NOGUEIRA, JMF; ARAÚJO, MEM. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014

KINGSTON, DGI. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529, 2003.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z; NEDIALKOV, PT; NIKOLOV, SD. The genus chenopodium: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. **Pharmacognosy Review**, v. 3, n. 6, p. 280-306, 2009.

KONEMAN, EW; ALLEN, SD; DOWEL JR., VR et al. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro, 2012.

LANDMAN, D; BRATU, S; KOCHAR, S; PANWAR, M; TREHAN, M. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 78-82, 2007.

LE ROUX, DM; MYER, L; NICOL, MP; ZAR, HJ. Incidence and severity of childhood pneumonia in the first year of life in a South African birth cohort: the Drakenstein Child Health Study. **Lacent Glob Health**, 2015.

LI, P; METLAY, JP; MARCUS, SC; DOSHI, JA. Factors associated with antimicrobial drug use in Medicaid Programs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, 2014.

LÓPEZ, R. Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. **International Microbiology**, v. 9, p. 179-190, 2006.

LORENZI, H; MATOS, FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 576p., 2008.

LOZOYA, X; REYES-MORALES, H; CHÁVEZ-SOTO, MA; MARTÍNEZ-GARCÍA, MC; SOTO-GONZÁLEZ, Y; DOUBOVA, SV. Intestinal antispasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 19-24, 2002.

LUTSAR, I; ANCA, I; BAKIR, M; USONIS, V; PRYMULA, R; SALMAN, N; GREZESIOWSKI, P. Epidemiological characteristics of pertussis in Estonia, Lithuania, Romania, the Czel Republic, Poland and Turkey-1945 to 2005. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, n. 4, p. 407-415, 2009.

MACEDO, SEC; MENEZES, AMB; POST, P; ALBERNAZ, E; KNORST, M. Respiratory syncytial virus infection in children with less than one year of age hospitalized for acute respiratory diseases in Pelotas, RS. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, v. 29, n. 1, p. 4-9, 2003.

MACFARLANE, J; HOLMES, W. Influence of patient's expectations on antibiotic management of acute lower respiratory tract illness in general practice: questionnaire study. **BMJ**, v. 315, p. 211-214, 1997.

MAH, TC; O'TOOLE, GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MALAR, RJJ; JOHNSON, M; UTHITH, M; ARTHY, A. Antibacterial activity of ethanolic extracts of selected medicinal plants against human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S76-S78, 2011

MANTOVANI, JR; CORREA, MCM; CRUZ, MCP; FERREIRA, ME; NATALE, W. Uso fertilizante de resíduo da indústria processadora de goiabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 339-342, 2004.

MARTINS, AF; BARTH, AL. Multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p. 56, 62, 2013.

MATA, PTG; ABEGG, MA. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi.**, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2007.

McKAY, DL; BLUMBERG, JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 8, p. 619-633, 2006.

MELLMANN, A; BIMET, F; BIZET, C; BOROVSKAYA, AD; DRAKE, RR; EIGNER, U; FAHR, AM; HE, Y; LLINA, EN; KOSTRZEWA, M; MAIER, T; MANCINELLI, L; MOUSSAOUI, W; PRÉVOST, G; PUTIGNANI, L;

SEACHORD, CL; TANG, YW; HARMSSEN, D. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3732–3734, 2009.

MELLO, AFS; MACHADO, ACZ; INOMOTO, MM. Potencial de controle da Erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 513-516, 2006.

MENDES, C; SINTO, SI; HSLUNG, A; OPLUSTIL, C; TEIXEIRA, L; SEGURA, A; SOUZA, D; BARTH, A; NICODEMO, AC. Atividade antimicrobiana *in vitro* de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, p. 191-197, 2002.

MONTO, AS. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 1, p. 58-64, 2004.

MONZOTE, L; PASTOR, J; SCULL, R; GILLE, L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1048-1052, 2014.

MONZOTE, L; STAMBERG, W; STANIEK, K; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 240, n. 3, p. 337-347, 2009.

MURRAY, EL; KLEIN, M; BRONDI, L; McGOWAN, JEJr; VAN MELS, C; BROOKS, WA; KLEINBAUM, D; GOSWAMI, D; RYAN, PB; BRIDGES, CB. Rainfall, household crowding, and acute respiratory infections in the tropics. **Epidemiology and Infection**, v. 4, p. 1-9, 2011.

NAIR, GB; NIEDERMAN, MS. Nosocomial pneumonia: lessons learned. **Crit. Care Clin.**, v. 29, n. 3, p. 521-546, 2013.

NAIR, H; NOKES, DJ; GESSNER, BD et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 375, n. 9725, p.1545-55, 2010.

NCUBE, NS; AFOLAYAN, AJ; OKOH, AI. “Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends,” **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008.

NEIVA, VA; RIBEIRO, MNS; CARTÁGENES, MSS; MORAES-COUTINHO, DF; NASCIMENTO, FRF; REIS, AS; AMARAL, FMM. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos

na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista Ciência da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2011.

NOHYNEK, H; MADHI, S; GRIJALVA, CG. Childhood bacterial respiratory diseases: past, present, and future. The **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28 (10 Suppl), p. S127-132, 2009.

O'BRIEN, J; WILSON, I; ORTON, T; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

O'BRIEN, KL; WOLFSON, LJ; WATT, JP; HENKLE, E; DELORIA-KNOLL, M; McCALL, N; LEE, E; MULHOLLAND, K; LEVINE, OS; CHERIAN, T; HIB and PNEUMOCOCCAL GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY TEAM et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 113, p. 893-902, 2009.

OLIVEIRA, JF; SÁ, JPO; CRUZ, MEM. Influenza A and B identification and monitoring in the population of Maceió. **Ciência Saúde Coletiva**., v.9, n.1, p.241-246, 2004.

PATERSON, DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S20-S28, 2006.

PELEG, AY; SEIFERT, H; PATERSON, DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PEREIRA, AS; CARMO FILHO, JR; TOGNIM, MCB; SADER, HS. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostra de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 301-308, 2003.

PITA, JR; PEREIRA, AL. The reception of Penicillin in Portugal (1945-1950). Coimbra: Universidade de Coimbra, 2009.

PRIETSCH, SO; FISCHER, GB; CÉSAR, JÁ; LEMPEK, BS; BARBOSA, LVJr; ZOGBI, L; CARDOSO, OC; SANTOS, AM. Acute lower respiratory illness in under-five children in Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil: prevalence and risk factors. **Caderno de Saúde Pública**., v. 24, n. 6, p. 1429-1438, 2008.

RAJATONIRINA, S; RAZANAJATOVO, NH; RATSIMA, EH. Outcome risk factors during respiratory infections in a paediatric ward in Antananarivo, Madagascar 2010-2012. **PLoS ONE**, 2013.

REIS, M; TRINCA, A; FERREIRA, MJ; MONSALVE-PUELLO, AR; GRÁCIO, MA. *Toxocara canis*: potential activity of natural products against second-stage larval in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**., v. 126, n. 2, p. 191-197, 2010.

RIBEIRO, CM; SOUZA, KG; RIBEIRO, TT; VIEIRA, ABR; MENDONÇA, LCV; BARBOSA, WLB; VIEIRA, JMS. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma**, v. 21, n.1/2, p. 45-49, 2009.

ROBINSON, MM; ZHANG, X. The world medicines situation 2011 traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: World Health Organization; 2011. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf html>. Acesso em 20 de maio de 2013.

ROJAS, JJ; OCHOA, VJ; OCAMPO, AS; MUÑOZ, JF. Screening for antimicrobial activity of tem medicinal plants used in Colombia folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicines**, 2006.

SANDER, H; GALES, AC. Treatment of severe infections in the era of high rates of antimicrobial resistance. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2008.

SANTOS, AL; SANTOS, DO; FREITAS, CC; FERREIRA, BLA; AFONSO, IF; RODRIGUES, CR; CASTRO, HC. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SARTORATTO, A; MACHADO, ALM; DELARMELINA, C; FIGUEIRA, GM; DUARTE, MCT; REHDER, VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SAUBOLLE, MA. Fungal pneumonias. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 15, p.162-177, 2000.

SCHMIDT, HH; WALTER, U. NO at work. **Cell.**, v. 78, n. 6, p. 919-925, 1994.

SELVARAJ, K; CHINNAKALI, P; MAJUMDAR, A; KRISHNAR, IS. Acute respiratory infections among under-5 children in India: A situational analysis. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2014.

SHAH, H; NISAR, M; SUHAIL, M; BACHA, N. Antimicrobial studies of the crude extracts from the roots of *Chenopodium ambrosioides* Linn. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 21, p. 2099-2104, 2014.

SHELDON Jr, AT. Antibiotic resistance: who is winning the war? Introductory remarks. **International Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 129-130, 2003.

SHETTY, S; BOSE, A; SRIDHARAN, S; SATYANARAYANA, A; RAHUL, A. A clinic-biochemical evaluation of the role of a herbal (ayurvedic) immunomodulator in chronic periodontal disease a pilot study. **OHDM**, v. 12, n. 2, p. 95-104, 2013.

SILVA, RB; ALMEIDA, CR; CHAVASCO, JM. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 171-174, 2010.

SIMOES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN,G; MELLO, JCP; MENTZ, LA; PETROVICK, PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFSC, 5ª edição, 2004.

SILVÁN, AM; ABAD, MJ; BERMEJO, P; SOLLHUBER, M; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 12, p. 1183-1185, 1996.

SMITH, KR; McCracken, JP; WEBER, MW; HUBBARD, A; JENNY, A; THOMPSON, LM; BALMES, J; DIAZ, A; ARANA, B; BRUCE, N. Effect of reduction in household air pollution on childhood pneumonia in Guatemala (RESPIRE): a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9804, p.1717–1726, 2011.

SOOBRAATTEE, MA; NEERGHEEN, VS; LUXIMON-ROMMA, A; ARUOMA, OI; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, CD; FELFILI, JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

STOODLEY, P; SAUER, K; DAVIES, DG; COSTERTON, JW. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUN, Z; WANG, H; WANG, J; ZHOU, L; YANG, P. Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grow in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.

TANEJA, J; MALIK, A; MALIK, A; RIZVI, M; AGARWAL, M. Acute lower respiratory tract infections in children. **Indian Pediatrics**, v. 46, p. 509-511, 2009.

TOLEDO, C; BRITTA, E; CEOLE, L; SILVA, E; MELLO, J; DIAS FILHO, B; NAKAMURA, C; NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 420-425, 2011.

TOLSTIKOVA, TG; SOROKINA, IV; TOLSTIKOV, GA; TOLSTIKOV, AG; FLEKHTER, OB. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. **Bioorganicheskaya Khimiya**, v. 32, n. 1, p. 42-55, 2006.

TRENTIN, DS; GIORDANI, RB; MACEDO, AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VASCONCELOS, MA; FERREIRA D Das; ANDRADE e SILVA, ML; VENEZIANI, RC; CUNHA, WR. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 142, n. 8, p. 333-335, 2003.

VICO, ESR; LAURENTIL, R. Mortality among children enrolled in public day care centers in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 1, p. 38-44, 2004.

VIDAL, F; VIDAL, JC; GADELHA, AP; LOPES, CS; COELHO, MG; MONTEIRO-LEAL, LH. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 25-31, 2007.

VIEIRA, FMJ; FIGUEIREDO, CR; SOARES, MC. Prevalência de *Streptococcus pyogenes* em orofaringe de crianças que frequentavam creches: estudo comparativo entre diferentes regiões do país. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v., 72, n. 5, p. 587-591, 2006.

WALKER, CLF; RUDAN, I; LIU, L; NAIR, H; THEODORATOU, E; BHUTTA, ZA; et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **The Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405-1415, 2013.

WALKER, MJ; BARNETT, TC; McARTHUR, JD; COLE, JN; GILLEN, CM; HENNINGHAM, A; SRIPRAKASH, KS; SANDERSON-SMITH, ML; NIZET, V. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group a streptococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 264-301, 2014.

WATANABE CH; NOSSE TM; GARCIA CA; GARCIA, CA; PINHEIRO POVH, N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 76-86, 2006.

WERTHEIM, HF; MELLES, DC; VOS, MC; VAN LEEUWEN, W; VAN BELKUM, A; VERBRUGH, HA; NOUWEN, JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 751-762, 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death. 2012. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> >. Acesso em 20 de dez. de 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pertussis vaccines: WHO position paper. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 80, n. 4, p. 29-40, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2008. Weekly epidemiological Record. 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine – WHO position paper. N°42: 373-384., 2008. Disponível em < <http://www.who.int/wer/html>>. Acesso em 20 de dez. de 2013.

XIE, DS; XIONG, W; LAI, RP; LIU, L; GAN, XM; WANG, XH; WANG, M; LOU, YX; FU, XY; WANG, HF; XIANG, H; XU, YH; NIE, SF. Ventilator-associated pneumonia in intensive care units in Hubei Province, China: a multicentre prospective cohort survey. **The Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 4, p. 284-288, 2011.

ZAR, HJ; FERKOL, TW. The global burden of respiratory disease-impact on child health. **Pediatric Pulmonology**, v. 49, n. 5, p. 430-434, 2014.

ZHAO, L; ZHANG, S-L; TAO, J-Y; PANG, R; JIN, F; GUO, Y-J; DONG, J-H; YE, P; ZHAO, H-Y; ZHENG, G-H. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R) hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 7, p. 1059–1064, 2008.

CAPÍTULO 1

Artigo enviado à revista *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*

Qualis B1 na área de Biotecnologia

Screening of plant extracts from the Northeastern Brazil for antimicrobial activity against bacterial pathogens of the respiratory tract

Abstract

Objective: To evaluate the antimicrobial activity of crude extracts obtained from four selected medicinal plants traditionally used to treat respiratory tract infections in Northeastern Brazil, against selected bacterial pathogens commonly associated with these infections. **Methods:** The antimicrobial activity of the hydroalcoholic extracts obtained from *Bixa orellana* L. (seeds), *Chenopodium ambrosioides* L. (leaves), *Mentha piperita* L. (leaves), and *Psidium guajava* L. (leaves) was studied *in vitro* using the agar diffusion method followed by determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs). Bacterial biofilm formation was also evaluated. **Results:** All extracts exhibited antimicrobial activity against one or more microorganisms. The lowest inhibitory concentrations were detected for *P. guajava* (0.5 mg/ml) extract when tested against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Of the four extracts tested, only the extracts obtained from *B. orellana* and *P. guajava* exhibited activity against biofilm-producing *P. aeruginosa* and *S. aureus*. **Conclusions:** Overall, this study demonstrates a broad potential antibacterial activity for *B. orellana*, *M. piperita*, and *P. guajava* hydroalcoholic extracts against clinically significant pathogens associated with respiratory tract infections. These results support the traditional use of these plants in the treatment of bacterial respiratory infections.

Keywords: Respiratory bacterial pathogens, plant extracts, antimicrobial activity, Agar diffusion; Minimum inhibitory concentration.

1. Background

Respiratory diseases are associated to high morbidity and mortality rates worldwide, especially in developing countries [1]. These diseases may be caused by various pathogens, with viruses being the most prevalent, either as a primary or as a predisposing pathogen to secondary bacterial infections [2]. However, bacterial infections of the respiratory tract represent the leading cause of mortality, with pneumonia alone being responsible for about two million deaths in children under five years old worldwide [3]. Of importance, 70% of these cases occur in developing countries [4]. The main bacteria involved in respiratory tract infections are *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* [5, 6].

Clinical presentation and severity of pneumonia is quite varied, depending on the identification of the etiologic agent, and age and immunological condition of the patient. Early treatment is essential for disease control strategy. If associated with bacteria, pneumonia is usually treated with antibiotics; however, antibiotic misuse has promoted the development of bacterial resistance [7].

The investigation of drugs derived from natural sources has played a significant role in the development of alternative strategies to treat and prevent human diseases. In this context, Brazil is a privileged country as it has a great biodiversity and thus, a genetic heritage of great potential for the development of new drugs. On the other hand, only 10% of the plant species grown in Brazil have been studied in regards of chemical content and their biological activities [8, 9].

Many plants found in biomes from the Northeastern region of Brazil are popularly used in the treatment of respiratory infectious diseases, including *Bixa*

orellana L., *Chenopodium ambrosioides* L., *Mentha piperita* L., and *Psidium guajava* L. [10-12]. To the best of our knowledge, there are no reports on the *in vitro* antimicrobial activity of extracts obtained from these plant species against major bacterial respiratory pathogens in the literature.

B. orellana belongs to the family Bixaceae and is native in the tropical regions of the Americas. It is popularly known as achiote and is the source of annatto, an orange condiment prepared by grinding the seeds to form a powder [13]. The leaves, roots, and seed extracts from *B. orellana* are used as aphrodisiacs and to treat several inflammatory conditions, sore throat, bronchitis, fever, and parasitic diseases [13-15].

C. ambrosioides belongs to the family Amaranthaceae and is popularly known as American wormseed and goosefoot. This plant has been used to treat respiratory, diuretic, and antihelminthic problems [10, 12, 14, 16] and exhibits anti-tumoral [17] and leishmanicidal activities [18]. Methanol extracts from its leaves have anti-inflammatory properties [19].

M. piperita belongs to the family Lamiaceae and is popularly known as peppermint [20]. It is native to Europe, but it has been cultivated in many parts of the world. This plant has been used as an analgesic and a cardiac function stimulant since antiquity. It exhibits bronchodilator, antihelminthic, antimicrobial, anti-inflammatory, and spasmolytic activities [21], as well as antioxidant, antitumor and antiviral properties [22]. It has also been used for treating bronchitis, bellyache, cough, anorexia, and ulcerative colitis (Di Stasi et al., 2002). Also, plant extracts from *Mentha* species have exhibited larvicidal effects against species of *Culex* and *Aedes* [23, 24].

P. guajava belongs to the family Myrtaceae and is popularly known as guava. It is found in tropical and subtropical regions worldwide, including Latin America,

Europe, Asia, and Africa [23, 24]. Several biological properties have been described for this species including antimicrobial activity against gastrointestinal pathogens [25, 26], in addition to spasmolytic [27] and antioxidant actions [28]. In Northeastern Brazil, the fruit and leaves of this plant are used to treat diarrhea, digestive problems, headache inflammation, and sore throat [12].

Thus, this study aimed to investigate whether these four plant species present with antimicrobial properties against pathogens commonly associated with respiratory infectious diseases and therefore, could be used as alternative and/or as adjuvant in their treatment.

2. Methods

2.1. Plant material collection. The leaves of *Chenopodium ambrosioides*, *Mentha piperita*, and *Psidium guajava* and the seeds of *Bixa orellana* were all collected in the state of Maranhão, Northeastern region of Brazil, in 2013. *C. ambrosioides* and *M. piperita* were collected in September from the municipality of Santa Luzia, bearing coordinates with latitude and longitude 3°58' 10" S and 45°39'48.83" W. *B. orellana* were collected in April from the Herbarium "Professora Dra. Berta Lange de Morretes", which is located at the Federal University of Maranhão – UFMA, in the municipality of São Luís (2°33'15" S and 44°18'19" W). *P. guajava* was collected in August also in the municipality of São Luís. All plants were identified at the Herbarium Ático Seabra of UFMA and their specimens were deposited under the voucher numbers 00998, 01275, 00815, and 00528, respectively. The scientific names and the distribution of the species were checked at www.theplantlist.org.

2.2. *Preparation of crude extracts.* To obtain the extracts, the plant material was initially dried in an oven with forced circulation of air at an average temperature of 45°C, and grounded in an electric mill, followed by the extraction of the active ingredients. For extraction, samples were macerated using ethyl alcohol 70% (v/v) as a liquid extractor at a 1:10 ratio (m/v). This mixture was maintained in a capped glass flask at room temperature protected from light and was manually stirred daily for ten days. After this period, the resulting solutions were filtered using a vacuum pump, and concentrated in a rotary evaporator under low pressure [29].

2.3. *Bacterial strains.* The following reference bacteria were used to evaluate the antimicrobial activities of the four plant species: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Bordetella pertussis* (ISP 18323), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303) and *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were used to test antimicrobial activity of plant extracts on biofilm formation. All bacterial strains were acquired from the Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). Bacteria were grown in BHI agar (Brain Heart Infusion) for 24 hours at 37°C. Cultures were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH 7.2) to generate suspensions of approximately 1.5×10^8 colony-forming units [CFU]/mL, which corresponded to the tube No. 0.5 on the McFarland scale [30]. All culture media were from Difco-BBL and chemicals were from Sigma-Aldrich, except as otherwise indicated.

2.4. *Antimicrobial susceptibility assay by the agar diffusion test – well method.* An agar diffusion test was performed as previously described [30], with some

modifications. Initially, wells of approximately 6 mm wide were made in Petri dishes containing blood agar (Columbia agar with 5% sheep blood; for *Streptococcus*), Bordet-Gengou agar (for *B. pertussis*) or Mueller-Hinton agar (for all the other bacteria). The bacterial inoculum was then evenly spread on the agar using a swab. Aliquots of 50 μ L of the extracts (16 mg/mL) were added in to the wells, and the Petri dishes were incubated at 35°C for 24 hours under specific conditions for each microorganism. After the incubation period, the diameters of the inhibition zones surrounding the wells were measured. Ciprofloxacin (5 μ g) disks (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) were used as positive controls and 1% dimethylsulfoxide (DMSO; vehicle) was used as negative control. The assay was performed in triplicate.

2.5. Minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentration determinations. MIC was determined using the broth microdilution method [30]. Stock solutions of the hydroalcoholic extracts (320 mg/mL) of *B. orellana* (HAEB), *C. ambrosioides* (HAEC), *M. piperita* (HAEM), and *P. guajava* (HAEP) were prepared in PBS containing 1% DMSO. Then, twofold serial dilutions of the extracts were prepared with Mueller-Hinton broth in 96-well microplates. The extract concentrations ranged from 0.03 to 64 mg/mL. Vehicle-treated wells were used as negative controls. Additionally, 1 μ L of a standardized bacterial inoculum (10^5 CFU) was used to inoculate each microplate well. Ciprofloxacin (1000 to 0.4 μ g/mL) was used as positive control. The plates were incubated at 35°C for 24 hours under aerobic conditions. A 5% CO₂ atmosphere was used for *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Bordetella pertussis* was kept in a humid chamber. After the incubation period, 30 μ L of 0.03% (p/v) sodium resazurin was added to the wells. The microplate was incubated again for 30 minutes so that changes in color could be

visualized. MIC was defined as the lowest concentration able to inhibit bacterial growth, i.e., the concentration at which no change in color from blue to pink was observed. Resazurin is a colorimetric redox indicator; blue indicates an absence of bacterial growth, and pink indicates the presence of bacterial growth [31]. All tests were performed in triplicate.

MBC was evaluated soon after determining the MIC. To determine MBC, 100 μ L of culture medium were removed from each well with no visible growth and transferred to blood agar dishes (for *Streptococcus*), Bordet-Gengou agar (for *Bordetella pertussis*) or Mueller-Hinton agar (for all the other bacteria). Culture plates were incubated at 35°C for 24 hours under specific conditions for each microorganism. MBC was the lowest concentration that either totally prevented growth or resulted in a $\geq 99.9\%$ decrease in the initial inoculum (i.e., a 3-log₁₀ reduction in CFU/mL) on subculture. Bacteriostatic action was defined as a ratio of MBC to MIC of > 4 . Otherwise, a lower MBC to MIC ratio was defined as bactericidal action [32]. The tests were performed in triplicate.

2.6. Effects on bacterial biofilm formation. The effects of different concentrations of the tested hydroalcoholic extracts on *P. aeruginosa* (ATCC 9027)- and (*S. aureus* ATCC 6538)-induced biofilm formation were tested on polystyrene flat-bottomed microtiter plates as previously described [33, 34]. Bacterial strains were cultured on Mueller-Hinton agar at 35°C for 24 hours and suspensions were then adjusted to $\sim 10^8$ CFU/mL. Aliquots of 20 μ L/well of bacterial suspensions were seeded in 180 μ L/well of tryptic soy broth (TSB) supplemented with 1% glucose, and then incubated at 35°C for 24 hours. Following incubation, for removal of non-adherent bacteria, the medium was removed and the wells were washed with PBS (2 x). Aliquots of 200 μ L of Mueller-Hinton broth with different extract concentrations (4.0-64 mg/mL) were

added to each well and incubated at 35°C for 24 hours containing *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilms. After incubation, each well was washed twice with PBS and then stained with 0.5% crystal violet for 15 min. The stain was eluted with 150 µL of 95% ethanol per well at room temperature for at least 30 min without shaking. Optical density was measured at 570 nm using a microtiter-plate reader (Multiskan – Labsystems). Mean OD values and standard deviations (SDs) were calculated for both strains and controls and taken as indicative of biofilm formation.

For comparison, bacteria strains were incubated with either vehicle (1% DMSO in TSB; negative control) or ciprofloxacin (0.8-100 µg/mL; positive control).

2.7. Phytochemical screening. A phytochemical analysis was performed in order to investigate the presence of different classes of secondary metabolites in each extract, including alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, tannins, steroids and triterpenes [35].

2.8. Statistical analysis. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments performed in triplicate. The percentage of inhibition is reported as the mean $\pm$ SD for each individual experiment. Statistical comparison was performed by one-way analysis of variance followed by the Newman-Keuls test using GraphPad Prism 5.0. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Susceptibility assays in planktonic culture. Results from the agar diffusion method showed that the diameters of the zones of inhibition ranged from 8 to 16 mm, and that the largest diameters were observed for HAEB (16 mm), HAEC (14 mm), and HAEP (14mm) when tested against *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *B. pertussis*, and

P. aeruginosa, respectively. The smallest diameters were observed for the HAEM when tested against *B. pertussis* and *S. pyogenes* (Table 1).

Susceptibility assay by the microdilution method demonstrated that HAEB, HAEM, and HAEP were the most effective in inhibiting growth irrespective of the bacteria. It was found that the most susceptible bacteria were *S. aureus* (Gram-positive), *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (Gram-negative). On the other hand, the highest MICs (64 mg/ml) were registered for the HAEC, and HAEM when tested against *S. aureus* and *B. pertussis*, respectively. Additionally, HAEP presented with the lowest MBC (1 mg/ml) when tested against *P. aeruginosa* and *S. aureus* (Table 2).

3.2. Reduction of biofilm formation. To investigate the antimicrobial effects of the hydroalcoholic extracts against the biofilm-producing strains, *P. aeruginosa* ATCC 9027 and *S. aureus* ATCC 6538, MIC values were determined. Only HAEB and HAEP exhibited inhibitory activities with MIC values of 8 mg/mL. HAEB (4-64 mg/ml) was able to significantly reduce the formation of biofilm by both strains. Inhibition was maximal at the concentrations of 64 mg/ml for *P. aeruginosa* (95% inhibition) and *S. aureus* (93% inhibition), respectively (Figure 1A). Lower, but still significant effects were observed for HAEP which reduced biofilm formation by *P. aeruginosa* in all tested concentrations with maximal inhibition reached at 64 mg/ml (35%) (Figure 1B). On the other hand, HAEP presented with inhibitory effects on *S. aureus* biofilm at concentrations ranging from 16-64 mg/ml. The maximal inhibition observed for this extract on *S. aureus* biofilm was of 31% (Figure 1B).

3.3. Phytochemical analysis. The phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids and phenol in all the studied extracts, and detected the presence of triterpenes in the HAEB and saponins in the HAEM and HAEP (Table 3).

4. Discussion

The present study demonstrated the antimicrobial properties of hydroalcoholic extracts of the *B. orellana* (HAEB), *C. ambrosioides* (HAEC), *M. piperita* (HAEM), and *P. guajava* (HAEP) popularly used in the treatment of respiratory infections in our country. Previous studies have shown that extracts and essential oils obtained from other plants present antimicrobial activities against respiratory pathogens such as *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis* and *Mycobacterium smegmatis* [36, 37]. Herein, we present novel and important evidence on the antimicrobial properties of HAEB, HAEC, HAEM, and HAEP.

Amongst the tested pathogens, *B. pertussis* and *S. pyogenes* have been associated with infections in the upper respiratory tract. The other microorganisms normally infect the lower respiratory tract and are usually considered opportunistic agents, including *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*. In addition, they can also affect other anatomical sites with varying severity [5].

Each extract showed activity for at least three of the seven bacterial strains tested. However, the extracts were more effective against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* when tested in the broth microdilution method. This discrepancy of results may be due to difficulties in diffusion of some compounds of plant extracts into the solid agar culture medium. Low diffusion or even no diffusion of natural products into solid medium might be related to low hydrosolubility and/or high molecular mass of some compounds [30, 38].

B. orellana is widely known worldwide for its dying properties, especially in the food industry where it has been marketed as a natural dye. It is widely used as a flavoring, and it can be additionally used for the treatment of burns, sore throat, and headache, among others. In our study, the HAEB was able to inhibit the growth of all tested microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria. A similar effect was previously described for *B. orellana*. Indeed, alcoholic extract of *B. orellana* seeds has shown a broad spectrum of antimicrobial activity, inhibiting growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, in addition to fungi [39].

HAEB presented with phenols, flavonoids and triterpenes, corroborating the literature data showing that the bioactive compounds derived from the secondary metabolism of this plant are phenolic (flavonoids, phenolic acids, tannins) and carotenoids (beta-carotene, lycopene, lutein, bixin) compounds [40].

HAEM also showed antibacterial activity for all strains studied. Some studies have previously reported that *M. piperita* leaf extract possesses antimicrobial activity against *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, and *Bacillus subtilis* [41, 42]. However, in most studies with *M. piperita*, its antimicrobial activity has been associated with its essential oils, suggesting that the major compounds, menthol and menthone, are responsible for this activity [43, 44]. Although essential oils are the major constituents of the leaves of *M. piperita*, other compounds such as polyphenols, rosmarinic acid, caffeic acid and apigenin have also been reported [45]. Here, we performed a phytochemical analysis of *M. piperita* leaf extract. Our results show that this extract presents phenols, flavonoids, and saponins. These differences in chemical composition may be due to different factors such as geography, seasonality, physiological age of the plant, and the method for obtaining the extracts [46]. Consequently, they may also reflect in different antibacterial activities of *M. piperita*

extracts. However, we suggest that the detected metabolites (phenols, flavonoids and saponins) are the responsible for the antibacterial activity of this plant, in our study.

HAEC was the least effective of the plant extracts studied, since it only inhibited three of the evaluated bacteria. This may be related to striking differences in bacterial surface composition that is interfering with compound transport into the bacteria, lack of a target in the bacterial cell or even decreased amount of certain inhibitory compounds in the plant extract. However, this plant species has shown other biological activities such as antihelminthic [47], leishmanicidal [18] and anti-inflammatory activities [19].

The HAEP was effective against all bacteria studied, with the smallest inhibitory concentrations (0.5 mg /ml for *P. aeruginosa* and *S. aureus*) when compared to other extracts. The antimicrobial activity of *P. guajava* leaf extracts has been reported for some enteric [26] and cariogenic pathogens [48]. In the phytochemical screening, phenols, steroids and saponins were detected. Some studies have shown that obtained from leaves and fruit extracts of this plant have other important biological activities such as antioxidant [49], diuretic [50], among others.

Interestingly, all extracts presented with phenolic compounds and/or flavonoids. It is possible thus, that the antimicrobial activity of the tested extracts is associated with these constituents. In fact, both phenolic compounds and flavonoids may display relative toxicity to microorganisms by inhibiting enzyme systems interfering with synthesis routes that are essential for bacterial survival [51] as well as may disrupt bacterial membranes [52, 53].

In addition to the observed antimicrobial activity on the bacterial strains in planktonic culture, two extracts (HAEB and HAEP) were able to reduce biofilm formation by both *P. aeruginosa* and *S. aureus*. It has been suggested that some

infections are associated with biofilm formation, including pulmonary infections caused by *P. aeruginosa* in patients with cystic fibrosis, which can result in therapeutic failure [54]. Indeed, bacteria in biofilms are more resistant to antimicrobial treatment than in planktonic culture [55]. The implication of our findings is that disruption of biofilm formation by may have a significant impact in infection dynamics.

Overall, HAEB, HAEM, and HAEP displayed bactericidal effects against all tested pathogens cultured in the planktonic state. Whilst HAEC was active only against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. It is important to highlight the importance of our findings regarding *B. pertussis* and *S. pneumoniae*. These pathogens have been associated with diseases of severe outcome. *B. pertussis* causes whooping cough, a reportable disease of worldwide distribution, highly transmissible and contagious, characterized by paroxysms [56]. Also, *S. pneumoniae* is one of the most important bacterial pathogens in the respiratory tract, being associated with otitis media, pneumonia, meningitis and sepsis, with high morbidity and mortality rates, particularly in children under five years of age and older [57]. To our knowledge, we present the first evidence on the antimicrobial activity of *B. orellana*, *M. piperita*, and *P. guajava* extracts against *B. pertussis* and *S. pneumoniae*.

5. Conclusions

Overall, our data demonstrated a broad potential bactericidal activity specially for *B. orellana*, *M. piperita*, and *P. guajava* hydroalcoholic extracts, against clinically relevant pathogens associated with respiratory tract infections.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding publication of this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) for grant award REBAX No.03628/13 and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and a scholarship grant.

References

- [1] WHO, "The top 10 causes of death," Geneva: World Health Organization: 2011.
- [2] A.S. Monto. "Occurrence of respiratory virus: time, place and person," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 23, no. 1 Suppl, pp. S58-64.
- [3] C.A. Hart and L.E. Cuevas. "Acute respiratory infections in children," *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, vol. 7, no. 1, pp. 23-29.
- [4] M. Cevey-Macherel, A. Galetto-Lacour, A. Gervaix, et al. "Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines," *European Journal of Pediatrics*, vol. 168, no. 12, pp. 1429-1436.
- [5] J.E. Bennett, R. Dolin, and M.J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier Saunders, Philadelphia, 8th edition, 2014.
- [6] D. Cappelletty. "Microbiology of bacterial respiratory infections," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 17, no. 8 Suppl, pp. S55-61.
- [7] J. Davies and D. Davies. "Origins and evolution of antibiotic resistance," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, no. 3, pp. 417-433.
- [8] A.M. Giuliatti, R.M. Harley, L.P. De Queiroz, M.D.L. Wanderley, and C. Van den Berg. "Biodiversity and conservation of plants in Brazil," *Conservation Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 632-639.
- [9] M.C. Pagano and M.R. Scotti. "Effect of phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of *Zeyheria tuberculosa* a native species in Brazil's forest," *Middle-East Journal of Scientific Research*, vol. 6, pp. 604-611.
- [10] A.R.M.S. Brito and A.A.S. Brito, "Medicinal plant research in Brazil: data from regional and national meetings," in *Medicinal resources of the Tropical Forest - biodiversity and its importance to human health*, M.J. Balick, E. Elisabetsky, and A.S. Laird Eds., pp. 386-401, New York: Columbia University Press: 1996.

- [11] S.L. Cartaxo, M.M. Souza, and U.P. de Albuquerque. "Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 131, no. 2, pp. 326-342.
- [12] U.P. de Albuquerque, P. Muniz de Medeiros, A.L. de Almeida, et al. "Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114, no. 3, pp. 325-354.
- [13] C. Ulbricht, R.C. Windsor, A. Brigham, et al. "An evidence-based systematic review of annatto (*Bixa orellana* L.) by the Natural Standard Research Collaboration," *Journal of Dietary Supplements*, vol. 9, no. 1, pp. 57-77.
- [14] L.C. Di Stasi, G.P. Oliveira, M.A. Carvalhaes, et al. "Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 1, pp. 69-91.
- [15] A. Giorgi, P. De Marinis, G. Granelli, L.M. Chiesa, and S. Panseri. "Secondary Metabolite Profile, Antioxidant Capacity, and Mosquito Repellent Activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon Region," *Journal of Chemistry*, vol. 2013.
- [16] R. Kumar, A.K. Mishra, N.K. Dubey, and Y.B. Tripathi. "Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, no. 2, pp. 159-164.
- [17] F.R. Nascimento, G.V. Cruz, P.V. Pereira, et al. "Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment," *Life Sciences*, vol. 78, no. 22, pp. 2650-2653.
- [18] F.J. Patricio, G.C. Costa, P.V. Pereira, et al. "Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 115, no. 2, pp. 313-319.
- [19] G.F. Ibrinke and K.I. Ajiboye. "Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats," *International Journal of Pharmacology*, vol. 3, no. 1, pp. 111-115.
- [20] H.J. Dorman, M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm, and R. Hiltunen. "Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 16, pp. 4563-4569.
- [21] M. Johnson, E.G. Wesely, M.S. Kavitha, and V. Uma. "Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L.," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 196-200.
- [22] D.L. McKay and J.B. Blumberg. "A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.)," *Phytotherapy Research*, vol. 20, no. 8, pp. 619-633.
- [23] A. Amer and H. Mehlhorn. "Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae)," *Parasitology Research*, vol. 99, no. 4, pp. 466-472.
- [24] A.F. Traboulsi, K. Taoubi, S. el-Haj, J.M. Bessiere, and S. Rammal. "Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae)," *Pest Management Science*, vol. 58, no. 5, pp. 491-495.
- [25] B. Biswas, K. Rogers, F. McLaughlin, D. Daniels, and A. Yadav. "Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two

- Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria," *International Journal of Microbiology*, vol. 2013, p. 746165.
- [26] S. Choudhury, L. Sharan, and M.P. Sinha. "Phytochemical and antimicrobial screening of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important gastrointestinal pathogens," *J Nat Prod Plant Resour*, vol. 2, no. 4, pp. 524-529.
- [27] L. Tona, K. Kambu, N. Ngimbi, et al. "Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo," *Phytomedicine*, vol. 7, no. 1, pp. 31-38.
- [28] A. Jiménez-Escrig, M. Rincón, R. Pulido, and F. Saura-Calixto. "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 5489-5493.
- [29] R.B. Silva, C.R. Almeida, J.M. Chavasco, and J.K. Chavasco. "Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae," *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 2, pp. 171-174.
- [30] C. Valgas, S.M. de Souza, E.F.A. Smania, and A. Smania. "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 38, no. 2, pp. 369-380.
- [31] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, and F. Portaels. "Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*," *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, vol. 46, no. 8, pp. 2720-2722.
- [32] G.A. Pankey and L.D. Sabath. "Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 38, no. 6, pp. 864-870.
- [33] S. Stepanovic, D. Vukovic, V. Hola, et al. "Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci," *APMIS*, vol. 115, no. 8, pp. 891-899.
- [34] A.L. Antunes, J.W. Bonfanti, L.R. Perez, et al. "High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 1, pp. 51-55.
- [35] F.J.A. Matos, *Introdução a fitoquímica experimental*, 3th edition, 2009.
- [36] M.C. Fomogne-Fodjo, S. Van Vuuren, D.T. Ndinteh, R.W. Krause, and D.K. Olivier. "Antibacterial activities of plants from Central Africa used traditionally by the Bakola pygmies for treating respiratory and tuberculosis-related symptoms," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 155, no. 1, pp. 123-131.
- [37] G. Rojas, J. Levaro, J. Tortoriello, and V. Navarro. "Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 74, no. 1, pp. 97-101.
- [38] J.L. Rios, M.C. Recio, and A. Villar. "Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 23, no. 2-3, pp. 127-149.
- [39] G.L. Ciro, J.E. Zapata, and J. López. "In vitro evaluation of *Bixa orellana* L. (annatto) seeds as potential natural food preservative," *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 8, pp. 772-779.
- [40] D.B. Rodriguez-Amaya. "Latin American food sources of carotenoids," *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 49, no. 3 Suppl 1, pp. 74S-84S.

- [41] R. Singh, M.A.M. Shushni, and A. Belkheir. "Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L.," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 322-328.
- [42] P. Sujana, T.M. Sridhar, P. Josthna, and C.V. Naidu. "Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint)—An Important Multipurpose Medicinal Plant," *Am J Plant Sci* vol. 4, no. 1, pp. 77-83.
- [43] T. Inoue, Y. Sugimoto, H. Masuda, and C. Kamei. "Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L.," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 25, no. 2, pp. 256-259.
- [44] G. Iscan, N. Kirimer, M. Kurkcuoglu, K.H. Baser, and F. Demirci. "Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 14, pp. 3943-3946.
- [45] W. Zheng and S.Y. Wang. "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 5165-5170.
- [46] J.A. Pino, P. Borges, M.A. Martinez, et al. "Essential oil of *Mentha piperita* L. grown in Jalisco," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 14, no. 3, pp. 189-190.
- [47] M. Reis, A. Trinca, M.J. Ferreira, A.R. Monsalve-Puello, and M.A. Gracio. "Toxocara canis: potential activity of natural products against second-stage larvae in vitro and in vivo," *Experimental Parasitology*, vol. 126, no. 2, pp. 191-197.
- [48] D.R. Vieira, F.M. Amaral, M.C. Maciel, F.R. Nascimento, S.A. Liberio, and V.P. Rodrigues. "Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 155, no. 3, pp. 1441-1449.
- [49] R.M. Gutierrez, S. Mitchell, and R.V. Solis. "Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 117, no. 1, pp. 1-27.
- [50] C.E. Almeida, M.G.O. Karnikowski, R. Foletto, and B. Baldisserotto. "Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine," *Revista de Saúde Publica*, vol. 29, no. 6, pp. 428-433.
- [51] H.P. Avila, F. Smania Ede, F.D. Monache, and A. Smania, Jr. "Structure-activity relationship of antibacterial chalcones," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 22, pp. 9790-9794.
- [52] J.M. Clements, F. Coignard, I. Johnson, et al. "Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC," *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, vol. 46, no. 6, pp. 1793-1799.
- [53] L.J. Nohynek, H.L. Alakomi, M.P. Kahkonen, et al. "Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens," *Nutrition and Cancer*, vol. 54, no. 1, pp. 18-32.
- [54] E. Drenkard and F.M. Ausubel. "Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation," *Nature*, vol. 416, no. 6882, pp. 740-743.
- [55] M.E. Davey and A. O'Toole G. "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 4, pp. 847-867.
- [56] CDC, "National Immunization Program. Guidelines for the control of pertussis outbreaks," U.S.D.o.H.a.H. Services Ed., Atlanta, Ga.: Centers for Disease Control and Prevention: 2000.

[57] A. Gentile, A. Bardach, A. Ciapponi, et al. "Epidemiology of community-acquired pneumonia in children of Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 16, no. 1, pp. e5-15.

Table 1: Bacterial inhibition zones formed upon exposure to hydroalcoholic extracts from *B. orellana* (HAEB), *C. ambrosioides* (HAEC), *M. piperita* (HAEM), and *P. guajava* (HAEP) at concentrations of 16 mg/ml.

Bacteria	Zone of inhibition* (mm)				
	HAEB	HAEC	HAEM	HAEP	Ciprofloxacin disk (5 µg)
<i>A. baumannii</i>	10 ± 1,5	-	10 ± 1,4	13 ± 1,4	26 ± 1
<i>B. pertussis</i>	9 ± 1	-	8 ± 0,6	14 ± 0,7	23 ± 0,6
<i>K. pneumoniae</i>	9 ± 0,6	14 ± 0,6	-	13 ± 0,6	36 ± 1
<i>P. aeruginosa</i>	13 ± 1	-	-	14 ± 1	35 ± 0,6
<i>S. aureus</i>	11 ± 0,6	-	12 ± 1,1	11 ± 0,6	39 ± 1
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	25 ± 0,6
<i>S. pyogenes</i>	16 ± 0,7	-	8 ± 0,6	12 ± 0,7	21 ± 0,6

*Values are mean ± SD of three parallel measurements; (-) no zone of inhibition.

Table 2: Minimum inhibitory and bactericidal concentration values (mg/ml) of the plant extracts against respiratory tract bacterial pathogens.

Extracts*	Bacterial species**													
	Ab		Bp		Kp		Pa		Sa		Sp		Spy	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
HAEB	16	16	16	32	8	16	8	8	8	16	4	8	2	8
HAEC	-	-	-	-	2	2	16	16	64	64	-	-	-	-
HAEM	16	16	64	64	2	4	16	16	4	4	32	32	16	32
HAEP	2	4	1	1	4	8	0,5	1	0,5	1	32	32	2	8

* hydroalcoholic extracts from *B. orellana* (HAEB), *C. ambrosioides* (HAEC), *M. piperita* (HAEM), and *P. guajava* (HAEP)

** Ab: *A. baumannii*; Bp: *B. pertussis*; Kp: *K. pneumoniae*; Pa: *P. aeruginosa*; Sa: *S. aureus*; Sp: *S. pneumoniae*; Spy: *S. pyogenes*

Table 3: Phytochemical composition of hydroalcoholic extracts from *B. orellana* (HAEB), *C. ambrosioides* (HAEC), *M. piperita* (HAEM), and *P. guajava* (HAEP).

Phytochemicals	Extracts			
	HAEB	HAEC	HAEM	HAEP
Alkaloids	-	-	-	-
Steroids	-	+	-	+
Phenols	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	-
Saponins	-	-	+	+
Tannins	-	-	-	-
Triterpenoids	+	-	-	-

Note: (+) presence; (-) absence

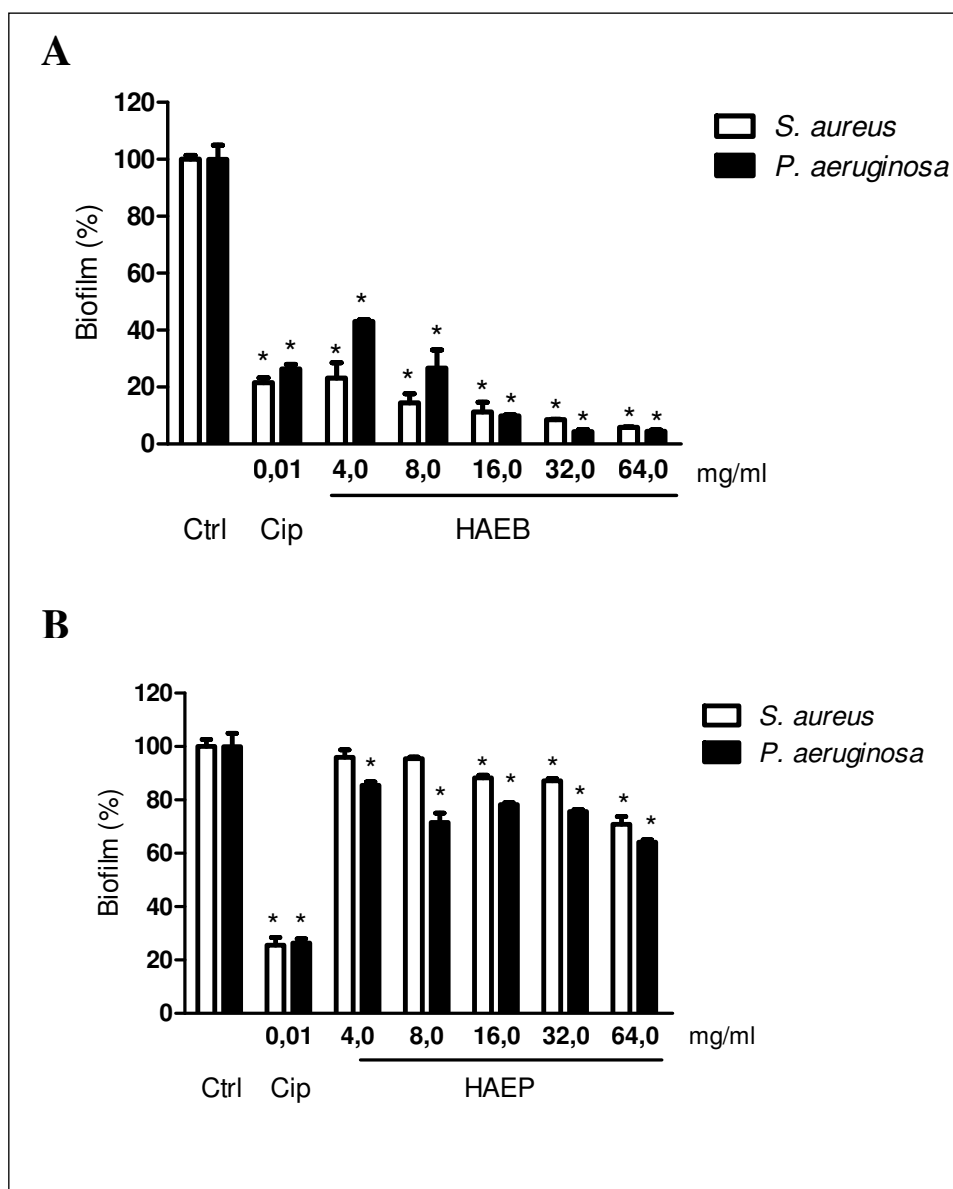


Figure 1. Inhibitory effect of hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* (A) and *Psidium guajava* (B) on biofilms formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser enviado à revista International Immunopharmacology

Qualis B1 na área de Biotecnologia

Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Mentha piperita* L. and *Psidium guajava* L. leaves in murine peritoneal macrophages

Abstract

The use of natural products in folk medicine is an ancient practice that persists to the present day. This practice has a broad scope, and it serves various purposes, particularly in human health. For centuries, the medicinal properties of different plant species were confirmed empirically, and this knowledge was transferred across generations, such that it became the basis of traditional medicine. Several traditionally used plant species have notable pharmacological properties, including anti-inflammatory activity. The objective of this study was to identify the main chemical constituents of the hydroalcoholic extracts of *Mentha piperita* L. (peppermint) and *Psidium guajava* L. (guava) and evaluate the cytotoxicity and anti-inflammatory activity of these extracts in murine peritoneal macrophages. Cell viability was assessed using the PrestoBlue assay, whereas anti-inflammatory activity was evaluated by measuring the levels of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) and the phagocytic activity. The chemical compounds were identified by high-performance liquid chromatography. The main chemical constituent of the *M. piperita* extract was epicatechin, whereas the constituents of the *P. guajava* extract were ursolic acid, caffeic acid, and quercetin. At all concentrations tested, the extracts caused a significant increase in cell viability and decreased the production of H₂O₂ and NO in cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS). These results demonstrate the potential anti-inflammatory activity of the extracts of *M. piperita* and *P. guajava*.

Keywords: anti-inflammatory activity, macrophages, *Mentha piperita*, Lamiaceae, *Psidium guajava*, Myrtaceae

Introduction

The development of infectious diseases involves complex interactions between the pathogen and the host. When foreign agents invade the body, circulating monocytes are recruited to the site of infection and differentiate into macrophages and dendritic cells [1].

Upon exposure to exogenous factors, macrophages are the first cells in the body to be activated for the immune response. During inflammation, macrophages perform three main functions—phagocytosis, antigen presentation, and immunomodulation—by producing several cytokines and growth factors. Activated macrophages have strong phagocytic activity and produce high concentrations of several mediators, including cytokines, reactive nitrogen species (RNS), and reactive oxygen species (ROS), which target foreign agents. RNS and ROS are highly toxic molecules and are produced in large quantities by activated macrophages during the immune response [2]. The production of RNS, particularly nitric oxide (NO), together with hydrogen peroxide (H₂O₂), mediates the death or the inhibition of the growth of tumor cells, bacteria, fungi, and parasites [3].

The increase in the immune response of the host has been recognized as an important strategy for protection against microbial infection. Studies on immunostimulatory activity have been conducted using plant species that have received attention worldwide as an alternative to traditional therapeutic methods [4]. In recent years, immunomodulation gained the attention of the scientific community searching for strategies to modulate the immune system and to prevent infections rather than treat them at advanced stages [5].

At present, the available anti-inflammatory drugs have many side effects and often have a high cost. Therefore, the discovery of novel drugs from natural products represents a promising alternative [6]. In the present study, we evaluated two plant species that are used in folk medicine against infections in Brazil: *Mentha piperita* and *Psidium guajava*.

M. piperita L., popularly known as peppermint, belongs to a genus native to the Mediterranean region, and it has spread worldwide because of its medicinal use, flavor, and aroma [7]. The widespread use of peppermint in traditional medicine prompted us to explore its potential biological activities because few studies have evaluated the cytotoxic and anti-inflammatory activities of *M. piperita* extract.

Psidium guajava L., commonly known as guava, has traditionally been used in folk medicine, and its leaves are used for a variety of human diseases, including diabetes mellitus, hypertension, obesity, cough, and diarrhea. The pharmacological properties of polyphenolic and other chemical compounds found in guava leaf extracts have included anti-inflammatory [8], antioxidant [9], and antimicrobial [10] activities.

Plant extracts have strong and broad effects on the host immune system by modulating various immune cells, including T cells, B cells, dendritic cells, and macrophages [11]. Among these cells, macrophages are considered the first line of defense against the invasion of the host by microbial pathogens [12]. Studies have shown that plant compounds exhibit anti-inflammatory activity [8, 13, 7]. Therefore, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of leaves of *Mentha piperita* and *Psidium guajava* in the immune system using murine peritoneal macrophages.

Results

Chemical characterization

The analysis of the chemical composition of HAEMP revealed seven peaks (Figure 1), and the major compounds were epicatechin (retention time of 14.503 min) and naringenin (retention time of 33.497 min) (Table 1). For HAEPG, an intense peak was observed at 13.708 min (Figure 14), corresponding to ursolic acid (Table 2). Four compounds were found in both extracts: ursolic acid, caffeic acid, quercetin, and naringenin.

Cell viability

In this study, we initially assessed the cytotoxic effect of HAEPG and HAEMP in murine peritoneal macrophages using the PrestoBlue assay. Macrophages were treated with different concentrations of each extract (1, 3, 30, 100, 300 and 1000 µg/ml), with or without LPS stimulation (Figure 3). Our results indicated that the viability of macrophages treated with the higher concentrations of HAEPG and HAEMP (100, 300, and 1000 µg/ml) without LPS stimulation decreased significantly compared with that of the untreated control cells. However, the viability of cells stimulated with LPS

increased at all extract concentrations, and this increase was significant at 1 µg/ml of HAEPG and 1, 3, and 30 µg/ml of HAEMP.

Measurement of NO_x and H₂O₂ and evaluation of the phagocytic profile

To evaluate the anti-inflammatory potential of HAEPG and HAEMP, we used an experimental inflammation model with macrophages, which release NO and H₂O₂ after LPS stimulation. The production of NO in macrophages with or without LPS stimulation in the presence of HAEPG and HAEMP is shown in Figure 4, whereas the production of H₂O₂ is shown in Figure 5.

The production of NO in macrophages not stimulated with LPS and treated with HAEPG significantly increased ($p < 0.05$) at all tested extract concentrations compared with that in the control macrophages (LPS⁻); however, the stimulation of these cells with LPS decreased the NO production in the presence of either HAEPG or HAEMP.

The production of H₂O₂ was significantly lower ($p < 0.05$) in macrophages stimulated with LPS and treated with HAEMP than in the control macrophages (LPS⁺) at all concentrations tested except for the highest concentration (1000 µg/ml). Similarly, the production of H₂O₂ in macrophages stimulated with LPS and treated with HAEPG decreased but non-significantly.

The phagocytic capacity of cells (percentage of cells containing beads) stimulated with LPS at 3 µg/ml was higher than that of the control (LPS⁺), whereas this capacity decreased in cells stimulated with LPS at 30 µg/ml compared with the control (LPS⁺) for both extracts (Figure 6). The bead/cell ratio in cells without 3 µg/ml LPS stimulation that were treated with HAEPG was significantly higher than in the control (LPS⁻), whereas this ratio increased non-significantly in cells stimulated with LPS at 3 µg/ml and treated with HAEMP (Figure 7).

Discussion

The present study investigated the cytotoxic and anti-inflammatory activity of two hydroalcoholic extracts: *M. piperita* and *P. guajava*. Chemical characterization of the extracts was performed using HPLC. The analysis of HAEMP indicated the

presence of seven compounds, and the major compound was epicatechin. These results are different from those obtained previously [16] using a methanolic extract of *M. piperita*, wherein eight compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry, and the major compounds were p-isopropenyl toluene, palmitic acid, and carvone, among others. The analysis of HAEPG indicated the presence of eight compounds, including gallic acid, caffeic acid, and myricetin, and this result is in agreement with that of a previous study [17], which identified the same compounds in the ethanolic extract of *P. guajava*.

For the anti-inflammatory activity, we used an inflammation model to determine the cytotoxicity, NO and H₂O₂ levels, and phagocytosis in macrophages. Macrophages play a major role in the defense against infection, and they are activated when their pattern recognition receptors interact with pathogen-associated molecular patterns, leading to the production of ROS and ROS (primarily NO). Activated macrophages release pro-inflammatory cytokines and chemokines, which are responsible for the recruitment and activation of cells involved in the elimination of pathogens [18].

Macrophages respond to a variety of endogenous and exogenous stimuli, particularly LPS. LPS is obtained from gram-negative bacteria, and it activates the innate immune system and regulates the gene expression of proinflammatory cytokines [19]. In this study, the viability of macrophages stimulated with LPS and treated with each extract was significantly higher than that of the control. PrestoBlue is a resazurin-based compound used as an indicator of cell viability, and it is converted to the reduced form by mitochondrial enzymes of viable cells in the evaluated systems. Previous studies have demonstrated its adequacy for evaluating cell viability [20, 21].

Activated macrophages produce certain metabolites that are responsible for the effector role of the immune system, including compounds derived from oxygen

(superoxide anion (O_2^-) and H_2O_2) and nitrogen (NO). However, an excess of NO produces disorders, which lead to a loss of homeostasis. The oxidative stress generated by the increase in the endogenous production of NO can induce toxicity, which is associated with disease pathogenesis. Compounds capable of sequestering the NO radical can be used as preventive and therapeutic alternatives for these disorders and may decrease RNS-induced toxicity by modulating inflammatory processes [22]. In this study, the reduction in the levels of NO and H_2O_2 by HAEMP may be associated with the presence of the polyphenol epicatechin. Epicatechin, a catechin isomer, can prevent oxidative stress and subsequent tissue damage by neutralizing the effects of free and non-free radicals [23].

Despite the important endogenous role of NO, several studies have demonstrated that excess NO may be involved in disease development [24, 25]. In this context, compounds that can sequester this radical may play an important cytoprotective role, modulating toxic processes induced by RNS and inflammatory processes and reducing oxidative stress; therefore, these compounds may serve as alternative therapies for some of these disorders.

The development of drugs using natural products represents a novel therapeutic strategy. The ability of HAEMP and HAEPG to modulate the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated macrophages indicates the immunomodulatory potential of these plant species.

Materials and Methods

Plant material

The leaves of *M. piperita* were collected in September in the municipality of Santa Luzia, state of Maranhão, Brazil, and the leaves of *P. guajava* were collected in August in the neighborhood of Maracanã, São Luís, Maranhão, Brazil. The voucher

specimens were deposited in the Herbarium of the Department of Pharmacy of the Federal University of Maranhão (Universidade Federal do Maranhão–UFMA), Brazil, under nos. 01275 and 00528, respectively.

Preparation of crude extracts

The plant material was dried in a forced air oven at 45 °C, milled, and macerated for 10 days at room temperature using 70% ethanol (v/v) as a solvent. Subsequently, the extracts were filtered using a vacuum pump and concentrated under reduced pressure (rotary evaporator). Each crude extract was weighed and stored at 8 °C until analysis.

Chemical characterization

High-performance liquid chromatography

The hydroalcoholic extracts of *P. guajava* (HAEPG) and *M. piperita* (HAEMP) were dissolved in methanol and acidic water to obtain a final concentration of approximately 5 mg/ml and then filtered using a 0.22-µm nylon filter. The analysis was performed using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Surveyor Plus, Finnigan) coupled to a UV-visible (UV-Vis) detector and an ACE 5 C18 reverse phase analytical column (4.60 x 250 mm, 5 µm) protected by a C18 guard column (4 x 3 mm, 5 µm, Gemini, Phenomenex). The extract compounds were separated at room temperature using gradient elution and a flow rate of 0.6 ml/min. The mobile phases consisted of purified water containing 0.1% acetic acid (A) and methanol (B). The gradient used was as follows: 0–2 min at 5% B, 2–10 min at 25%–40% B, 10–20 min at 40%–50% B, 20–30 min at 50%–60% B, 30–40 min at 60%–70% B, and 40–50 min at 70–80% B. The injection volume was 10 µl, and UV-Vis detection was performed at 254 nm. Gallic acid, β-sitosterol, ursolic acid, caffeic acid, quercitrin, myricetin, and naringenin standards were diluted and analyzed under the same conditions as for the HAEPG samples. For HAEMP, ursolic acid, epicatechin, caffeic acid, rutin, quercetin, naringenin, and kaempferol standards were used.

Determination of anti-inflammatory activity

Animals

This study used male Swiss mice (aged 2–3 months) maintained under normal environmental conditions and fed a standard diet with free access to water. The mice were obtained from the animal sector of CEUMA University (UNICEUMA). The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of CEUMA University under protocol no. 014/2015. All animals were treated according to the guidelines of the Brazilian Council for Animal Studies.

Cell viability

Peritoneal macrophages of naive Swiss mice were obtained following a previously described methodology [14] with a peritoneal injection of 1 ml of PBS containing 1% oyster glycogen. Eighteen hours after injection, the animals were sacrificed by terminal anesthesia using a mixture of 75 mg/kg ketamine and 1 mg/kg xylazine, followed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was washed with 10 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS). Peritoneal cells were collected with the wash, centrifuged for 10 min at 4 °C, and resuspended at a final concentration of 2×10^6 cells/ml in DMEM containing 10% fetal bovine serum (v/v), 2 mM glutamine (Sigma), 1x penicillin (Sigma), and 1x streptomycin (Sigma). Cells at a density of 6×10^5 per well were transferred to 96-well plates at 37 °C, and the non-adherent cells were removed after 2 h. The adherent cells (macrophages) were incubated for 30 min in the presence and absence of each extract (11000 µg/ml) or vehicle (1% DMSO in sterile PBS) and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) derived from *Klebsiella pneumoniae* (Sigma-Aldrich) at a concentration of 100 ng/ml for 24 h.

Measurement of NO_x

The levels of NO₂⁻ and NO₃⁻ (NO_x) were measured using the Griess method as previously described [15] as a measure of the levels of NO produced by the peritoneal macrophages of Swiss mice. For this purpose, NO₃⁻ was reduced to NO₂⁻ by incubating 80 µl of each sample with 20 µl of nitrate reductase (1 U/ml) and 10 µl of beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 37 °C. After 30 min, 100 µl

of Griess reagent (5% H_3PO_4 v/v containing 1% sulfanilic acid (w/v) and 0.1% N-1-naphthylethylenediamine (w/v)) were added to the samples and incubated for 15 min at 37 °C. After incubation, the samples were read at 550 nm. The baseline readings were subtracted from each sample; the results were compared with those obtained using a standard curve of sodium nitrite (0–100 μM) and were expressed as the NO_x levels (μM).

Measurement of H_2O_2

The release of H_2O_2 produced by peritoneal macrophages from Swiss mice was evaluated using an Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen). The assay was performed as previously described [15]. Briefly, 50 μl of supernatant was incubated with 100 μl of Krebs buffer and 100 μl of a solution containing 0.05 M sodium phosphate pH 7.4, 0.2 U/ml horseradish peroxidase and 25.7 mg/ml Amplex® Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) at 37 °C for 2 h. The samples incubated in the presence of Krebs buffer alone served as controls. After incubation, 100 μl of each sample was transferred to a 96-well plate. The 560 nm readings of the samples incubated in the presence and absence of Amplex® Red reagent were compared with those from a standard curve of H_2O_2 (0–40 mM), and the results were expressed in mM as the difference between the readings of the samples incubated with Amplex® Red reagent and those incubated with Krebs buffer alone.

Analysis of phagocytosis

Macrophages were cultured as described in the previous section using 8-well chambers in the presence of 2- μm latex fluorescent beads (1:100; 5 μl /well; Sigma, Gillingham, UK). After incubation with a bacterial antigen and each extract, the percentage of cells with phagocytosed beads and the number of beads phagocytosed by each set of 100 cells were quantified and considered the phagocytosis index.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ the standard deviation. The percentage of inhibition was calculated as the average inhibition determined for each experiment. The results were analyzed statistically using analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test or Newman-Keuls test or by the paired or unpaired t-test, when appropriate. P-values smaller than 0.05 were indicative of significance.

List of Abbreviations

HPLC, high-performance liquid chromatography; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; NO, nitric oxide; H₂O₂, hydrogen peroxide; HAEPG, hydroalcoholic extract of *Psidium guajava*; HAEMP, hydroalcoholic extract of *Mentha piperita*; LPS, lipopolysaccharide.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) for grant award REBAX No. 03628/13 and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and a scholarship grant.

References

- [1]. D. Fairweather, D.C. Balternatively. Activated macrophages in infection and autoimmunity. J. Autoimm. 33 (2009) 222-230.
- [2]. C. Bogdan, M. Rölinghoff, A. Diefenbach. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol. Rev. 173 (2000) 17-26.
- [3]. H.H Schmidt, U. Walter. NO at work. Cell. 78 (1994) 919-925.
- [4]. B. Patwardhan, G. Manish. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. Drug Discov. Today 10 (2005) 495-502.
- [5]. Saranavan, S; Prakash Babu, N; Pandikumar, P; Karunai Raj, M; Gabriel Paulraj, M; Ignacimuthus, S. Immunomodulatory potential of *Enicostema oxilare* (Lam.) A. Raynal, a traditional medicinal plant. J. Ethnopharmacol., v. 140, n. 2, p. 239-246, 2012.
- [6]. Gautam,R.; Jachak, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. Med Res Rev. 29:767-820, 2009.
- [7]. Sun Z, Wang H, Wang J, Zhou L, Yang P: Chemical Composition and Anti Inflammatory, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Essential Oil from Leaves of *Mentha piperita* Grown in China. *PloS one* 2014, 9(12):e114767.

- [8]. Ojewole JA: Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 2006, 28(7):441-446.
- [9]. Ashraf A, Sarfraz RA, Rashid MA, Mahmood A, Shahid M, Noor N: Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts. *Pharmaceutical biology* 2016:1-11.
- [10]. Abdelrahim SI, Almagboul AZ, Omer ME, Elegami A: Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia* 2002, 73(7-8):713-715.
- [11]. Kumalasari, ID; Harmayani, E; Lestari, LA; Raharjo, S; Asmara, W; Nishi, K; Sugahara, T. Evaluation of immunostimulatory effects of the arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) in vitro and in vivo. *Cytotechnology*, v. 64, n. 2, p. 131-137, 2012.
- [12]. Seo, DW; Cho, YI; Gu, S; Kim, DH; Park, JH; Yi, YJ; Lee, SM. A hot water extract of *Aralia cordata* activates bone marrow-derived macrophages via a myeloid differentiation protein 88-dependent pathway and protects mice from bacterial infection. *Microbiology and Immunology*, v. 60, n. 5, p. 343-355, 2016.
- [13]. Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E: Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation* 2007, 2007:45673.
- [14]. Fernandes ES, Liang L, Smillie SJ, Kaiser F, Purcell R, Rivett DW, Alam S, Howat S, Collins H, Thompson SJ *et al*: TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. *Journal of immunology* 2012, 188(11):5741-5751.
- [15]. Mendes SJ, Sousa FI, Pereira DM, Ferro TA, Pereira IC, Silva BL, Pinheiro AJ, Mouchrek AQ, Monteiro-Neto V, Costa SK *et al*: Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *International immunopharmacology* 2016, 34:60-70.
- [16]. Hossain MA, Al-Hdhami SS, Weli AM, Al-Riyami Q, Al-Sabahi JN: Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L grown in Sultanate of Oman. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2014, 4(Suppl 1):S368-372.
- [17]. Jang, M; Jcong, S-W; Cho, SK; Yang, HJ; Yoon, D-S; Kim, J-C; Park, K-H. Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. *Journal of functional foods*, v. 10, p. 161-168, 2014.
- [18]. Chen Z, Soo MY, Srinivasan N, Tan BK, Chan SH: Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *Phytotherapy research: PTR* 2009, 23(8):1116-1122.
- [19]. Yang L, Francois F, Pei Z: Molecular pathways: pathogenesis and clinical implications of microbiome alteration in esophagitis and Barrett esophagus. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012, 18(8):2138-2144.
- [20]. Istivan TS, Pirogova E, Gan E, Almansour NM, Coloe PJ, Cosic I: Biological effects of a de novo designed myxoma virus peptide analogue: evaluation of cytotoxicity on tumor cells. *PloS one* 2011, 6(9):e24809.

- [21]. Lall N, Henley-Smith CJ, De Canha MN, Oosthuizen CB, Berrington D: Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *International journal of microbiology* 2013, 2013:420601.
- [22]. Saha, RN 2006. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 49: 154-163.
- [23]. Odabasoglu, F.; Halici, Z.; Cakir, A.; Halici, M.; Aygun, H.; Suleyman, H.; Cadirci, E.; Atalay, F. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and alpha-tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 591, n. 1-3, p. 300-306, 2008
- [24]. Ippoushi, K 2009. Prevention of peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. *Food Chem.* 112: 185-188.
- [25]. Yuan, Z; Feng, W; Hong, J; Zheng, Q; Shuai, J; Ge, Y. p38MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. *Nitric Oxide*, v. 20, n. 1, p. 9-15, 2009

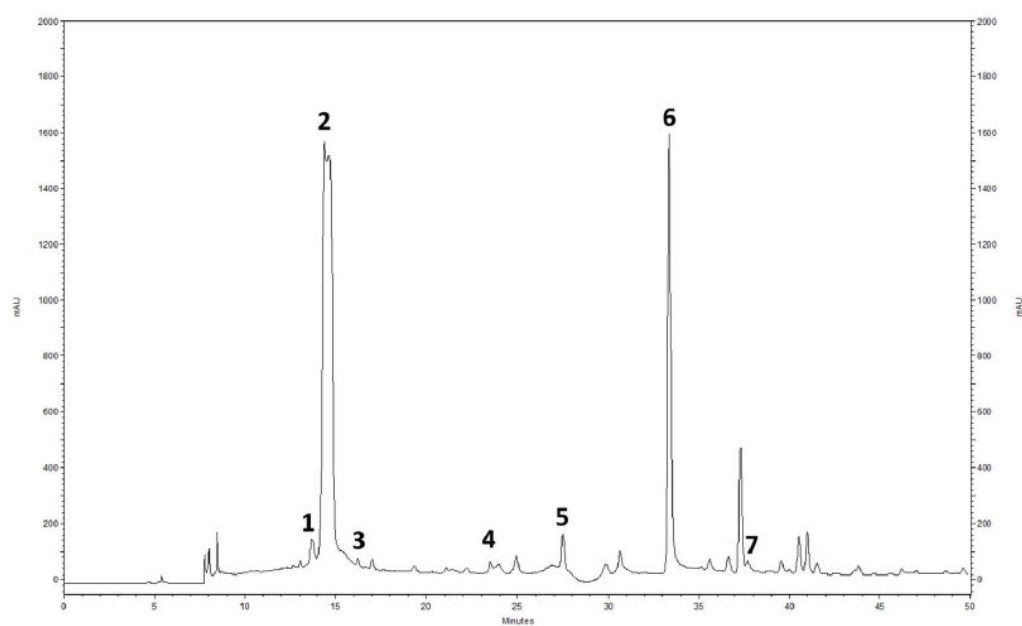


Figure 1. Chromatographic profile of the hydroalcoholic extract of *Mentha piperita*.

Table 1. Identification of the chemical compounds of the hydroalcoholic extract of *Mentha piperita* by high-performance liquid chromatography.

N	Compound name	Retention time (min)
1	ursolic acid	13.807
2	epicatechin	14.503
3	caffeic acid	16.363
4	rutin	23.605
5	quercetin	27.627
6	naringenin	33.497
7	kaempferol	37.822

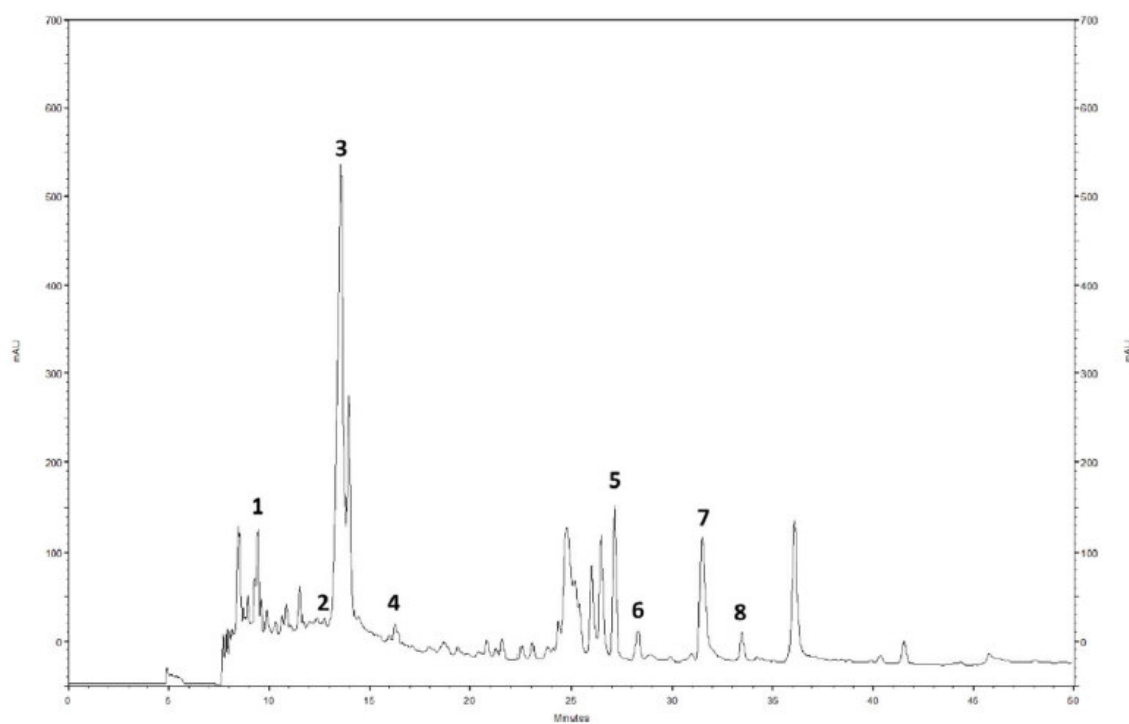


Figure 2. Chromatographic profile of the hydroalcoholic extract of *Psidium guajava*.

Table 2. Identification of the chemical compounds of the hydroalcoholic extract of *Psidium guajava* by high-performance liquid chromatography.

N	Compound name	Retention time
1	gallic acid	9.565
2	β -sitosterol	12.918
3	ursolic acid	13.708
4	caffeic acid	16.383
5	quercitrin	27.250
6	myricetin	28.423
7	quercetin	31.627
8	naringenin	33.598

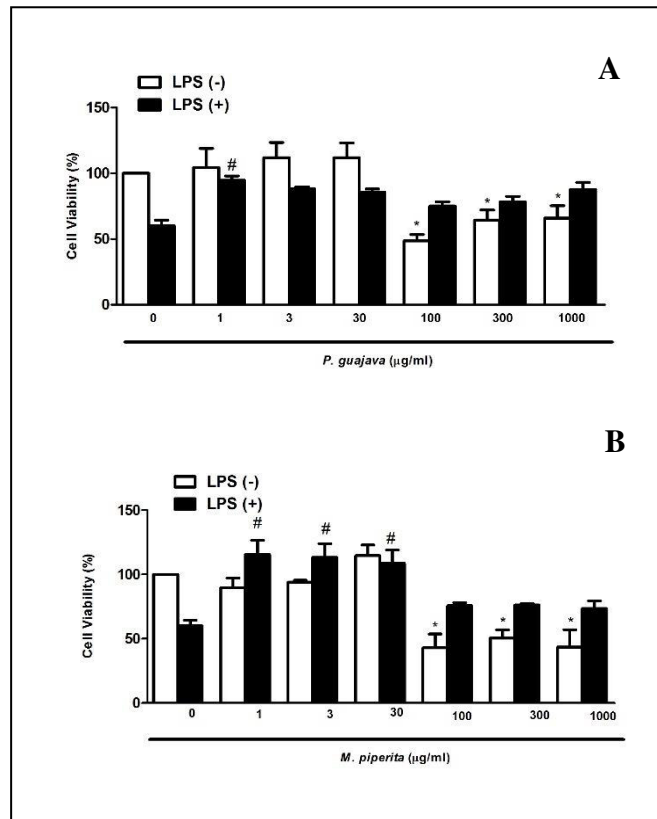


Figure 3. Effect of the hydroalcoholic extract of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* on the viability of peritoneal macrophages of Swiss mice cultured *in vitro* with or without LPS stimulation. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals.

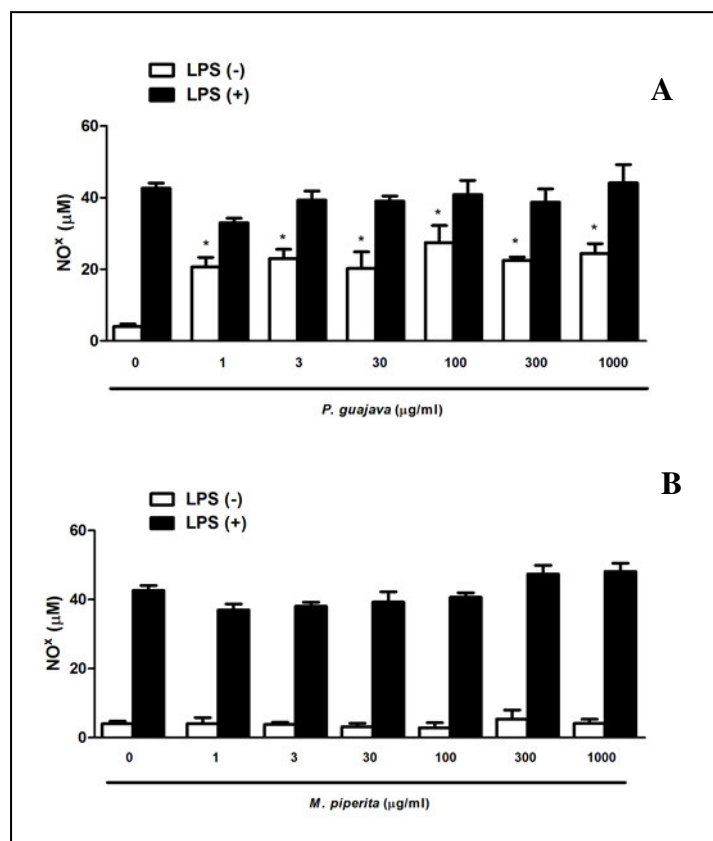


Figure 4. Effect of the hydroalcoholic extract of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* on the production of nitric oxide by peritoneal macrophages from Swiss mice cultured *in vitro* with or without LPS stimulation. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals.

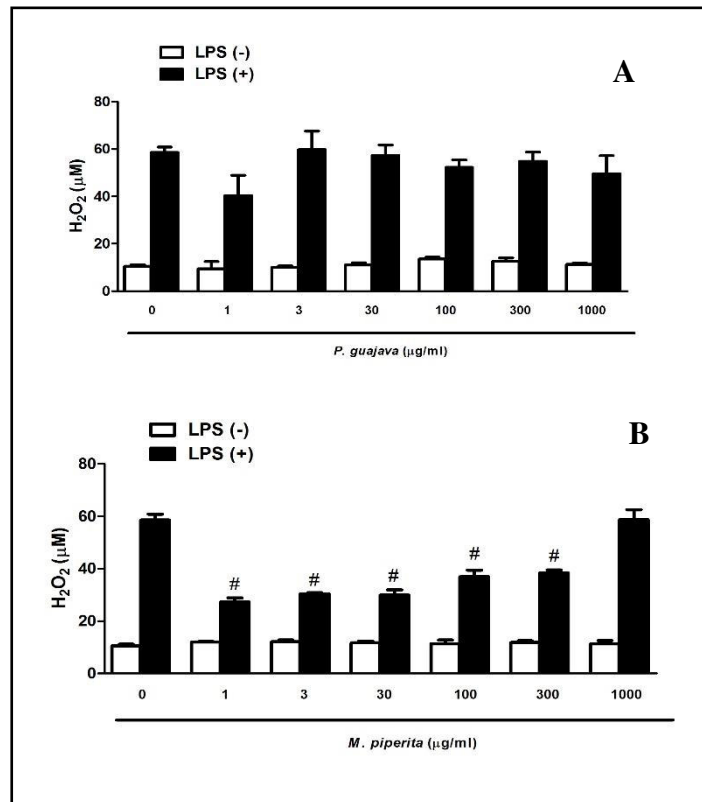


Figure 5. Effect of the extract of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* on the production of hydrogen peroxide by peritoneal macrophages of Swiss mice cultured *in vitro* with or without LPS stimulation. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals.

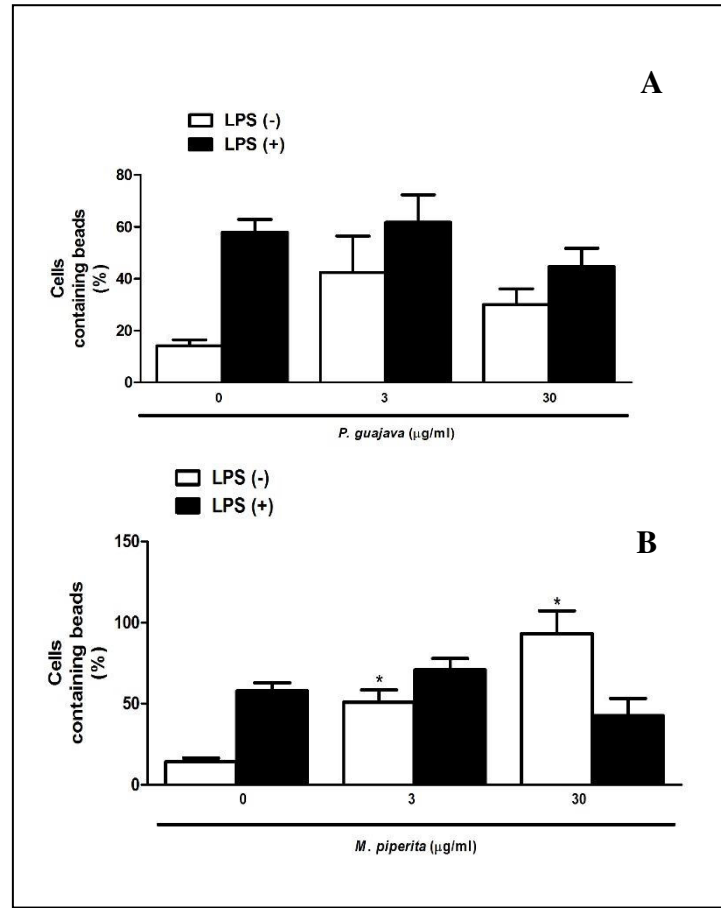


Figure 6. Phagocytic profile of the extracts of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* expressed as the percentage of cells containing beads after the stimulation of peritoneal macrophages with LPS. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals.

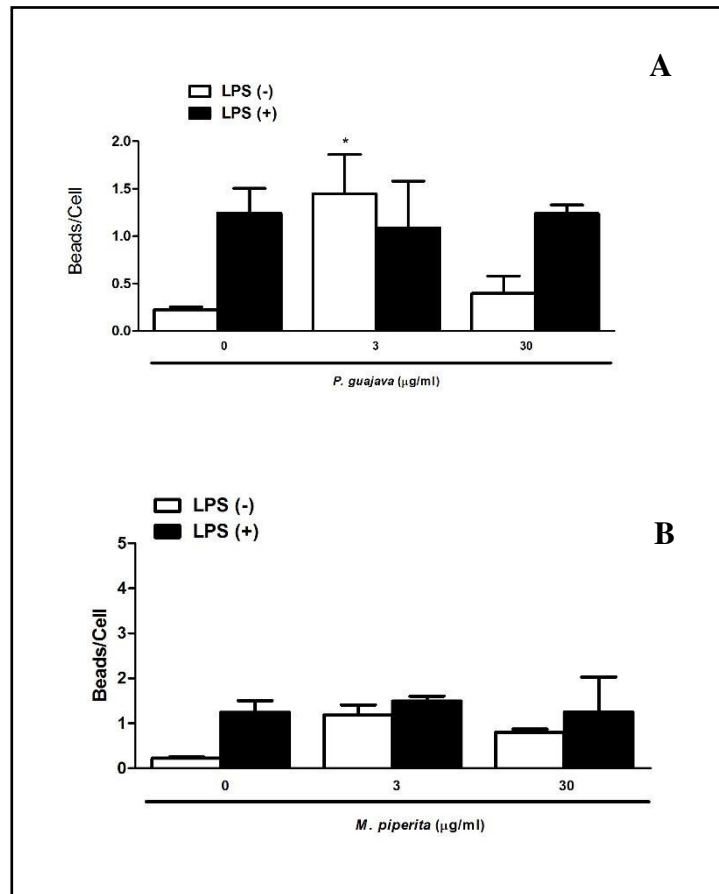


Figure 7. Phagocytic profile of extracts of (A) *P. guajava* and (B) *M. piperita* expressed as the bead/cell ratio after the stimulation of peritoneal macrophages with LPS. The results correspond to three independent assays. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS⁻ group. # $p < 0.05$ indicate a significant difference from the LPS⁺ group. Each group contained four animals.

CAPÍTULO 3



Mariana Oliveira Arruda · Fernanda Edna Moura

Infecções respiratórias agudas virais

Estudo clínico e epidemiológico

 **Novas Edições
Acadêmicas**

Mariana Oliveira Arruda
Fernanda Edna Moura

Infecções respiratórias agudas virais
Estudo clínico e epidemiológico

Novas Edições Acadêmicas

Impressum / Impressão

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Informação biográfica publicada por Deutsche Nationalbibliothek: Nationalbibliothek numera essa publicação em Deutsche Nationalbibliografie; dados biográficos detalhados estão disponíveis na Internet: <http://dnb.d-nb.de>.

Os outros nomes de marcas e produtos citados neste livro estão sujeitos à marca registrada ou a proteção de patentes e são marcas comerciais registradas dos seus respectivos proprietários. O uso dos nomes de marcas, nome de produto, nomes comuns, nome comerciais, descrições de produtos, etc. inclusive sem uma marca particular nestas publicações, de forma alguma deve interpretar-se no sentido de que estes nomes possam ser considerados ilimitados em matérias de marcas e legislação de proteção de marcas e, portanto, ser utilizadas por qualquer pessoa.

Coverbild / Imagem da capa: www.ingimage.com

Verlag / Editora:

Novas Edições Acadêmicas

ist ein Imprint der / é uma marca de

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Niemcy

Email / Correio eletrônico: info@nea-edicoes.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Publicado: veja a última página

ISBN: 978-3-639-68527-5

Copyright / Copirraite © 2014 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Todos os direitos reservados. Saarbrücken 2014

Infecções respiratórias agudas virais

Este livro apresenta uma análise retrospectiva de aspectos epidemiológicos de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um serviço de emergência de um hospital terciário de Fortaleza-CE no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008. Esta análise contribuiu para um melhor entendimento sobre os agentes virais causadores de infecções respiratórias agudas na cidade de Fortaleza.

Mariana Oliveira Arruda

A organizadora desta obra é formada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Maranhão (2009), possui mestrado em Microbiologia Médica pela Universidade Federal do Ceará (2011) e atualmente é doutoranda pela Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE/UFMA.



978-3-639-68527-5



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os extratos estudados possuem potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que os extratos de *B. orellana*, *M. piperita* e *P. guajava* apresentaram atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas.
- O extrato de *B. orellana* e *P. guajava* apresentaram efeito antimicrobiano para os biofilmes formados por *S. aureus* e *P. aeruginosa*, destacando-se o extrato de *B. orellana* por ter apresentado o maior percentual de redução do biofilme.
- Os compostos fenólicos foram detectados em todos os extratos estudados e, quando submetido a análise por cromatografia líquida de alta eficiência, o composto majoritário detectado no extrato de *M. piperita* foi a epicatequina e naringenina, enquanto no extrato de *P. guajava* foi o ácido cafeico, ácido ursólico, naringenina e quercentina;
- Além do potencial antimicrobiano do extrato de *M. piperita* também foi observado um potencial anti-inflamatório, uma vez que foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio *in vitro*.

ANEXOS

**Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Universidade
Ceuma**



CEUMA – UNIVERSIDADE
Reitoria
Gerências de Graduação e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA UNICEUMA

DECISÃO DA CEUA – UNICEUMA SOBRE PROTOCOLO SUBMETIDO

DATA DO RECEBIMENTO:

Nº DO PROTOCOLO: 372/15

Nº DO PARECER: 34/2015

DATA DO PARECER: 05/10/2015

TÍTULO DO PROJETO/AULA: Atividade antimicrobiana de produtos naturais sobre patógenos respiratórios

CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA:

PESQUISADOR/PROFESSOR RESPONSÁVEL: Dr. Valério Monteiro Neto

COLABORADORES: Dra. Elizabeth Soares Fernandes (Universidade Ceuma).

DECISÃO: (X) APROVADO () PENDENTE () EXCLUÍDO () NÃO APROVADO

A CEUA-UNICEUMA, em sua função de examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na Instituição, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável (Lei. 11794 e Resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA). Reuniu-se no dia 05/10/2015, para apreciar a análise do relator da proposta de protocolo nº372/15, tendo chegado por votação da maioria dos membros presentes, as seguintes considerações:

Considerações:

O projeto tem por objetivo caracterizar os efeitos citotóxico e imunomodulador dos extratos hidroalcoólicos extraídos da semente de *Bixa orellana*, folhas de *Psidium guajava* e partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* e *Mentha piperita*, em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos pré-elicitados com glicogênio de ostra, cultivados *in vitro* e estimulados com antígeno derivados de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Estes extratos mostraram efeito anti-microbiano sobre micro-organismos causadores de doenças respiratórias.

O protocolo experimental prevê o uso de 20 camundongos machos heterogênicos Suíço procedentes do Biotério da Universidade Ceuma. Todos estarão em alojamento no Biotério da Universidade Ceuma que atende as necessidades dos animais satisfatoriamente.

Os macrófagos serão elicitados com injeção peritoneal de 1 mL PBS contendo 1% glicogênio de ostra em camundongos de 2-3 meses de idade. Após 18 h os camundongos serão sacrificados por anestesia terminal (cetamina 75mg/kg e xilazina 1 mg/kg) seguida por deslocamento cervical e cavidade peritoneal lavada com 10 mL de PBS gelado. As células

peritonias serão coletadas, lavadas, centrifugadas, ressuspensas em meio adequado e distribuídas em microplacas de 96 poços para aderência por 2 h. As células aderentes serão incubadas na presença e ausência de extrato e 30 min após estimuladas com antígenos bacterianos (100 ng/mL) em diferentes tempos experimentais. Parâmetros como NOx, H2O2, viabilidade celular serão avaliados por meio de kits comerciais. Para análise de fagocitose as células serão cultivadas em câmaras 8 poços, na presença de esferas de 2µm, incubadas com antígenos e extratos e a porcentagem de células com esferas fagocitadas e o número de esferas fagocitadas por cada 100 células serão quantificadas e tomadas como índice de fagocitose.

Grau de invasividade é 1 com estresse intencional curto devido injeção de glicogênio de ostra por via intraperitoneal causando peritonite leve. Os animais serão monitorados para verificação de necessidade de término precoce do experimento.

O alojamento será de 5 animais por gaiola, a uma temperatura de 21-22°C, umidade e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados com livre acesso a ração e água. Não haverá imobilização do animal ou cirurgia durante os experimentos.

Haverá uso de fármacos anestésicos cetamina 75mg/kg intramuscular. Haverá uso de relaxante muscular xilasina 1 mg/kg via intramuscular.

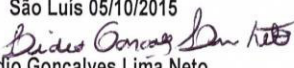
Não haverá uso de fármacos analgésicos, visto que os mesmos interferem com o curso das respostas imune e inflamatórias do macrófago.

Os procedimentos experimentais propostos no projeto como doses e via de administração de anestésicos, extratos, droga controle, extração de materiais biológicos, controle do estresse, indução de morte, destino dos animais após experimentos e descarte da carcaça estão de acordo com os procedimentos e regulamentos do CONCEA. O método de indução de morte será por anestesia terminal (cetamina 75 mg/Kg; xilasina 1 mg/kg) por via intramuscular seguida de deslocamento cervical. Carcaças acondicionadas em sacos plásticos brancos leitosos, armazenados em -20°C até incineração..

Conclusão: Aprovado

Com base nos dados fornecidos pelo proponente, a Comissão, autoriza o protocolo supracitado, devendo o presente documento ser apresentado a Coordenação do Biotério, para agendamento do início dos procedimentos.

* Cópia do protocolo segue anexa.

São Luís 05/10/2015

Lídio Gonçalves Lima Neto
Coordenadora CEUA-UNICEUMA
Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto
Coord. Comissão de Ética no Uso
de Animais - CEUA
Universidade Ceuma

