

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GRAZIELA CLAUDIA DA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Hymenaea* spp. : COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO
ULTRAESTRUTURAL SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES E *Candida* spp.**

Recife
2018

GRAZIELA CLAUDIA DA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Hymenaea* spp.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO
ULTRAESTRUTURAL SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES E *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: PROF^a. DR^a MARIA TEREZA DOS S. CORREIA

Coorientador: PROF^a DR^a MÁRCIA VANUSA DA SILVA

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Graziela Claudia da

Óleos essenciais de *Hymenaea* spp.: composição química e estudo ultraestrutural sobre atividade antimicrobiana em bactérias multirresistentes e *Candida* spp. / Graziela Claudia da Silva. – Recife, 2018.

104 f. : il.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Tereza dos S. Correia.

Coorientadora: Prof. Dra. Marcia Vanusa da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Agentes anti-infecciosos. I. Correia, Maria Tereza dos S. (orient.). II. Silva, Marcia Vanusa da (coorient.). II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 236

GRAZIELA CLAUDIA DA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Hymenaea* spp.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO
ULTRAESTRUTURAL SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES E *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 08 02/18

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Alexandre Gomes da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Maria Betânia Melo de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, pelo amor,
carinho e incentivo. A melzinha,
minha filha de quatro patas e
parceira de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS, por toda força, persistência e presença constante.

Aos meus pais, pelas lições de vida, amor, confiança e por estarem ao meu lado na realização deste trabalho.

À minha estimada amiga Alice, que durante esses dois anos me ajudou a enfrentar os desafios do mestrado.

Às minhas orientadoras, Prof^a. Dr^a. Maria Tereza e Prof^a. Dr^a. Marcia Vanusa, pela confiança, orientação e por tudo que apreendi com suas experiências e sabedorias.

Ao Prof. Dr. Alexandre Gomes, pela coleta, identificação das espécies vegetais e valiosas contribuições na estruturação e execução desse projeto.

À Prof^a Dr^a Daniela Navarro e ao técnico Júlio, pela disponibilidade e auxílio nas caracterizações dos óleos essenciais.

À Prof^a Dr^a. Dyana Leal, pela valiosa parceria e aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA, Gabriel e Rafael, pela ajuda no processamento e análises das amostras biológicas.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por todos os conhecimentos que contribuíram para minha formação profissional.

À secretária do PPGCB, Adenilda (Adê), por ser sempre tão solícita e carinhosa comigo.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais, Paloma, Luciclaudio, João, Filipe e Jucielma, pela disponibilidade e companheirismo nos experimentos.

À Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar – FIOCRUZ/RJ, em especial ao Dr. Cláudio Rocha, pela gentileza no fornecimento de cepas.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que não foram citados, mas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização e conclusão desse trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem (ROSA, J. G. 1956).

RESUMO

Os óleos essenciais são considerados excelentes fontes para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois sua composição química bastante complexa demonstra uma variedade de ações farmacológicas. Seu uso como agente antimicrobiano oferece um baixo risco de desenvolvimento à resistência microbiana e sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ação. *Hymenaea* spp., popularmente conhecidas por “jatobá”, são comumente utilizadas na medicina tradicional para tratar várias infecções bacterianas e processos inflamatórios. Este trabalho tem como objetivo caracterizar os óleos essenciais de folhas das espécies *Hymenaea eriogyne* Benth (OEHe), *Hymenaea longifolia* Benth (OEHI) e *Hymenaea rubriflora* Ducke (OEHR), coletadas em fitofisionomias de Caatinga e Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, bem como avaliar as alterações ultraestruturas sobre atividade antimicrobiana em bactérias multirresistentes e leveduras. As extrações dos óleos foram realizadas por hidrodestilação e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG-EM). A atividade antimicrobiana e a interação sinérgica foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, sendo testadas cepas multirresistentes de *Escherichia coli* (BlackKPC⁺), *Klebsiella pneumoniae* (BlackKPC⁺), *Pseudomonas aeruginosa* (BlacSPM⁺) e *Staphylococcus aureus* UFPEDA (700,705 e 726). Também foi avaliada a ação frente a isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. As alterações na permeabilidade da membrana foram investigadas por ensaios de absorção de cristal violeta, liberação de material absorvente de UV e microscopia eletrônica varredura e transmissão. Nas análises em CG-EM dos constituintes químicos, do OEHR revelou a presença de germacrene-D (16,13%), E-caryophyllene (36,72%), α -humulene (6,06%) e β -elemene (5,61%); E-caryophyllene (27,45%; 26,56%), α -selinene (10,16%; 9,63%), γ -Muurolene (7,88%) e germacrene-B (8,97%), nos OEHe e OEHI. Todos os óleos mostraram atividade fungicida, bactericida e bacteriostática frente às cepas de *Candida* e *Staphylococcus aureus*. O OEHR apresentou-se mais efetivo frente as cepas de *Staphylococcus aureus* com perfil resistente (UFPEDA 705) e *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos. Nos ensaios de interação sinérgica, os óleos foram capazes de reduzir as Concentrações Inibitórias Mínimas dos fármacos: gentamicina e fluconazol com valores significantes. As observações

em microscopia eletrônica de varredura e transmissão verificaram alterações morfológicas, rupturas, depressões da membrana plasmática em *K. pneumoniae* (BlackPC⁺), associados aos resultados dos ensaios de cristal violeta e absorção de UV sugerem que o modo de ação do óleo de *H. rubriflora* Ducke esteja relacionado a alterações na permeabilidade da membrana. Nas células de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram observadas via microscopia eletrônica de varredura a inibição de formações de hifas quando tratadas com OEHR, o que sugere a ação do óleo como possível inibidor de um dos fatores de virulência desses microorganismos. Este é o primeiro estudo a caracterizar os óleos essenciais e avaliar a atividade antimicrobiana dessas três espécies de *Hymenaea*. Os resultados sugerem que os óleos essenciais de *Hymenaea* spp. podem ser utilizados como uma nova fonte de antimicrobianos bioativos.

Palavras-chaves: Agente antimicrobiano. Mecanismo de ação. Planta medicinal. Sinergismo. Jatobá.

ABSTRACT

Essential oils are essential for the development of new drugs because their very complex chemical composition demonstrates a variety of actions. Its use as an antimicrobial agent offers a low risk of development in microbial resistance and its antimicrobial activity may be related to different mechanisms of action. *Hymenaea* spp., popularly known as "Jatoba", are commonly found in traditional medicine to treat various bacterial infections and inflammatory processes. The objective of this work is to characterize the essential oils of leaves of the species *Hymenaea eriogyne* Benth (OEHe), *Hymenaea longifolia* Benth (OEHI) and *Hymenaea rubriflora* Ducke (OEHR), collected in Caatinga and Atlantic Forest phytophysionomies of the State of Pernambuco, as well as to evaluate asper ultrastructures on the antimicrobial activity in multiresistant bacteria and yeast. The extractions of the oils were carried out by hydrodistillation and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrum (GC-MS). An antimicrobial activity and a synergistic interaction with the broth microdilution method were tested, and strains of *Escherichia coli* (BlackKPC +), *Klebsiella pneumoniae* (BlackKPC +), *Pseudomonas aeruginosa* (BlackSPM +) and *Staphylococcus aureus* UFPEDA (700.705 and 726) were tested. An action against clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* was also evaluated. Asso in membrane permeability were investigated by violet glass absorption assays, UV absorbing material release and scanning electron microscopy and transmission. In the GC-MS analyzes of the chemical constituents, OEHR revealed a presence of germacrene-D (16.13%), E-caryophyllene (36.72%), α -humulene (6.06%) and β -elemene 61%); E-caryophyllene (27.45%, 26.56%), α -selinene (10.16%, 9.63%), γ -Muurolene (7.88%) and germacrene- in OEHe and OEHI. All the oils showed fungicidal, bactericidal and bacteriostatic activity against the strains of *Candida* and *Staphylococcus aureus*. OEHR was more effective in the presence of resistant strains of *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 705) and *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems. In the synergistic interaction tests, the oils are able to reduce as Minimal Inhibitory Concentrations of the drugs: gentamicin and fluconazole with significant values. As observations in scanning electron microscopy and verifiable morphological transmission, ruptures, plasma membrane depressions in *K. pneumoniae* (BlackKPC +), associated with the results of violet glass and UV absorption assays suggest the

mode of action of *H. Rubriflora* oil Ducke related to membrane permeability. In the cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, the inhibition of hyphae formation when treated with OEHR was observed by scanning electron microscopy, which suggests an oil action as a possible inhibitor of one of the virulence factors of the microorganisms. This is the first study to characterize the essential oils and to evaluate an antimicrobial activity of three species of *Hymenaea*. The results suggest that the essential oils of *Hymenaea* spp. can be used as a new source of bioactive antimicrobials.

Key-words: Antimicrobial agent. Mechanism of action. Medicinal plant. Synergism. Jatobá.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	Características gerais de floresta de Domínio Atlântico	19
FIGURA 2 –	Parque Nacional do Vale do Catimbau, área de predominância de vegetação de caatinga	20
FIGURA 3 –	Espécie <i>Hymenaea eriogyne</i>	22
FIGURA 4 –	Espécie <i>Hymenaea rubriflora</i> Ducke	23
FIGURA 5 –	Espécie <i>Hymenaea longifolia</i>	24
FIGURA 6 –	Funções dos óleos essenciais nas plantas	27
FIGURA 7 –	Estrutura Química do isopreno	28
FIGURA 8 –	Estrutura Química do ácido cinâmico (1) e ácido <i>p</i> -cumárico	29
FIGURA 9 –	Esquema proposto para vias de atuação dos óleos essenciais	30
FIGURA 10 –	Mecanismo de resistencia a antimicrobianos	37

Artigo

FIGURA 1 –	Interação sinérgica com óleo essencial de <i>Hymenaea rubriflora</i> Ducke com fármacos	55
FIGURA 2 –	Absorção do cristal violeta em células tratadas com os óleos essenciais	57
FIGURA 3 –	Presença de material absorvente de UV a 260nm nos tratados com oe	59
FIGURA 4 –	Microscopia eletrônica de varredura de <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	62
FIGURA 5 –	Microscopia eletrônica de varredura de <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida albicans</i>	63
FIGURA 6 –	Microscopia eletrônica de transmissão de <i>K. pneumoniae</i>	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Atividade biológicas relatadas na literatura para <i>Hymenaea</i> spp	25
---	----

Artigo

TABELA 1 – Identificação dos constituintes dos óleos essenciais das folhas de <i>H. rubriflora</i> Ducke, <i>H. eriogyne</i> e <i>H. longifolia</i>	51
TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de <i>H. eriogyne</i> , <i>H. longifolia</i> e <i>H. rubriflora</i> Ducke.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
mg	Miligrama (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
CG	Cromatografia gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FIC	Concentração fração inibitória
IPP	Isopentenilpirofosfato
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
OEhr	Óleo essencial de <i>Hymenaea rubriflora</i> Ducke
OEHe	Óleo essencial de <i>Hymenaea eriogyne</i> Benth
OEHI	Óleo essencial de <i>Hymenaea longifolia</i>
CCBH	Coleção de Cultura de Bactérias de Origem Hospitalar
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	Objetivo geral.....	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	18
2.1	MATA ATLÂNTICA E CAATINGA	18
2.2	CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE <i>HYMENAEA</i> spp.: <i>Hymenaea eriogyne</i> BENTH, <i>Hymenaea rubriflora</i> DUCKE E <i>Hymenaea longifolia</i> (FABACEAE:CAESALPINIOIDEAE)	21
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS CARACTERÍSTICAS	26
2.4	MICRO-ORGANISMOS EM ESTUDO	30
2.4.1	<i>Escherichia coli</i>	30
2.4.2	<i>Klebissella pneumoniae</i>.....	32
2.4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	33
2.4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.4.5	<i>Candida</i>	34
2.5	RESISTENCIA MICROBIANA.....	36
2.6	ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM MICRORGANISMOS CAUSADAS POR PRODUTOS NATURAIS.....	38
3	CHEMICAL COMPOSITION AND ATIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF <i>HYMENAEA</i> spp. (FABACEAE)	40
4	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICE A - DADOS NÃO APRESENTADOS NO ARTIGO	83
	ANEXOS A - NORMAS DA REVISTA	84

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são largamente utilizadas desde tempos imemoriais no tratamento e prevenção de doenças, tendo seu uso ficado conhecido pelo termo fitoterapia. Embora seja produzida uma larga escala de drogas para o tratamento de diversas patologias de origem bacteriana, o uso de fitoterápicos tem-se intensificado em diversos países, principalmente no Brasil, por possuir uma flora rica e diversas (SILVA et al., 2016).

A prática da antibioticoterapia em doses inferiores à que é sugerida em manuais terapêuticos, assim como as condições de higiene precárias, o aumento de pacientes com sistema imunológico comprometido e a lentidão para o diagnóstico das infecções bacterianas são fatores que favorecem o aumento da resistência microbiana não só nos hospitais, como também na comunidade, podendo atingir, inclusive, indivíduos saudáveis (FERREIRA et al., 2008).

Os micro-organismos são capazes de desenvolver vários mecanismos de resistência total ou parcial a diferentes classes terapêuticas de antimicrobianos. Nesse contexto, é preocupante o atual quadro de falta de sensibilidade microbiana aos antibióticos disponíveis, surgindo, pois, a importância de formas terapêuticas alternativas eficientes (TEXEIRA, 2016; OTAÍZA O'R, 2012).

Estudos *in vitro* destinados a determinar o potencial antimicrobiano da flora brasileira têm fornecido resultados satisfatórios (FERNANDES et al., 2007; GONÇALVES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2017; DE CASTRO et al., 2017), apesar de existir uma descontinuidade desses estudos e uma fragmentação dos resultados, o que dificulta, assim, avanços na área.

Hymenaea, pertencente a família da Fabaceae, é um gênero que se distribui por toda América tropical, com uma espécie também encontrada no litoral leste da África (SOUZA et al., 2014). As plantas desse gênero são comumente utilizadas na medicina tradicional para tratar várias infecções bacterianas e processos inflamatórios (BONIFACE et al., 2017; AGRA et al., 2007).

Diversos compostos bioativos (metabólitos secundários) provenientes do metabolismo primário são registrados para *Hymenaea*, dentre eles compostos fenólicos, alcaloides e terpenóides (BONIFACE et al., 2017). Os terpenóides são os principais componentes dos óleos essenciais e podem estar presentes na forma de monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides e triterpenóides (SIMÕES et al.,

2010). Estudos acerca de óleos essenciais em espécies de *Hymenaea* são escassos e focam apenas na sua composição química.

A complexa composição química dos óleos essenciais permite que expressem uma grande variedade de ações farmacológicas, sendo uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos à base de produtos naturais (SALES, 2014; AMARAL, 2004). A utilização de óleos essenciais como antimicrobiano é de suma importância, pois expressa vários mecanismos de ação conferidos pela sua composição química, dificultando as adaptações microbianas que levam a novas vias de resistência (SILVA et al., 2016; DAFERERA et al., 2003; SALES, 2014).

Diante da grande variedade de metabolitos secundários com propriedades farmacológicas presentes no gênero *Hymenaea*, algumas espécies são alvo de pesquisas quanto à sua composição química e à atividade biológica frente a micro-organismos patogênicos. Estudos fitoquímicos das espécies do gênero *Hymenaea* revelam a presença predominante de terpenos, flavonoides e taninos. A maioria dos trabalhos publicados relata a presença de terpenos, oligossacarídeos, polissacarídeos e sesquiterpenos isolados das sementes, folhas e óleo essencial de *H. coubaril* (BEZERRA, 2013; PEREIRA et al. 2007). Também há registros de flavonoides em *H. coubaril* var. *stilbocarpa*, diterpenos e sesquiterpenos em *H. stignocarpa* (AGUIAR et al., 2010; GIACOMINI et al. 2000; FERNANDES et al. 2005; GONCALVES et al. 2005).

Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi verificar a composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Hymenaea* ainda não relatadas na literatura (*Hymenaea eriogyne* Benth, *Hymenaea longifolia* (Benth) I.M.Souza, Funch & L.P.Queiroz e *Hymenaea rubriflora* Ducke) e avaliar alterações ultraestruturais sobre o potencial antimicrobiano em isolados clínicos de bactérias multirresistentes e leveduras de *Candida* spp.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Caracterizar os óleos essenciais de *Hymenaea* spp. e avaliar as alterações ultraestruturas sobre atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos de folhas de *Hymenaea eriogyne* Benth, *Hymenaea longifolia* (Benth) I.M.Souza, Funch & L.P.Queiroz e *Hymenaea rubriflora* Ducke.
- verificar a composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Hymenaea* ainda não relatadas na literatura (*Hymenaea eriogyne* Benth, *Hymenaea longifolia* (Benth) I.M.Souza, Funch & L.P.Queiroz e *Hymenaea rubriflora* Ducke) e avaliar alterações ultraestruturais sobre o potencial antimicrobiano em isolados clínicos de bactérias multirresistentes e leveduras de *Candida* spp.

1.2.2 Objetivos específicos

- Extrair, caracterizar e identificar os compostos químicos presentes nos óleos essenciais extraídos das folhas de *H. eriogyne*, *H. rubriflora* Ducke e *H. longifolia* por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectômetro de Massas (CG/EM).
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*.
- Determinar o potencial inibitório, bactericida e fungicida dos óleos essenciais.
- Investigar o sinergismo dos óleos essenciais em associação com o antibiótico e antifúngico padrão (gentamicina e fluconazol).
- Analisar as alterações estruturais provocadas nas cepas dos micro-organismos em estudo provenientes da exposição aos óleos essenciais por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de transmissão.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFICA

2.1 MATA ATLÂNTICA E CAATINGA

A Mata Atlântica ocupa uma remanescente de 102.012 km², 7,91% da área original do bioma no Brasil. É constituída, principalmente, por mata ao longo da costa litorânea que vai do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, abrangendo o território dos seguintes estados: Espírito Santo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Alagoas, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe. Constitui uma grande variedade de formações, englobando um diversificado conjunto de ecossistemas florestais com estrutura e composições florísticas bastante diferenciadas, acompanhando as características climáticas da região onde ocorre (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2017; IBF, 2017).

No nordeste brasileiro, registros apontam 2% de Mata atlântica, sendo em Pernambuco encontrados, aproximadamente, 1.839 fragmentos de Floresta Atlântica, em comum circundados por áreas abertas antropizadas ou agricultadas (BARBOSA et al., 2014). Pernambuco tem forte evidência por proporcionar um maior número de levantamentos quantitativos para as Florestas Atlânticas e índices pluviométricos que chegam a aproximadamente 1600 mm³ anuais (APAC, 2017).

A Mata Atlântica é considerada um dos cinco principais *hotspots*, com cerca de 20 mil espécies de plantas, 850 de aves, 370 de anfíbios, 200 de reptéis, 270 de mamíferos e 350 de peixes (MMA, 2018). A composição da Mata Atlântica distingue-se dos outros biomas por ser extremamente heterogênea (Figura 1). A floresta estende-se por uma grande área que apresenta zonas climáticas e formações vegetais diversificadas, que vão de tropicais à subtropicais, formando um conjunto de variáveis geográficas e climáticas que a tornam singular (SANTOS, 2014). Segundo a lei Nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006, as formações florestais que compõem a Mata Atlântica são: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Ombrófila Mista - Mata de Araucária, também conhecidas como Pinheiros-do-Paraná; Floresta Estacional Decidual; Floresta Estacional Semidecidual; Formações Pioneiras (Restinga, Manguezal, Campo Salino, vegetação com influencia fluvial ou lacustre); Campos de Altitude, Encraves de Cerrado e Zonas de tensão ecológica, o que proporciona a grande biodiversidade

reconhecida para o bioma (MMA,2017). Diversos estudos têm relatado a diversidade e importância das plantas medicinais em comunidades tradicionais que moram neste bioma (BEGOSSI et al.,2016; GAZZANEO et al., 2005; DI STASI et al., 2004; ALMEIDA et al.,2002).

FIGURA 1 – Características gerais de floresta de Domínio Atlântico



Fonte: Apremavi (2017)

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e predominante na região do Semiárido, abrigando fauna e flora endêmicas, podendo ser considerado patrimônio biológico de valor imensurável (DRUMOND et al., 2013). Ocupa uma área de cerca de 844.453 quilômetros quadrados, o equivalente a 11% do território nacional. Abrange os estados Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (MMA, 2017). Esse bioma possui uma rica biodiversidade, compreendendo 178 espécies de mamíferos, 591 de aves, 177 de répteis, 79 espécies de anfíbios, 241 de peixes e 221 abelhas (MMA, 2017).

Com precipitações anuais de 500 milímetros, temperaturas variando de 26°C a 28°C e períodos de chuvas concentradas em três a quatro meses (seguidas de longos períodos de estiagem de oito a nove meses), a vegetação da Caatinga caracteriza-se por apresentar três estratos distintos, a saber: herbáceas, arbustivas

e arbóreas de pequeno porte (com espécies xerófilas e caducifólias), nos períodos de estiagem (Figura 2), e forrageiro, no período chuvoso (MACIEL, 2016; SILVA, 2016; NUNES et al., 2015; ARAÚJO FILHO, 2013; MAIA, 2004).

FIGURA 2 – Parque Nacional do Vale do Catimbau, área de predominância de vegetação de Caatinga



Fonte: Paloma M. Silva (2017)

Essas diferentes fitofisionomias da Caatinga são oriundas das adaptações às variações climáticas, restrições hídricas, alta insolação, grandes oscilações diárias de temperatura, composições florísticas e ação indireta ou direta do homem (ARCOVERDE et al., 2014; ARAÚJO, 2013).

A Caatinga tem um imenso potencial para bioprospecção que, se bem explorado, será decisivo para o desenvolvimento da região e do país. A biodiversidade da Caatinga ampara diversas atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (MMA, 2017). Diversos estudos etnobotânicos têm relatado o uso medicinal das plantas da Caatinga como alternativa no tratamento de doenças (SILVA et al., 2015; CARTAXO et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007), bem como a comprovação com cunho científico da indicação popular (COSTA et al., 2017; DE BRUN VIEIRA et al., 2017; ARAÚJO et

al., 2014; FRACASSO et al., 2012; TRENTIN et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2007).

2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE *HYMENAEA* SPP.: *Hymenaea eriogyne* BENTH, *Hymenaea rubriflora* DUCKE E *Hymenaea longifolia* (FABACEAE: CAESALPINIOIDEAE)

Fabaceae (APG IV, 2016) é a terceira maior família de angiospermas, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies, distribuídas mundialmente. Ocorre na maioria das formações vegetais e regiões florísticas do mundo (CHASE et al. 2016; LEWIS et al., 2015), sendo estimado no Brasil 222 gêneros (15 endêmicos) e 2.807 espécies catalogadas, das quais 15 gêneros e 1.508 espécies são endêmicas (LIMA et al., 2015).

De acordo com o sistema de classificação mais moderno, as famílias *Caesalpinaceae*, *Mimosaceae* e *Fabaceae* (ou *Papilionaceae*) foram agrupadas em uma única família denominada como *Fabaceae* (APG IV, 2016). Das espécies pertencentes à subfamília *Casalpinioideae*, encontra-se o gênero *Hymenaea*, popularmente conhecido por “Jatobá, Jatobá vermelho, Jatobá do cerrado ou juntai”, sendo distribuído por toda América Tropical, do sul do México ao Paraguai, com espécies na costa leste africana (CIPRIANO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

O gênero *Hymenaea* está representado pelas seguintes espécies: *Hymenaea altíssima* Ducke, *Hymenaea aurea* Lee & Langenh., *Hymenaea courbaril* L., *Hymenaea eriogyne* Benth., *Hymenaea fariana*, *Hymenaea intermedia* Ducke, *Hymenaea longifolia*, *Hymenaea maranhensis*, *Hymenaea martiana* Hayne, *Hymenaea oblongifolia* Huber, *Hymenaea parvifolia* Huber, *Hymenaea reticulata* Ducke, *Hymenaea rubriflora* Ducke, *Hymenaea stigonocarpa* Mart., *Hymenaea velutina* Ducke (PINTO et al., 2018).

Hymenaea eriogyne Benth é uma espécie de 1,5 a 12 metros de altura encontrada em regiões com predominância de vegetações de Caatinga e Cerrado, com períodos de floração e frutificação de outubro a março e de dezembro a outubro, respectivamente (SOUZA et al., 2016). Endêmica do Brasil, é encontrada, principalmente, nos Estados da Bahia, Ceara, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Goiás, Minas Gerais e Tocantins (PINTO et al., 2018). Essa espécie é reconhecida por apresentar folhas com folíolos coriáceos, ramos, folhas e frutos

glabros ou indumentados, curtos ou moderadamente longos, inflorescência cimeira dicasial, flores com botão floral dourado e pétalas brancas, frutos amarelados e sementes castanha escuras (Figura3) (PINTO et al., 2018; SOUZA et al., 2016).

FIGURA 3 – Espécie *Hymenaea eriogyne* BENTH: (A) aspectos gerais; (B) frutos



Fonte: Giovane Marques (2018); Autor (2016)

A espécie *Hymenaea rubriflora* Ducke é endêmica do Brasil, com ocorrência na Região Nordeste entre os estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, com predominância em áreas em fitofisionomia de Mata Atlântica (PINTO et al., 2017). É facilmente reconhecida em relação as demais espécies de jatobá por apresentar flores vermelhas, sendo popularmente chamada de “Jatobá vermelho” (LIMA, 2007). É um arbustivo de 4 a 6 metros de altura, com frutos farináceos comestíveis com comprimento de 6 a 18 cm e diâmetro de 3 a 6 cm. Possui as seguintes especificações: folha composta, bifoliolada, folíolo glabro, oblongo ou obovado, falcado, ápice levemente cuspidado, margem inteira, base assimétrica, glabra, coriácea. Inflorescência termina, panícula, corimbosa. Botões obovados. Flores pediceladas, monoicas, vermelha ou rosa, grandes; sépalas 5, imbricadas, ovadas, concavas, caducas, verdes com variação vinácea; pétalas 5, brancas, imbricadas, ovadas, concavas, crassas; androceu 10 estames, filetes longos, anteras elípticas, dorsifixas, rimosas; gineceu estipitado, ovário plano, vermelho, estilete longo e estigma globoso (BFG, 2015; PINTO et al., 2015). (Figura 4).

FIGURA 4 – Espécie *Hymenaea rubriflora* DUCKE: (A) aspectos gerais; (B) inflorescência; (C) frutos.



Fonte: Autor (2017)

A *Hymenaea longifolia* é uma espécie encontrada em florestas sazonalmente secas, entre os domínios fitogeográficos de Caatinga e Cerrado na Região Nordeste, abrangendo os Estado de Ceará, Pernambuco e Bahia (PINTO et al., 2018). É uma árvore de 7 a 18 metros de altura, com grandes folhetos elípticos ou oblongos, inflorescência cimeiras dicasial, flores com botões acinzentados e pétalas brancas, frutos normalmente sem constrições entre as sementes, com superfície opaca (SOUZA et al.,2016; SOUZA et al., 2014).

FIGURA 5- *Hymenaea longifolia*: (A) aspectos gerais; (B) fruto.



Fonte: Jose Alfredo Morales (2016); Autor (2016)

A grande variedade de metabolitos secundários com propriedades farmacológicas presentes no gênero *Hymenaea* torna suas espécies alvo de muitas pesquisas quanto à sua composição química e à atividade biológica, como observado na Tabela 1.

TABELA 1 – Atividade biológicas relatadas na literatura para *Hymenaea* spp.

ATIVIDADES	ESPÉCIES	REFERENCIAS
Antibacteriana	<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	(GARCIA et al., 2011)
	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(DIMECH et al., 2013; LIMA, 2011)
	<i>Hymenaea courbaril</i>	(SALES, 2014)
Antifúngico	<i>Hymenaea martiana</i>	(De SOUZA et al., 2010)
	<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i> ,	(COSTA et al., 2017)
Antiviral	<i>Hymenaea courbaril</i>	(CECÍLIO et al., 2012)
Antimitótico	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(SANTANA et al., 2016)
Antimultagênico	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(SANTANA et al., 2016)
Antioxidante	<i>Hymenaea courbaril</i>	(IMAI et al., 2008)
	<i>Hymenaea martiana</i>	(SILVA et al., 2012)
	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(MARANHÃO et al., 2013)
Antiproliferativa	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(LACERDA et al., 2014)
	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(MONTEIRO, 2014)
Antileishmanicida	<i>Hymenaea courbaril</i>	(RIBEIRO et al., 2014)
Antiulcerativo	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(ORSI et al., 2012)
Cicatrizante	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	(LIMA, 2011)
Larvicida	<i>Hymenaea courbaril</i> L	(AGUIAR et al., 2010)
Miorelaxante	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	(BEZERRA et al., 2013)

Estudos fitoquímicos das espécies do gênero *Hymenaea* revelam a presença predominante de terpenos, flavonoides e taninos. A maioria dos trabalhos publicados relata a presença de terpenos, oligossacarídeos, polissacarídeos e sesquiterpenos isolados das sementes, folhas e óleo essencial de *H. coubaril* (Bezerra, 2013; Pereira *et al.* 2017). Também há registros de flavonoides em *H. coubaril* var. *stilbocarpa*, diterpenos e sesquiterpenos em *H. stagnocarpa* (GIACOMINI *et al.* 2000; FERNANDES *et al.* 2005; GONCALVES *et al.* 2005).

Segundo dados apresentados por Sales (2014), 23 componentes majoritários foram isolados do óleo essencial, obtido a partir das cascas dos frutos de *H. coubaril* L., revelando um estreito espectro de ação antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Mercês (2015) investigou a variabilidade na constituição química de óleos essenciais das folhas de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* definido como compostos majoritários: óxido de cariofileno, β -cariofileno e junipene. Da mesma forma, Costa *et al.* (2017) caracterizaram o óleo essencial de *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* obtido a partir de folhas e identificaram o óxido cariofileno e trans-cariofileno com compostos majoritários.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, lipofílicos biosintetizados por plantas aromáticas. Podem ser obtidos por processos físicos como hidrodestilação, destilação por arraste com vapor, destilação a pressão reduzida (FALEIRO *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2010).

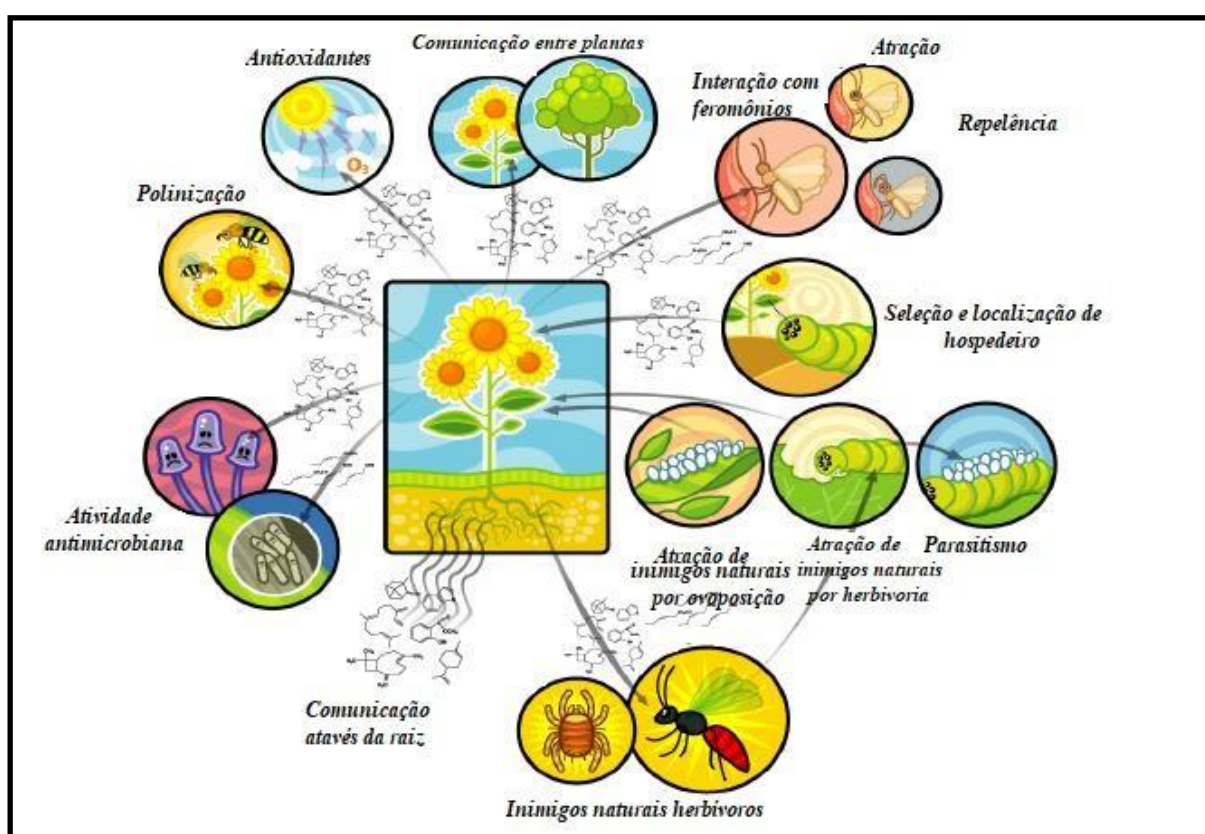
Os termos óleos voláteis, óleos éteros e essências também podem ser utilizados devido a suas características físico-químicas inerentes a essas misturas, tais como a solubilidade em solventes orgânicos (entre eles o éter), apresentam-se líquidos com aspecto oleoso a temperatura ambiente, menor densidade que a água e, em sua maioria, com um acentuado aroma agradável (SIMÕES *et al.*, 2010). Conjuntamente, são incolores e levemente amarelados, instáveis na presença de luz, oxigênio atmosférico e metais, sofrendo degradação, ciclizações, dimerizações, oxidações e polimerização (DUSSAULT *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais são frequentemente produzidos por angiospermas dicotiledôneas e esporadicamente por gimnospermas (SIMÕES *et al.*, 2010). Podem ser sintetizados por diversas partes das plantas, como folhas, caules, sementes,

frutas, raízes, flores ou cascas, sendo armazenada em células secretoras, células epidérmicas e tricomas glandulares (FALEIRO et al., 2013). Desempenham algumas funções ecológicas para as plantas, agindo como inibidores de germinação, atração de polinizadores e conferindo proteção contra predadores, atuando como inseticidas, antibacterianos, antivirais, antifúngicos, e também contra herbívoros por redução do apetite (Figura 6) (FERREIRA, 2013; SIMÕES et al., 2010; BAKKALI et al., 2008).

São provenientes do metabolismo secundário da planta e, em sua maioria, compostos de dois grandes grupos de origens bioenergética distintas: terpenoides e fenilpropanoides. Todavia, tal composição, assim como o rendimento, são determinados por fatores de variação genética, variação sazonal, localização geográfica e maturidade da espécie (HUSSAIN et al., 2011).

FIGURA 6 – Funções dos óleos essenciais nas plantas

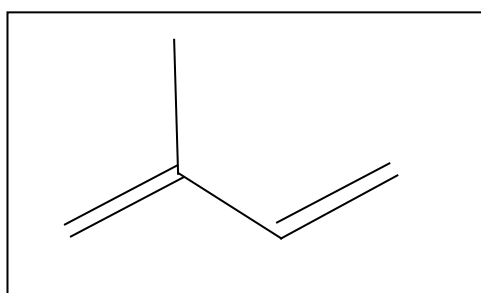


Fonte: Loiza e Céspedes (2007).

Os terpenóides constituem um grupo diversificado de substâncias, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética é o isopreno - 2-metil-1,3-butadieno (Figura 7) (SIMÕES et al., 2010). São sintetizados a

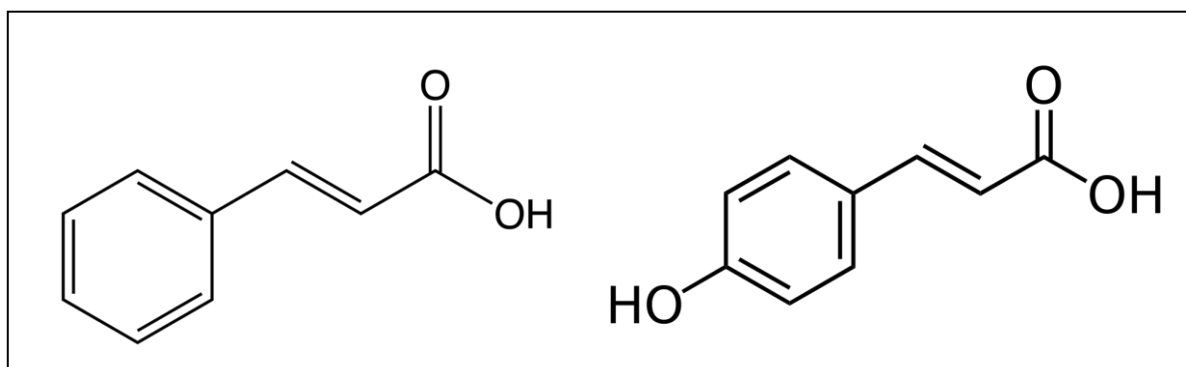
partir do IPP (isopentenil-pirofosfato) e de seu isômero DMAPP (dimetilalil pirofosfato) por duas rotas biossintéticas distintas: a rota do ácido melavônico, que se inicia a partir da ligação de três moléculas de acetil-CoA para formar este ácido e, posteriormente, o IPP (isopentenil-pirofosfato), o qual originará terpenos maiores; e a rota do DXP (1-desoxilulose 5-fosfato), em que o gliceraldeído 3-fosfato e piruvato levam à formação do isopentenil-pirofosfato (IPP) e diferentes terpenos (FELIPE e BICAS, 2017; TAIZ e ZEIGER, 2013). No entanto, a estrutura básica dos terpenos pode ser modificada por reduções, oxidações e ciclizações para biossíntese dos mais diversos terpenóides. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são monoterpenos com C10 e sesquiterpenos com C15 (SIMÕES et al., 2010).

FIGURA 7 - Estrutura Química do isopreno



Fonte:Autor (2018)

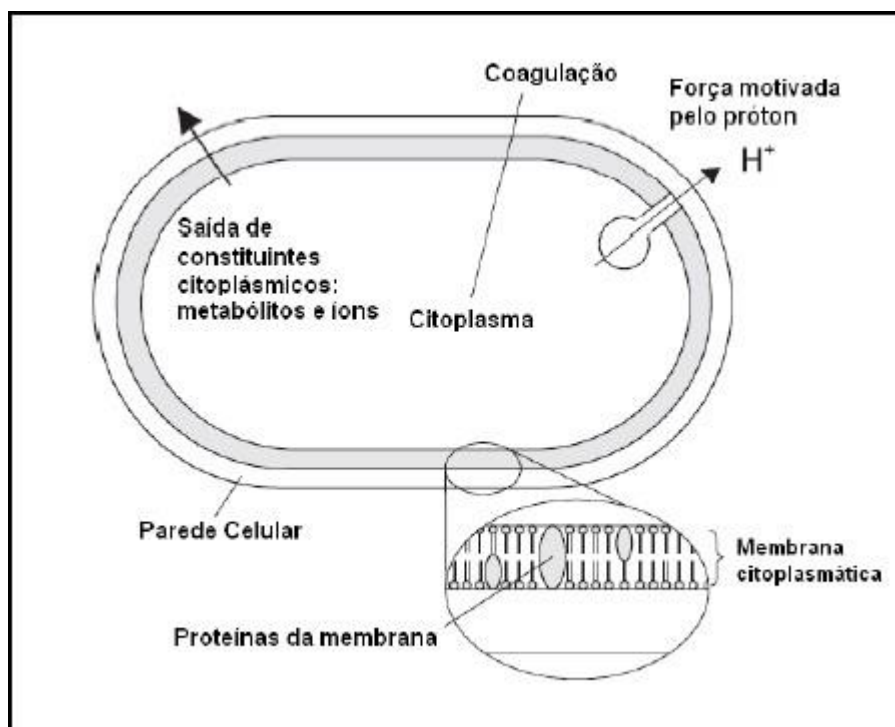
Os fenilpropanoides são compostos aromáticos sintetizados a partir do ácido chiquímico, constituindo unidades menores de ácido cinâmico e ácido p-cúmarico (Figura 8). O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: fosfoenopiruvato e a eritrose-4-fosfato, e por várias reações é convertido nos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Estes, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (é ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário), perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico (SIMÕES et al., 2010; TAIZ e ZEIGER, 2013). Os fenilpropanoides são menos abundantes nos óleos essenciais quando relacionados aos terpenóides; caracterizam-se por possuírem em suas estruturas um anel benzênico com cadeia lateral composta de três carbonos que apresentam uma dupla ligação, podendo ter um grupo funcional com oxigênio (SANTOS, 2010).

FIGURA 8 – Estrutura Química do ácido cinâmico (1) e ácido *p*-cumárico

Fonte: Simões et al. (2015)

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para óleos essenciais devido a sua composição química complexa, como a antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antinocepcivo, anti-inflamatória, antitumoral, antiulcerogênica e cicatrizante (COELHO et al., 2013; COSTA et al., 2017; BATISTA et al., 2012; CALDAS et al., 2013; LEMES et al., 2017; MIRANDA et al., 2016). Dentre estas, a atividade antimicrobiana tem se destacado e impulsionado pesquisadores a investigarem esses compostos naturais, em virtude da sua variada composição possibilitar inúmeros mecanismos de ação simultâneos sobre a célula microbiana (SALES, 2014). Todavia, os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não são bem elucidados. Sabe-se que o principal já descrito está relacionado com a sua alta penetrabilidade na membrana citoplasmática, ocasionando seu rompimento e aumentando sua permeabilidade não específica, gerando, desta forma, um extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da bactéria (Figura - 9) (DEVI et al., 2010). De acordo com as observações de Carson et al. (1995), o mecanismo consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, com consequente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração.

FIGURA 9 – Esquema proposto para vias de atuação dos óleos essenciais frente a células bacterianas.



Fonte: Adaptado de BURT (2004)

2.4 MICRO-ORGANISMOS EM ESTUDO

2.4.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é constituído por bacilos Gram-negativos, não-esporulados, capazes de fermentar lactose ou glicose com produção de ácido e gás. Pertence à família *Enterobacteriaceae* e constitui parte da microbiota intestinal de animais homeotérmicos (JAY, 2015; TRABULSI et. al., 2015). *Escherichia coli* é um conhecido microbiota intestinal que pode colonizar o microbioma vaginal, geralmente sem sintomas. No entanto, *E. coli* também pode ser um agente patogénico altamente virulento e frequentemente mortal (COOLS, 2017). Essas bactérias apresentam uma diversidade de sorotipos constituídos por três sítios antigénicos: somáticos O (relacionado com polissacarídeos da membrana externa), capsular K (relacionado com polissacarídeos capsulares) e flagelar H (relacionado com as proteínas dos flagelos (JAY, 2015). Encontram-se descritos cerca de 173 antígenos do tipo O, 56 antígenos H e 100 antígenos K. Em se tratando de *Escherichia coli*, faz-se necessária a determinação sorológica, visto que seus sorovares não podem

ser diferenciados apenas por provas bioquímicas (TRABULSI et. al., 2015; MADIGAN et al., 2016).

De acordo com a classificação sorológica e os mecanismos de virulência, as linhagens de *Eschechia coli* são distinguidas em cinco grupos: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* entero- hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogenica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (JAY, 2015).

As linhagens de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) são consideradas patógenos emergentes por estarem envolvidas com diversos casos de diarreia aguda. Apresentam característica exclusiva de aderência agregativa às células HEp-2 (células epiteliais de origem epifaríngea), (BLANCO, 2012).

O grupo das *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) é considerado o mais importante em infecções alimentares. Caracterizam-se pela produção de toxinas semelhantes à toxina Shiga, produzida pela espécie *Shingella dysenteriae* e não conseguem se multiplicar nas temperaturas normalmente empregadas para pesquisa de *E. coli* em alimentos (44,5/45,5°C) (MADIGAN et al., 2016). Essas linhagens de *E. coli* habitam o intestino de uma grande variedade de animais, sendo seu principal reservatório os ruminantes. As toxinas produzidas pelas EHEC são identificadas pelas terminações Stx1 e Stx2, ambas são citotóxicas as células Vero e estão envolvidas em casos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (JAY, 2015). No entanto outros sorovares podem ser citados, O26, O103, O111 e O145 (TRABULSI et. al, 2015).

O grupo das *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) distingue-se pela capacidade de invadir as células do cólon do homem, multiplicando-se e espalhando-se pelas células adjacentes, ocasionando ulcerações que acarretam diarreias sanguinolentas. Cresce bem em meios não seletivos, sendo apenas um sorotipo capaz de descarboxilar a lisina, o O124: H30 (MADIGAN et al., 2016).

As *Escherichia coli* enteropatogenica (EPEC) são as principais causadoras de diarreias em crianças com menos de um ano de idade. Visto como um problema para Saúde Pública, este grupo é responsável pelos acentuados casos de infecções hospitalares em países subdesenvolvidos, como o Brasil (NUNES et al., 2017).

2.4.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae são bactérias da microbiota normal do intestino, frequentemente isoladas e consideradas como causa de infecções hospitalares. São bacilos Gram-negativos com 0.6 a 6.0 micrometros de diâmetro, imóveis, não esporulados, fermentadores de lactose com produção de ácidos, que apresentam colônias mucoides com consistência viscosa em meios de seleção primária (MADIGAN et al., 2016).

Algumas linhagens de *K. pneumoniae* são frequentemente encontradas como contaminantes de dietas enterais, sendo uma das causas mais comuns de sepse causada por Gram-negativos, estando associada com altas taxas de morbidade e mortalidade (JAY, 2015; TORTORA, 2015). Em alguns casos, reporta-se como oportunista em pacientes hospitalizados imunocomprometidos (KONEMAN et al., 2011).

Para Trabulsi et al. (2015), as graves infecções reportadas de *K. pneumoniae* estão relacionadas à facilidade dessa espécie na aquisição de plasmídeos de multirresistência nos processos de conjugação, que permitem o surgimento de resistência a diferentes compostos antimicrobianos, como os β -lactâmicos, um enorme problema de Saúde Pública (CUERVO et al., 2014). As linhagens de *K. pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase, por exemplo, possuem resistência a até 95% dos antimicrobianos difundidos no mercado farmacêutico, sendo que uma de suas principais formas de impedir a ação dos antibióticos está na produção de β -lactamases de espectro estendido-ESBL (BRADFORD, 2011; SPANU et al., 2002). Linhagens produtoras de ESBL apresentam resistência aos antimicrobianos, como aminoglicosídeos, cefalosporinas, penicilinas e quinolonas (BRADFORD, 2011; SPANU et al., 2002).

Também são reiterados registros de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases tipo AmpC (LIU et al, 2017) e ArmA (UECHI et al., 2018), produção de carbapenemases, do tipo metalo- β -lactamases MBL (NEPAL et al., 2017) e carbapenemases tipo KPC (ZURITA et al., 2013).

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosas*

As bactérias de *Pseudomonas* spp. pertencem à família Pseudomonadaceae. São bacilos Gram-negativos, retos ou ligeiramente curvados, com 0,5 micrometros de diâmetro, não fermentadores nem formadores de esporos (VILA; MARCO, 2002). O gênero *Pseudomonas* possui mais de 140 espécies, distribuídas em cinco grupos, e sua taxonomia tem sido baseada na utilização de análises de sequências dos genes 16S de RNA ribossomal (rRNA) (TYLER et al., 1995; ANZAI et al., 2000).

Pseudomonas aeruginosa é um dos mais importantes agentes de infecções relacionados à Saúde Pública. Frequentemente, estão associadas a patologias em pacientes com doença de base grave, como o câncer, doença renal crônica, diabetes, doenças cardíacas, neurológicas e pulmonares, sendo o patógeno mais comum associado a casos de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (SILVA-FILHO et al., 2013). Sintetiza várias substâncias consideradas responsáveis pela sua virulência e patogenicidade, tais como: fosfolipase C, alginato, exotoxina A, enterotoxina elastase, exoenzima S, neuraminidase, piocianina, lipopolissacarídeo (LPS), leucocidina e estruturas como os pilis (ALVES, 2013). Dentre os fatores de virulência, a produção de alginato é, em última instância, responsável pelo mau prognóstico e pelas altas taxas de mortalidade entre os pacientes com fibrose cística (NOUÉR, et al., 2005; JELSBK, et al., 2007).

2.4.4 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, com 0,5 a 1,5 um de diâmetro, pertencentes à família Micrococcaceae, que tendem a se agrupar semelhante a cachos de uva, devido à sua divisão ocorrer de maneira aleatória e em vários planos (MADINGAN, 2015). São imóveis e suas colônias são relativamente grandes, com diâmetro de 1 a 2 mm. As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (SILVA, 2016). O gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 30 espécies, apresentando interesse potencial em microbiologia clínica as seguintes: *S.aureus* MRSA, *S. aures* OXA e *S.epidermidis*, sendo *Staphylococcus aureus* o mais importante por esta envolvido com inúmeros casos de infecções cutâneas, ósseas, artrites sépticas e infecções de prótese ósseas em humanos

(JAY, 2015). Os *Staphylococcus aureus* são mesófilos, anaeróbicos facultativos, produtores de toxinas, tais como a α -toxina, γ -toxina e estafiloquinase (TORTORA et al., 2015; MURRAY et al., 2015).

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes à antimicrobianos, como a penicilina, por exemplo, foi detectado logo após o início de seu uso na década de 40, sendo mediada pela obtenção de genes que codificam enzimas, inicialmente denominada penicilinasas e agora chamada de β -lactamases (ANVISA, 2016). Na década de 1950, a produção de β -lactamases pelo *S. aureus* passou a prevalecer nas cepas isoladas de pacientes hospitalizados. Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de β -lactamases, uma vez que esse antibiótico não sofre ação dessa enzima. Contudo, em 1961, cepas resistentes à meticilina foram isoladas. *S. aureus* tornou-se, então, a espécie bacteriana de maior importância entre os estafilococos por sua importância e prevalência como agente etiológico de infecções hospitalares e, especificamente, em função das cepas resistentes à penicilina (BRADFORD, 2011; FARIA et al., 2011). *S. aureus* também apresentam uma alta capacidade de formar biofilmes, sendo considerado um grande fator de virulência que influencia a sobrevivência e persistência desse micro-organismo no ambiente e no hospedeiro. A formação de biofilmes em *S. aureus* é mais frequentemente associada à produção e adesão de polissacarídeos intercelular por enzimas codificadas por *operon ica* (TORLAK et al., 2017; PERIASAMY et al., 2012).

2.4.5 *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida*, pertencente à família Saccharomycetaceae, são polimorfos, com ciclo sexual incompleto, e incluem aproximadamente 150 espécies, das quais cerca de 20 foram descritas como agentes etiológicos das candidíases, podendo ser oportunistas ou patogênicos (NOBRE et al., 2002). São de grande importância médica para o homem por causarem infecções superficiais, como doenças de pele e mucosa, ou em tecidos mais profundos (VAL & ALMEIDA FILHO, 2001; CROCCO et al., 2004). A forma sistêmica pode alcançar diversos órgãos, causando candidíase pulmonar e endocardite, dentre outros, podendo levar os pacientes a óbito (MENEZES et al., 2008).

Do ponto de vista clínico, as espécies de *Candida* mais importantes são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, e *Candida krusei*, permanecendo a *C. albicans* como a espécie mais comum nas infecções humanas (VIEIRA; SANTOS, 2016). Recentemente, outra espécie patogênica vem se destacando por apresentar resistência aos antifúngicos disponíveis, sendo esta a *Candida auris* (LOCKHART et al., 2017).

Candida albicans é um fungo polimórfico responsável por uma série de doenças, principalmente em pessoas com deficiência sistema imunológico (pacientes transplantados, com câncer ou com HIV). Pode crescer como células de levedura, pseudo-hifas e hifas; esse dimorfismo é necessário para virulência total (WOHLMEISTER et al., 2017). Candidíase oral ocorre como resultado do crescimento excessivo de células da microflora residente (MANGUEIRA et al., 2010). Em contrapartida, as infecções vaginais geralmente ocorrem em indivíduos sem defeitos imunes evidentes. Células de *C. albicans* colonizam diversos tecidos humanos e podem aderir a próteses, levando à formação de biofilmes, o que facilita ainda mais a infecção e a resistência a antifúngicos. A produção de hidrolases também está relacionada a patogenicidade de *C. albicans* (FALEIRO et al., 2013).

Candida tropicalis é um organismo comensal do trato gastrointestinal que, em condições favoráveis, atua como oportunistas, podendo causar inflamações na mucosa gastrointestinal, ocasionando em infecções disseminadas (GROSSET et al., 2016). Frequentemente, estão associados a patologias em pacientes com leucemia aguda e recém transplantados de medula óssea (TREVINO-RANGEL et al., 2017).

Candida glabrata também é um organismo comensal. A principal característica indicativa de infecção por *C. glabrata* é a febre alta e hipotensão, imitando choque endotóxico de bactérias. Fatores como adesinas, plasticidade do genoma, mudança fenotípica e formação de biofilmes são considerados responsáveis pela patogenicidade desta espécie (FALEIRO et al., 2013; NG et al., 2016).

Já *Candida parapsilosis*, esta pode ser encontrada nas mãos de profissionais de saúde, o que, naturalmente, aumenta o risco de se adquirir a referida infecção dentro dos hospitais. Isso induz graves complicações e traz uma alta taxa de mortalidade. Unicamente entre todas as espécies de *Candida*, foi demonstrado que formam grupos de biofilmes em válvulas protéticas (ESTIVILL et al., 2011). É

também a principal causa de candidemia em unidades de cuidados intensivos de neonatos (FALEIRO et al., 2013).

2.5 RESISTÊNCIA MICROBIANA

O grande marco histórico no tratamento de doenças infecciosas é atribuído à descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, por apresentar uma ação superior à das sulfonamidas. A demonstração de que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010). As recorrentes mazelas acometidas na população durante a Segunda Guerra Mundial levaram à escolha da penicilina como fármaco de primeira escolha para tratar as enfermidades bacterianas. Em contrapartida, surgem na década de 70 as primeiras linhagens de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilinas (GELATTI et al., 2009). Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinase, uma vez que a referida droga não sofre ação da enzima em questão. Porém, já em 1961, relatos de cepas também resistentes à meticilina foram identificados e o denominado *Staphylococcus aureus* MRSA (ANVISA, 2017).

A resistência antimicrobiana é um dos principais focos de investigação científica, configurando-se em um grande problema de Saúde Pública. Ainda que o surgimento de microrganismos resistentes seja um fenômeno natural, a seleção é conduzida por um uso excessivo ou inadequado de antimicrobianos nas áreas de cuidados de saúde e cenários agrícolas (SANTANA et al., 2014). Com a perspectiva iminente de que antimicrobianos atuais já não sejam eficazes, é de suma importância entender os mecanismos de resistência de micro-organismos multirresistentes, como bactérias, fungos e parasitas, bem como o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater infecções resistentes a fármacos convencionais (SOMMER et al., 2017).

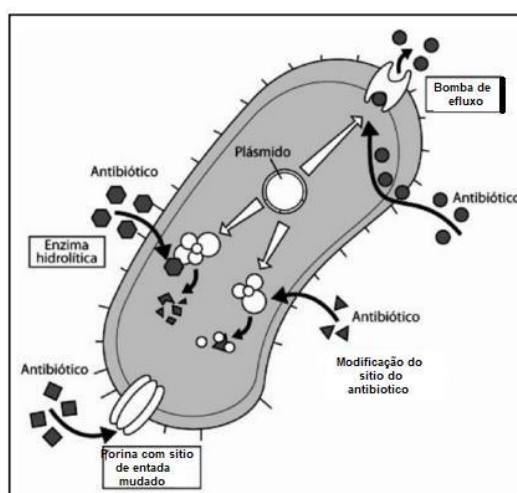
Entende-se por resistência microbiana a capacidade de o micro-organismo sobreviver na presença do antimicrobiano em concentrações usuais da antibiocoterapia. Essa característica pode ser intrínseca do micro-organismo, fazendo parte das heranças genéticas primitivas observadas frequentemente em determinadas linhagens, resultantes de genes cromossômicos que codificam

nessas células estruturas ou mecanismos capazes de bloquear o sítio de ação do composto, impedindo que atue no receptor específico ou determine receptores inadequados (VERMELHO;BASTOS, 2007; TORTORA et al.,2015). Por outro lado, a resistência pode ser adquirida, por via de transferência horizontal de genes por mecanismos de tradução, entendida pela transferência de material genético entre bactérias por meio de um bacteriófago, que é um vírus que se replica em bactérias, atuando como vetor na transferência de genes entre elas transformação ou conjugação, mediadas por genes em transposons e plasmídeos (GYLES 2014).

Para Murray et al. (2015), há muitas formas de resistência que podem impedir a ação de antimicrobianos. Normalmente, os fármacos atuam inibem processos essenciais para a multiplicação e sobrevivência da célula bacteriana, alterando a membrana citoplasmática, a síntese de proteínas, os ácidos nucleicos e a parede celular.

Diversos mecanismos de resistências são característicos de cada grupo ou espécie de micro-organismo em específico. Didaticamente, são relatados quatro mecanismos de resistência a antimicrobianos em bactérias (Figura 10), sendo estes: alterações de permeabilidade de membrana, bomba de efluxo, alterações e mecanismo enzimático (MORENO et al., 2009; ASANTE, 2017).

FIGURA 10 – Mecanismo de resistência a antimicrobianos



Fonte: (MORENO et al., 2009)

2.6 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM MICRORGANISMOS CAUSADAS POR PRODUTOS NATURAIS

Nos últimos anos, a microscopia eletrônica vem contribuindo significativamente para o deslinde dos mecanismos de ação de compostos com atividades antimicrobianas. Em relação aos produtos obtidos a partir de plantas (dentre estes, óleos essenciais, extratos e seus isolados), serão apresentados, na sequência, alguns trabalhos que permitem vislumbrar a potencialidade desta técnica. Com o microscópio eletrônico de varredura, Cavalcante et al., (2017) examinaram isolados clínicos de *Candida albicans*, submetidas a exposição de uma concentração de $\frac{1}{2}$ do MIC de extrato metanólico de *Buchenavia tetraphylla* por 12h.

Foram observadas depressões citoplasmáticas e morfologia blastoconidial mais alongadas e com cicatrizes em comparação com as amostras controle.

Em 2014, Li Li e colaboradores comprovaram a atividade antibacteriana de alpha terpenol de *Cinnamomum longepaniculatum* sobre cepas *Escherichia coli* (CMCC(B) 44102). A partir de imagens em microscopia eletrônica, avaliadas em tempos de 2h e 4h de exposição ao óleo, foram observadas células irregulares durante a divisão celular, citoplasma condensado, perda de material citoplasmático, retração citoplasmática e vacuolização das células.

Em um estudo realizado por Dimech et al., (2013) por meio do microscópio eletrônico de transmissão, observaram-se alterações citológicas em *Staphylococcus aureus* tratados com $\frac{1}{2}$ MIC de extrato hidroalcólico de *Hymenaea stigonocarpa*. Tais alterações incluíram fragmentos de parede celular, septos anormais, disfunções durante a divisão celular exposição de retrações de membrana, ausência de parede celular, liberação de materiais celulares no citoplasma e alterações em componentes intracelulares.

Silva e colaboradores (2013) utilizaram o microscópio eletrônico de varredura e microscópio eletrônico de transmissão para comprovar a atividade antimicrobiana de extratos de *Anadenanthera colubrina* (ACHE), *Libidibia ferrea* (LFHE) and *Pityrocarpa moniliformis* (PMHE) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. A partir das imagens geradas pelo MEV, foram observadas alterações na superfície das células como a formação de bolhas, perfurações na parede celular, aumento considerável do volume celular e inibição de formação de biofilmes. Com a microscopia eletrônica de transmissão, alterações morfológicas foram relatadas,

como desprendimento da parede celular, descontinuidade dos perfis membranosos, alterações no processo de divisão celular e ausência completa de septos.

Tian et al. (2012), para dilucidar o modo de ação do óleo essencial de *Cinnamomum jenseniam* no controle de *Aspergillus flavus*, observaram mediante microscópio eletrônico de transmissão as mudanças na ultraestrutura do micélio submetido ao óleo. As principais alterações evidenciadas foram: o plasmela tornou-se áspero e com dobras contínuas no citoplasma, com a formação de lomassomos, destacando-se a vacuolização do citoplasma e o desprendimento da membrana plasmática da parede celular. Do mesmo modo, o óleo promoveu a redução da matriz citoplasmática e algumas mitocôndrias sofreram rompimento da estrutura interna com diminuição da crista e completa lise celular.

A microscopia eletrônica também foi usada por Pajohi et al, (2011) para avaliar os efeitos do óleo essencial de *Menha longifolia* L e sinergismo com Nisin sobre cepas de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. Dentre as alterações observadas, verificou-se a destruição e desintegração da estrutura celular, com extravasamento do conteúdo citoplasmático nas cepas de *Bacillus cereus* e completa perda da integridade da parede celular em *Bacillus subtilis*.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *HYMENAEA* SPP. (FABACEAE)

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *HYMENAEA* SPP. (FABACEAE)

Graziela Claudia da Silva^a, Alexandre Gomes da Silva^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Dyana Leal Veras Diniz ^{c, d}, Fábio André Brayner dos Santos ^{c, d}, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^b, Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a

^a Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Avenida Jornalista Aníbal Fernandes, s/no, Cidade Universitária, CEP 50740-560 Recife, PE, Brasil.

^c Departamento de Parasitologia – Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhaes/ CPqAM-FIOCRUZ-Brasil.

^d setor de Microscopia eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE- Brasil.

Autor correspondente: grazielaclaudiabio@gmail.com (GC, Silva), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. Fone/Fax: +55 (081) 2126-8576.

RESUMO

Os óleos essenciais das folhas de *H. rubriflora* Ducke, *H. eriogyne* e *H. longifolia* foram extraídos por hidrodestilação e sua composição química definida por Cromatografia Gasosa. No total, foram identificados 32 compostos no óleo essencial de *H. longifolia*, 41 compostos no óleo essencial de *H. eriogyne* e 46 compostos no óleo essencial de *H. rubriflora* Ducke. Os compostos E-caryophyllene, α -selinene, γ -Murolene foram identificados nos óleos essenciais de *H. eriogyne* e *H. longifolia*. E os compostos germacrene-D, E-caryophyllene, α -humulene e β -elemene estavam presentes em maiores percentuais no óleo de *H. rubriflora* Ducke. Todos os óleos mostraram atividade fungicida, bactericida e bacteriostática frente às cepas de *Candida* spp., *S. aureus* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Nos testes de interação sinérgica, os óleos foram capazes de reduzir os MIC dos antibióticos com valores significantes. A baixa atividade de hemolítica em células sanguíneas humana sugere a segurança dos óleos. As observações em microscopia eletrônica de varredura verificaram alterações morfológicas nas cepas de *K. pneumoniae* e *Candida albicans*. Associados aos resultados dos ensaios de cristal violeta e absorção de UV a 260nm, sugere que o modo de ação do óleo de *H. rubriflora* Ducke esteja relacionado a alterações na permeabilidade da membrana. Este é o primeiro estudo a caracterizar os óleos essenciais e avaliar a atividade antimicrobiana dessas espécies de *Hymenaea*. Os resultados sugerem que os óleos essenciais de *Hymenaea* spp. podem ser utilizados como uma nova fonte de antimicrobianos bioativos.

Palavras-chave: atividade antibacteriana. atividade anti-candida. microscopia eletrônica. interação sinérgica.

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido descritas como fontes bioativas para o tratamento de patologias desde a Pré-História e é notável o crescente interesse em estudos que avaliam as propriedades medicinais de compostos de origem vegetal (Araújo et al., 2011). Recentemente, os produtos naturais vêm desempenhando um papel importante na descoberta de novos agentes antibacterianos (Balouiri et al. 2016). Mesmo considerando espécies do mesmo gênero, as diferenças notáveis podem ser encontradas no quesito de produção de metabolitos secundários, uma vez que pode ser influenciada pelo tipo de solo e alterações climáticas (Araújo et al., 2017).

As regiões de Caatinga e Mata Atlântica abrigam uma grande biodiversidade do território brasileiro, existindo vários estudos que vêm relatando a atividade antimicrobiana de espécies desses ecossistemas (Costa et al., 2017; Araújo et al., 2017; Garcia et al., 2011; Dimech et al., 2013; Sales et al., 2014; Silva et al., 2013). *Hymenaea* (Fabaceae) é um gênero neotropical com 16 espécies distribuídas desde o México, passando pela América Central, Índias Ocidentais e por todos os países da América do Sul, exceto Uruguai e Chile (Souza et al., 2014). Tradicionalmente conhecida por “jatobá”, são utilizadas no tratamento de várias doenças, como fraqueza pulmonar, asma, anemia, dor de garganta, cólica intestinal, cistite, doenças virais e infecção urinária (Boniface et al., 2017). As plantas deste gênero têm sido amplamente estudadas em relação às suas propriedades químicas e farmacológicas. Diversas atividades já foram relatadas para espécies do gênero, dentre elas: antioxidante, antibacteriano, antifúngico e antiulcerogênica (Maranhão et al., 2013; Sales et al., 2014; Costa et al., 2017; Orsi et al., 2012).

A exposição de micro-organismos patogênicos a antibióticos aliada ao uso indevido pode resultar em uma pressão seletiva para o desenvolvimento da resistência (Guimarães et al., 2010). Micro-organismos resistentes, incluindo bactérias, fungos, vírus e outros parasitas são insensíveis à maioria dos tratamentos padrão, o que aumenta o risco de propagação de várias doenças (OMS, 2012). Continuamente, a busca por novos compostos com potencial atividade antimicrobiana aumentou e os produtos de origem vegetal mostram-se uma alternativa interessante. As infecções por micro-organismos patogênicos geralmente envolvem múltiplos componentes da parede celular de bactérias e fungos, incluindo moléculas contendo carboidrato que estão diretamente ligadas à adesão a micro-

organismos e podem atuar como fatores de virulência (Tribble e Lamont, 2010). Compostos que afetam a adesão e invasão em células epiteliais têm relevância clínica, uma vez que estes processos estão envolvidos na patogênese do micro-organismo.

Os óleos essenciais são considerados fontes alternativas de antimicrobianos. Sua natureza hidrofóbica e uma composição química complexa conferem baixo risco ao desenvolvimento de resistência microbiana, visto que sua ação pode estar relacionada a diferentes mecanismos, o que dificulta as adaptações microbianas (Silva et al., 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Hymenaea* ainda não relatadas na literatura, (*Hymenaea rubriflora* Ducke, *Hymenaea longifolia* e *Hymenaea eriogyne*), avaliar o potencial antimicrobiano e as alterações ultraestruturais em isolados clínicos de bactérias e leveduras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta da planta

As folhas de *Hymenaea rubriflora* Ducke foram coletadas no fragmento da Mata Atlântica Engenho Piedade, no município de Igarassu, litoral Norte de Pernambuco. E as folhas de *Hymenaea eriogyne* e *Hymenaea longifolia* coletadas na Chapada do Araripe, no Município de Exu, Pernambuco, em região de vegetação de Caatinga. Uma amostra de cada espécie foi identificada pelo botânico Dr. Alexandre Gomes da Silva e depositada no Herbário “Dárdano de Andrade Lima” do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife, Brasil.

Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Hymenaea* spp. foram obtidos por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 5000ml. As folhas frescas e casca dos frutos secos (150g) foram imersos em água destilada por 180 minutos, começando a contabilizar pelo ponto de ebulição da água. Em seguida, os óleos foram secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), calculados os rendimentos conforme Girard et al., (2007) e armazenados a 4 ° C até análise posterior.

Caracterização química dos óleos essenciais

As análises de cromatografia gasosa (GC) dos óleos essenciais de *Hymenaea rubriflora* Ducke foram realizadas para determinar as proporções relativas dos componentes químicos. As análises de GC foram realizadas em um Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália) equipado com um detector de ionização de chama (FID) (Thermo Scientific, Milão, Itália) e uma coluna capilar de sílica fundida VB-5 (ValcoBond 30 m × 0,25 mm Id: espessura do filme: 0,25 mm) (Valco Instruments Company Inc., Houston, TX, EUA). O nitrogênio foi empregado como gás transportador a uma taxa de fluxo de 1 L/min e pressão de entrada de 30 psi. O programa de temperatura do forno foi, inicialmente, de 40 °C, mantido durante 2 min, após o qual foi aumentado para 230 °C a 4 °C/min, tendo

sido mantido durante 5 min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 ° C e 280 ° C, respectivamente. A amostra (1 µL, 2 mg/mL em n-hexano) foi injetada sem separação. A quantidade relativa de cada componente foi estimada a partir da área de pico correspondente e expressa como uma porcentagem da área total do cromatograma. As análises foram realizadas em triplicata.

A identificação dos compostos presentes nos óleos foi realizada por GC associada à espectrometria de massa (GC-MS). Essas análises foram realizadas usando um instrumento quadripolar Agilent série 5975C GC / MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 não polida Agilent J & W (filme de 30 m × 0,25 mm) Espessura: 0,25 µm) (Agilent Tecnologias, Palo Alto, CA, EUA). Para cada amostra, injetou-se 1 µL no modo dividido (50: 1) com a temperatura do injetor ajustada para 250 ° C. A temperatura do forno GC foi ajustada para 40 ° C, mantida durante 2 minutos, após o qual foi aumentada para 230 ° C a 4°C/min, mantida durante 5 min. Hélio foi utilizado como um gás transportador a um fluxo de 1 mL/ min, conservado a uma pressão constante de 7.0 psi. A fonte da MS e as temperaturas quadripolares foram definidas para 230 ° C e 150 ° C, respectivamente. Os espectros de massa foram realizados a 70 eV (no modo EI), com uma velocidade de varredura de 1.0 varreduras de m / z 35-350. A identificação dos componentes individuais foi realizada em comparação com os valores de índices de retenção previamente reportados, obtidos por co-injeção de amostras de óleo e um conjunto de hidrocarbonetos lineares C9-C30 e calculados de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (1963). Posteriormente, os dados de MS adquiridos para cada componente foram combinados com os dados disponíveis na biblioteca espectral de massa do sistema GC-MS (MassFinder 4, consultoria científica Dr. Hochmuth, Hamburgo, Alemanha); Biblioteca Espectral de Massa NIST08 (ChemSW Inc. Fairfield, CA, EUA); Wiley Registry TM da Relação Espectral de Massa 9ª Edição (Wiley, Hoboken, NJ, EUA) e com outros dados espectrais de massa publicados (Adams, 2009). As análises foram realizadas em triplicata.

Atividade antimicrobiana

Cepas microbianas

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 94863, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosas* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; três cepas de *Staphylococcus aureus* com perfis resistente (*S. aureus* 705, 700 e 726), gentilmente cedidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco; três cepas com perfis resistente cedidas pela Coleção de Cultura de Bactérias de Origem Hospitalar da Fiocruz (*K.pneumoniae* CCBH 23940, *E. coli* CCBH 23916 e *P. aeruginosa* CCBH 23964) e 4 cepas de isolados de *Candida* cedidas pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (*Candida albicans* URM-6543, *Candida glabrata* URM-6393, *Candida parapsilosis* URM-6557, *Candida tropicalis* URM-6551).

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (MBC) e concentração fungicida mínima (MFC)

Soluções contendo os óleos essenciais foram obtidas conforme Bessa et.al. (2016): 400µL dos óleos das folhas foram misturados com 40µL de Tween 80 e 5mL de água estéril (qsp) em um tubo estéril e agitando em vórtice (Fanem). Após 5 min, foram obtidas soluções com uma concentração final de 80µL/mL de óleo essencial de *Hymenaea rubriflora* Ducke (OE_{Hr}), óleo essencial de *Hymenaea eriogyne* Bethn (OE_{He}) e óleo essencial de *Hymenaea longifolia* (OE_{HI}).

O ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo seguiu o protocolo M100 do CLSI (2017) para determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Diluições em série de duas vezes de cada solução contendo os óleos essenciais (40-0,002 µl/mL) foram preparadas em caldo de Mueller-Hinton e 10µL de suspensão bacteriana (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) foram adicionados. As amostras foram incubadas a 37 ° C durante 24 h. A solução de resazurina (0,01%) foi utilizada como indicador por visualização de mudança de cor: qualquer mudança de cor de roxo para rosa, foi registrado como crescimento bacteriano. A concentração mais baixa, na qual nenhuma alteração de

cor ocorreu, foi tomada como MIC. Posteriormente, 10µL das culturas foram semeadas em placas contendo ágar Muller Hinton e incubadas durante 24 h a 37 °C para determinar a concentração bactericida mínima (MBC), que corresponde à concentração mínima da amostra que eliminou a bactéria. A Gentamicina (Sigma Aldrich) foi utilizada como fármaco padrão.

Para determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida das cepas de *Candida*, foi utilizado o protocolo M27 do CLSI (2008). Diluições seriadas das soluções contendo os óleos foram realizadas em placas de 96 poços em meio RPM-1640 (tamponado com MOP's) adicionando 100µL da suspensão de leveduras, aproximadamente 1×10^6 à 5×10^2 CFU/mL. As amostras foram incubadas a 30 °C por 24h. A MIC foi determinada pela a inibição de 50% de crescimento em comparação com o poço controle (apenas o meio e inoculo). Posteriormente, 10µL de cada poço foram semeados em placas contendo meio ágar Sabouraud Dextrose e incubadas por 24h a 30°C para determinar a concentração fungicida mínima. O fluconazol (Sigma Aldrich) foi utilizado com fármaco padrão. Cada ensaio neste experimento foi realizado em triplicata.

Interação sinérgica

Na avaliação da interação sinérgica, foi escolhido o *OEHR* para verificar a modulação da resistência, por apresentar melhores resultados nos MIC's. A interação do óleo essencial com fármacos convencionais (gentamicina e fluconazol) foi determinada pelo método *checkerboard* descrito por Fadli et al. (2012). A ação antimicrobiana foi avaliada conforme descrito para o MIC, com a mais baixa concentração do *OEHR* (escolhido por apresentar melhor ação antimicrobiana) com os fármacos. Resumidamente, oito diluições em série duas vezes (de MIC para MIC/128) de cada agente antimicrobiano foram preparadas em uma microplaca e misturadas com 50µl da MIC dos óleos essenciais e inoculado, após isso, com 10µl de suspensão bacteriana (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) e 100µl de suspensão para leveduras (aproximadamente 1×10^6 à 5×10^2 CFU/mL). Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C (durante 24 h) para bactérias e 30°C (durante 24 h) para leveduras. Cada ensaio foi realizado em triplicata, sendo determinada a MIC dos fármacos na presença e na ausência do *OEHR* (Matias et al., 2016).

Efeitos do óleo essencial sobre a integridade da membrana

Ensaio de Cristal Violeta

A alteração na permeabilidade da membrana foi determinada pelo ensaio de cristal violeta (Vaara e Vaara 1981). Suspensões dos micro-organismos (5ml) foram preparadas em caldo Muller Hinton para bactérias e Caldo RPMI1640 tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) para leveduras e incubadas em overnight. As células foram coletadas a 4500xg por 5 minutos a 4°C, lavadas duas vezes e resuspensas com PBS (pH7,4). Foram adicionados 20µl de soluções com MIC dos óleos ou EDTA 0,25M e incubado a 37°C e/ou 30°C por 30 min. As amostras controles foram preparadas de forma semelhante sem adição dos óleos. As células foram coletadas 9300xg por 5 minutos, resuspensas em PBS contendo 10µg/mL de cristal violeta e incubadas a 37°C e/ou 30°C por 10 minutos. A suspensão foi, então, centrifugada a 13400x g durante 15 minutos e realizada a leitura do sobrenadante em OD590nm no espectrofotômetro HITACHI UV-VIS. O valor de captação do cristal violeta foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{OD \text{ da Amostra}}{OD \text{ da Solução do Cristal Violeta}} \times 100$$

Determinação de Perda de material absorvente de UV de 260nm

A perda de material absorvente de UV foi mensurada pela leitura em OD260nm em espectrofotômetro UV-VIS (Zhou et al., 2008). As células foram mantidas em overnight em caldo Muller Hinton ou RPMI1640 para bactérias e leveduras, respectivamente, e tiveram sua densidade ajustadas com PBS (pH7,4) para uma OD620nm de 2,0. As células foram colhidas por centrifugação a 400 × g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes e depois resuspensas em PBS (pH 7,4). Concentrações do MIC de cada óleo e controle foram adicionadas à suspensão celular e incubadas a 37°C e/ou 30°C por 60 minutos. Após o tratamento, as suspensões celulares foram centrifugadas a 13,400 × g durante 15 min e o valor OD260nm do sobrenadante foi tomado como uma percentagem dos materiais extracelulares absorventes de UV liberado pelas

células. Todas as medidas foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro HITACHI UV-VIS.

Microscopia eletrônica

As amostras que apresentaram a melhor atividade foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise das alterações estruturais. As células foram tratadas conforme descrito por Veras et al. (2015). Resumidamente, após incubação com $\frac{1}{2}$ do MIC do *OEHR* (8 h a 37°C para bactérias e 12h a 30°C para leveduras) foram fixadas (2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em 0,1 mol /L de tampão de fosfato, pH 7,2), aderidas a lamínulas revestida de poli-L-lisina durante 5 minutos à temperatura ambiente, lavadas em tampão fosfato 0,1M, pós fixadas (tetróxido de ósmio 1% por 90 minutos). Em seguida, desidratadas em série crescente de álcool (30% a 100%), secas em ponto crítico, anexadas a stubs metálicos e revestidas com 20 nmol/L de ouro para visualização das imagens no MEV Quanta 200 F (empresa FEI).

Para a análise das alterações intracelular ocasionadas pela exposição ao *OEHR*, a amostra foi submetida a análise em Microscopia eletrônica da transmissão, seguindo o protocolo estabelecido por Veras et al., (2015). As células foram tratadas com óleo essencial e incubadas nas condições descritas anteriormente. Em seguida foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Posteriormente foram realizadas três lavagens, duas em tampão fosfato 0,1M e uma em água destilada para contrastação em acetato de uranila a 5% por 1 hora. Em seguida foram realizadas três lavagens com água destilada para posterior desidratação, utilizado uma série crescente de acetona a 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e três vezes de 100% por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizada a infiltração do material para substituição da acetona por resina (epon) em séries crescentes e overnight de 2:1, 1:1, 1:2, 3:1 e resina pura. O material foi emblocado, realizado cortes ultrafinos para contrastação com acetona de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos e analisadas em microscópio ZEISS EM 109.

Análise estatística

Os ensaios foram feitos em triplicata e a análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos óleos essenciais

Os rendimentos da extração dos óleos essenciais das folhas de *H. eriogyne*, *H. longifolia* e *H. rubriflora* Ducke foram 0,62%, 0,398% e 0,069%, respectivamente. As análises dos óleos essenciais por Cromatográfica Gasosa acoplada a Espectro de Massas são mostradas na Tabela 1. No total, foram identificados 40 compostos no óleo essencial de *H. longifolia*, 32 compostos no óleo essencial de *H. eriogyne* e 45 compostos no óleo essencial de *H. rubriflora* Ducke. Os compostos E-caryophyllene (27,45%), α -selinene (10,16%), γ -Muurolene (7,88%) foram identificados como majoritários no óleo essencial de *H. eriogyne*. Em relação ao óleo essencial de *H. longifolia* os compostos encontrados em maiores percentuais foram E-caryophyllene (26,56%), α -selinene (9,63%), δ -Muurolene (7,10%) e germacrene-B (8,97%). E os compostos germacrene-D (16,13%), E-caryophyllene (36,72%) e α -humulene (6,06%) estavam presentes em maiores percentuais no óleo de *H. rubriflora* Ducke.

Os óleos essenciais das espécies investigadas apresentaram uma composição química variada, sendo em sua maioria composta por substâncias sesquiterpênicas. Para Perricone et al. (2015), essa é uma característica dos óleos essenciais. Tais resultados corroboram com os dados apresentados por Sales (2014) e Aguiar et al. (2010), ao caracterizarem óleos essenciais da casca dos frutos *Hymenaea courbaril*, encontrando percentuais de Germacrene-D (17,61%; 31,9%) e caryophyllene (17,56%; 27,1%). Os compostos α -selinene, γ -Muurolene e β -cariofileno também tem sido relatado em óleos de *Hymenaea* spp. (Costa et al., 2017; Mercês, 2015; Pereira et al., 2014).

TABELA 1 – Identificação dos constituintes dos óleos essenciais das folhas de *H. rubriflora* DUCKE, *H. eriogyne* E *H. longifolia*

Composto ^a	Índice de Retenção		Conteúdo (% do total de óleo) + SD		
	RI Lit. ^b	RI Cal. ^c	OE _{Hr}	OE _{He}	OE _{HI}
geijerene	1138	1141	0.09±0.01		0.06±0.01
pregeijerene (trace)	1285	1288			0.01±0.00
Δ-elemene	1335	1338			0.33±0.01
δ-elemene	1335	1337	0.43±0.02		
α-Cubebene	1348	1350	0.52±0.05	1.23±0.01	0.96±0.02
α-Ylangene	1373	1371	0.08±0.01	0.41±0.01	0.44±0.01
α-Copaene	1374	1376	2.24±0.07	2.28±0.02	2.01±0.01
β-cubebene	1387	1391		0.22±0.00	0.01±0.00
β-Bourbonene	1387	1385	0.47±0.03		0.29±0.01
β-elemene	1389	1392	5.61±3.14	0.86±0.01	0.92±0.02
α-cubebene	1345	1396			0.28±0.01
Cyperene	1398	1399	0.25±0.01	2.34±0.02	1.08±0.02
Z-Caryophyllene	1408	1406	0.01±0.00		0.01±0.00
α-Gurjunene (trace)	1409	1410			0.01±0.00
Cis-α-Bergamotene	1411	1415	0.08±0.01		
E-Caryophyllene	1417	1421	36.72±1.05	27.45±0.11	26.56±0.30
β-Ylangene (trace)	1419	1416			0.01±0.00
β-Copaene	1430	1429	0.57±0.01	1.54±0.06	2.36±0.17
α-trans-Bergamotene	1432	1436	0.51±0.02		
δ-Elemene	1434	1434			6.28±0.17
γ-elemene	1434	1434		2.37±0.07	
α-Guaiene	1437	1440			1.41±0.04
Aromadendrene	1439	1439	0.31±0.02	1.34±0.01	
Trans-muurolo-3,5-diene	1451	1451	0.12±0.01		
α-Humulene	1452	1454	6.06±0.16	4.93±0.01	4.25±0.02
allo-aromandendrene	1458	1461	0.61±0.03		
4,5-di-epi-aristolochene	1471	1470	0.06±0.01	0.25±0.01	0.19±0.04
δ-Muuroloene	1478	1479			7.10±0.05
γ-Muuroloene	1478	1478	2.09±0.04	7.88±0.02	
Germacrene D	1480	1483	16.13±0.31	3.67±0.04	4.53±0.03
β-Selinene	1490	1487	3.07±0.06	6.26±0.01	5.67±0.05
trans-Muurolo-4(14),5-diene (trace)	1493	1493	0.01±0.00		0.01±0.00
α-selinene	1498	1496	3.16±0.10	10.16±0.04	9.63±0.04
β-alaskene	1498	1497	3.63±0.10		
α-muuroloene	1500	1501	0.28±0.01	1.09±0.04	0.01±0.00
α-βulnesene (trace)	1509	1507			0.01±0.00
Δ-amorphene	1511	1508		0.34±0.00	

Germacrene A	1508	1506	0.53±0.04		
γ-Cadinene	1513	1515	0.55±0.58	2.99±0.02	
δ-Cadinene	1513	1515	3.76±0.07		2.45±0.03
Δ-cadinene	1522	1525		7.41±0.03	5.91±0.07
Trans-Cadina-1.4-diene	1533	1533	0.11±0.01	0.27±0.00	0.01±0.00
α-Cadinene	1537	1538	0.15±0.00	0.86±0.01	0.01±0.00
α-Calacorene	1544	1544	0.06±0.01		
selina-3,7(11)-diene	1545	1543		0.77±0.00	1.91±0.14
Germacrene B	1559	1558	0.27±0.06	2.80±0.03	8.97±0.05
β-Calacorene	1564	1565	0.11±0.00		0.01±0.00
spathulenol	1577	1579	0.74±0.03	0.51±0.02	0.35±0.00
Caryophyllene oxide	1582	1584	1.51±0.02	0.92±0.01	0.69±0.01
Guaiol	1600	1599		1.92±0.03	
Viridiflorol	1592	1593	0.15±0.01		
Ledol	1602	1604	0.16±0.03		
Humulenepoxide II	1608	1610	0.15±0.06		
γ-eudesmol	1630	1633		0.12±0.01	
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5β-ol	1639	1638	0.10±0.00		
tau.-Muurolol	1644	1643	1.13±0.05	0.66±0.02	0.46±0.04
Cubenol (trace)	1645	1647	0.01±0.00		
β-eudesmol	1649	1652		0.62±0.02	0.05±0.01
α-eudesmol	1652	1655		1.88±0.03	
α-Cadinol	1652	1656	1.44±0.05		0.57±0.27
bulnesol	1670	1669		0.88±0.01	
santalol<(Z)-α>	1674	1673	0.40±0.08		
Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol (trace)	1687	1688	0.01±0.00		0.04±0.01
Mintsulphide (trace)	1740	1739	0.01±0.00		
CNI		1985	0.16±0.02		
CNI		2070	2.78±0.48		
CNI		2079	0.34±0.04		
CNI		2120	0.91±0.07		
CNI		2214	0.49±0.11		
identificados			94,43		
não identificados			4,68		
Monoterpenos			46,50	47,44	45,03
Sesquiterpenos			53,50	52,56	54,97
TOTAL			99.11	97.24	97.78

^{*b} RI Lit.- Índice de retenção da Literatura; ^{*c} RI Cal.- Índice de retenção calculado; SD- desvio padrão; OEHR- *H ymenaea rubriflora* Ducke; OEHe – *Hymenaea eriogyne* Benth; OEHL – *Hymenaea longifolia*

Atividade antimicrobiana

A ação inibitória dos óleos essenciais de *H. eriogyne*, *H. longifolia* e *H. rubriflora* Ducke frente aos micro-organismos testados são mostrados na Tabela 2. Os resultados mostram vários graus de atividades. Todos os óleos apresentaram ação fungicida para cepas de *Candida* spp. e bactericida para cepas de *S. aureus* multirresistentes. Destaque-se a ação do óleo de *H. rubriflora* Ducke sobre as cepas de *S. aureus* multirresistente (700, 705 e 726), com valores de MIC entre 5-20µl e relação entre MBC/MIC variando de 2 a 4. Segundo Fossum et al. (2014), sendo a proporção MBC/MIC abaixo de 4, pode-se considerar o composto com característica bactericida. Essas atividades podem estar relacionadas com o *E-caryofilleno* (36,72%), principal composto desse óleo, visto que o óleo essencial de *Croton heliotropiifolius* também possui esse composto como majoritário e apresentou expressiva ação bactericida frente a cepas de *S. aureus* (Araújo et al., 2017).

Os óleos de *Hymenaea* spp. apresentaram baixa atividade frente às bactérias Gram negativas, com característica de bacteriostático para cepas resistentes de *P. aeruginosas* e *E. coli*. Foi evidenciada a atividade bactericida do óleo de *H. rubriflora* Ducke em relação a cepa *K. pneumoniae* CCBH 23940 com MIC/MBC de 20 e 40µL, respectivamente. Essa atividade pode estar relacionada com o seu constituinte majoritário, o *caryofilleno* em concentrações superiores, quando relacionado com os óleos essenciais de *H. eriogyne* e *H. longifolia* (Ayala et al., 2009). Todas as cepas de *Candida* foram sensíveis aos óleos essenciais das *Hymenaea* spp. deste estudo, com caráter fungicida para o *OEHR*, com a proporção MCB/MIC variando de 1-2 e valores de MFC variando de 2,5 a 0,62µL. Resultados semelhantes foram identificados por Costa et al. (2017) com óleo essencial das folhas de *H. courbaril* var. *courbaril* em cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*.

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericidas Mínima e Concentração Fungicida Mínimas dos óleos essenciais de *H. eriogyne*, *H. longifolia* e *H. rubriflora* Ducke.

Strain	OEHe			OEHI			OEhr			Gentamicin			Fluconazole		
	MIC ^a (μ L/mL)	MBC ^a /MFC (μ L/mL)	MCB/MIC	MIC ^a (μ L/mL)	MBC ^a /MFC (μ L/mL)	MCB/MIC	MIC ^a (μ L/mL)	MBC ^a /MFC (μ L/mL)	MCB/MIC	MIC ^b (μ L/mL)	MBC ^b (μ L/mL)	MCB/MIC	MIC ^b (μ L/mL)	MFC ^b (μ L/mL)	MCB/MIC
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	5	10	2	5	10	2	5	10	2	0,030	0,061	2	-	-	-
<i>S. aureus</i> UFPEDA700	5	40	4	10	-	-	10	20	2	0,122	0,97	8	-	-	-
<i>S. aureus</i> UFPEDA 705	10	40	4	10	20	2	5	10	2	0,24	0,97	4	-	-	-
<i>S. aureus</i> UFPEDA 726	10	20	2	10	20	2	10	20	2	0,030	0,061	2	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	20	40	2	20	40	2	10	20	2	0,03	0,122	4	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> CCBH23764	40	>40	-	40	>40	-	40	>40	-	0,244	0,97	4	-	-	-
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 29665	40	40	1	40	40	1	40	40	1	0,488	0,488	1	-	-	-
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> CCBH23940	40	40	1	20	40	2	20	40	2	0,244	0,48	2	-	-	-
<i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 94863	20	40	2	20	40	2	20	40	2	0,244	0,48	2	-	-	-
<i>Escherichia</i> <i>coli</i> CCBH23916	40	>40	-	40	>40	-	40	>40	-	0,244	0,97	4	-	-	-
<i>Candida</i> <i>albicans</i> URM- 6543	0,62	1,25	2	1,25	5	>4	1,25	2,5	2	-	-	-	1,56	3,12	2
<i>Candida</i> <i>glabrata</i> URM- 6393	1,25	5	>4	1,25	2,5	2	0,62	1,25	2	-	-	-	1,56	1,56	1
<i>Candida</i> <i>parapsilosis</i> URM-6557	2,5	5	2	0,62	1,25	2	1,25	2,5	2	-	-	-	0,78	1,56	2
<i>Candida</i> <i>tropicalis</i> URM-6741	0,31	1,25	>4	0,62	2,5	4	0,62	0,62	1	-	-	-	1,56	1,56	1

Interação sinérgica

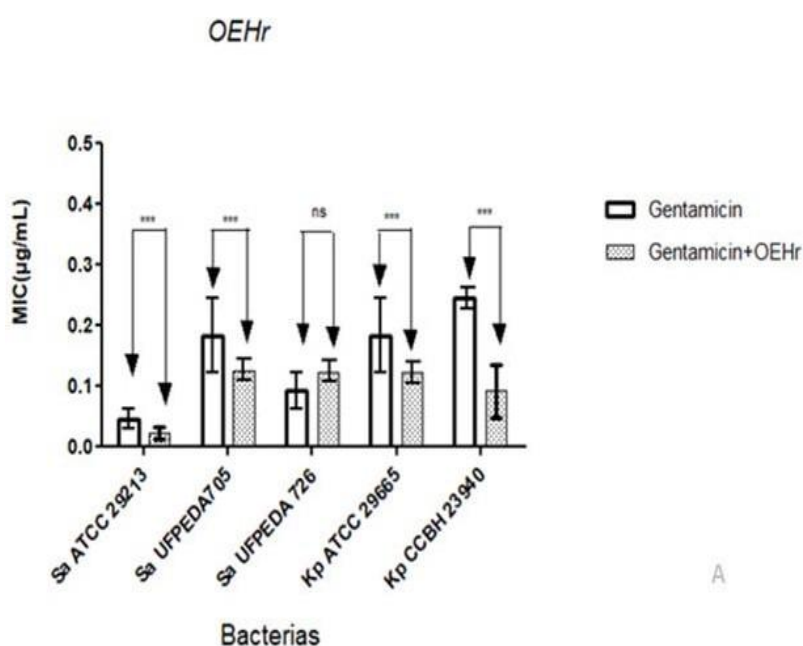
Na avaliação da interação sinérgica do óleo essencial das folhas de *Hymenaea rubriflora* Ducke na modulação da resistência bacteriana em espécies de Gram Negativas e Gram Positivas, o amino-glicosídeo (gentamicina) mostrou um potencial sinérgico em que houve redução da MIC e/ou potencial antagonista, onde a MIC foi aumentada. Os aminoglicosídeos atuam inibindo a síntese proteica e os óleos essenciais danificam a membrana citoplasmática das bactérias. Essa interação é um exemplo básico de sinergia multi-alvo (Langeveld et al., 2013). A figura 1A mostra o potencial sinérgico do óleo, onde a MIC foi alterada significativamente com $p < 0,01$, nas cepas *Kp*ATCC 29665, *Kp*CCBH23940, *Sa*ATCC29213 e *Sa*UFPEDA705, e antagonista com $p > 0,05$ para a cepa

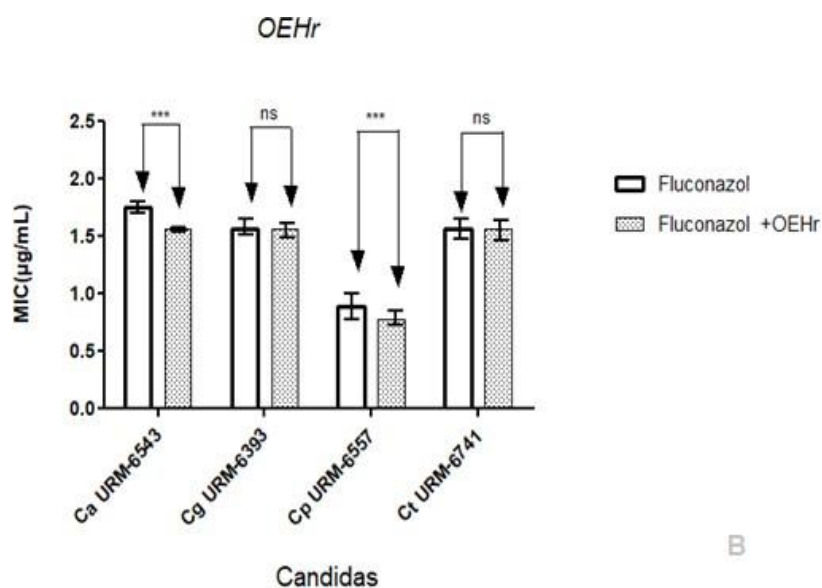
SaUFPEDA726. Os óleos essenciais são fontes potenciais na modulação de resistência microbiana, sinergismos de óleos essenciais e seus sesquiterpenos com antibióticos sobre cepas de *Staphylococcus aureus* têm sido relatadas (Milandi et al., 2017; Matias et al., 2016; Rosato et al., 2010).

A combinação de produtos naturais com antifúngicos vem sendo uma estratégia na luta contra fungos resistentes a fármacos convencionais (Cui et al., 2015). Os óleos essenciais têm se mostrado excelentes produtos na associação com antifúngicos tiazólicos e derivados (Dra et al., 2017; Sobrinho et al., 2016; Silva et al., 2011).

A figura 1B mostra a associação do OEHR com o fluconazol. Foi possível constatar o sinergismo com valores significante de $p < 0,01$ sobre cepas de *Candida albicans* URM-6543 e *Candida parapsiloses* URM 6741, e ação indiferente ou aditiva nas cepas de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* com $p > 0,05$. Resultados semelhantes de sinergismos com fluconazol foram observados (Amber et al., 2010; Kan et al., 2011; Rosato et al., 2008).

FIGURA 1 - Interação sinérgica com óleo essencial de *Hymenaea rubriflora* DUCKE com fármacos. A - Investigação sinérgica com o uso da gentamicina frente a cepas de bactérias. B - Investigação sinérgica com o uso do fluconazol frente a cepas de Candidas.



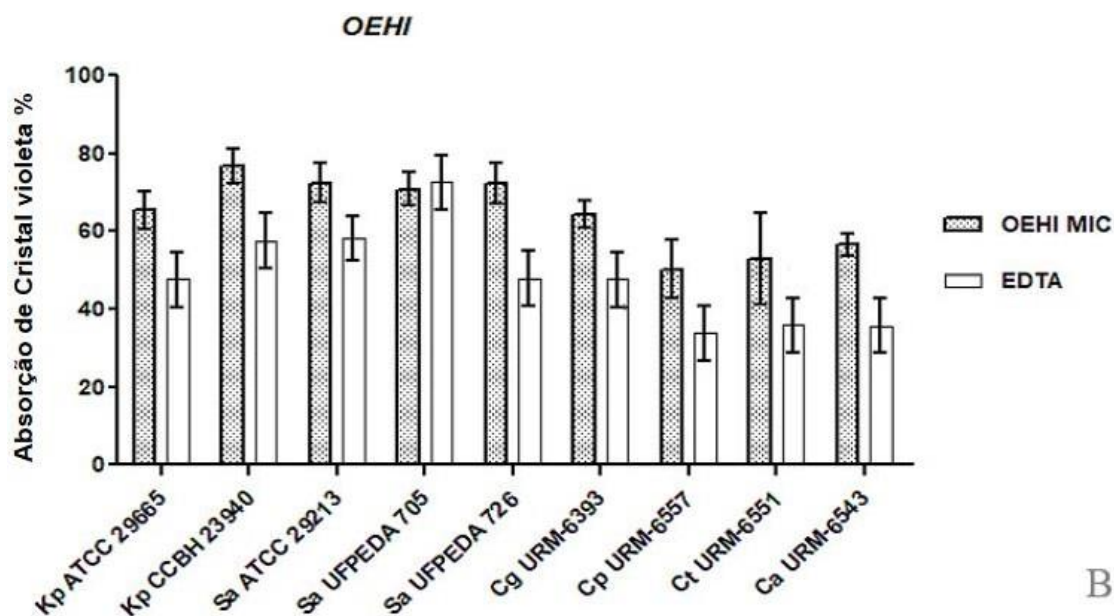
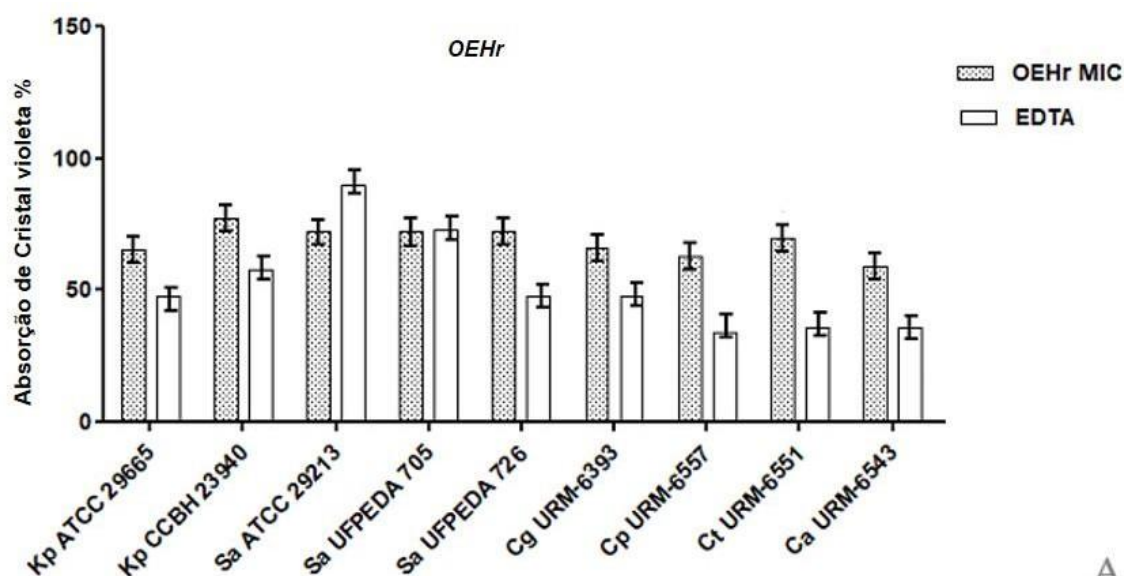


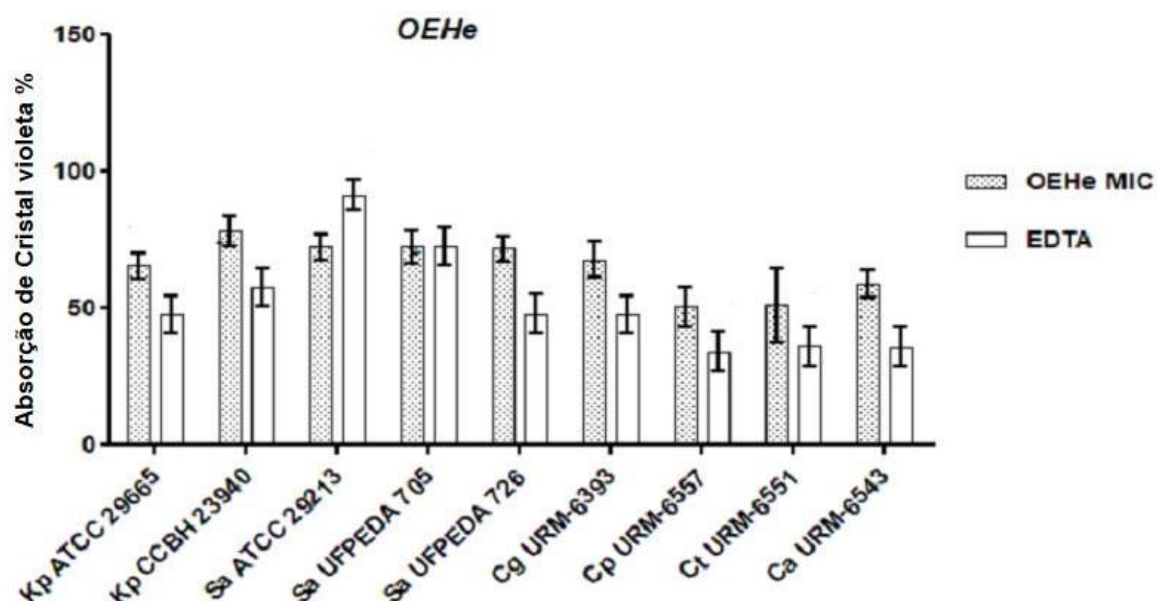
*** significância estatística $p < 0.01$
 ns – estatisticamente não significante $p > 0.05$

Ensaio do cristal violeta

A absorção do cristal violeta pelas cepas em estudo é expressa em percentuais. Os valores de MIC dos óleos essenciais promoveram o aumento da captação do cristal violeta nas espécies de *K pneumoniae* e *S. aureus*, com valores entre 83,67% à 77% (Fig.2A), 82,42% à 77,34% (Fig.2B) e 77% à 70% (Fig.2C) para os OEhr, OEHe e OEHI, respectivamente. Em relação às cepas de *Candida*, foi observado aumento significativo na captação do cristal violeta quando tratadas com os MIC do OEhr, com percentuais variando entre 74% e 63,8%, sendo ($p < 0,05$) quando comparados com o controle (não tratado com óleo). Isso mostra que os óleos de *Hymenaea* spp. alteram a permeabilidade da membrana dos micro-organismos testados. Segundo Devi et al. (2010), o cristal violeta penetra mal na membrana externa, mas entra facilmente quando a membrana expressa algum defeito. Para Sales (2014), a alta hidrofobicidade dos óleos essenciais permitem uma penetração mais fácil na membrana plasmática e uma interação com proteínas intracelulares, resultando no incremento danoso de sua permeabilidade passiva.

FIGURA 2 - Absorção do cristal violeta em células tratadas com os OE. A – Amostras tratadas com óleo essencial de *Hymenaea rubriflora* DUCKE. B – Amostras tratadas com o óleo essencial de *Hymenaea longifolia*. C – Amostras tratadas com o óleo essencial de *Hymenaea eriogyne* BENTH



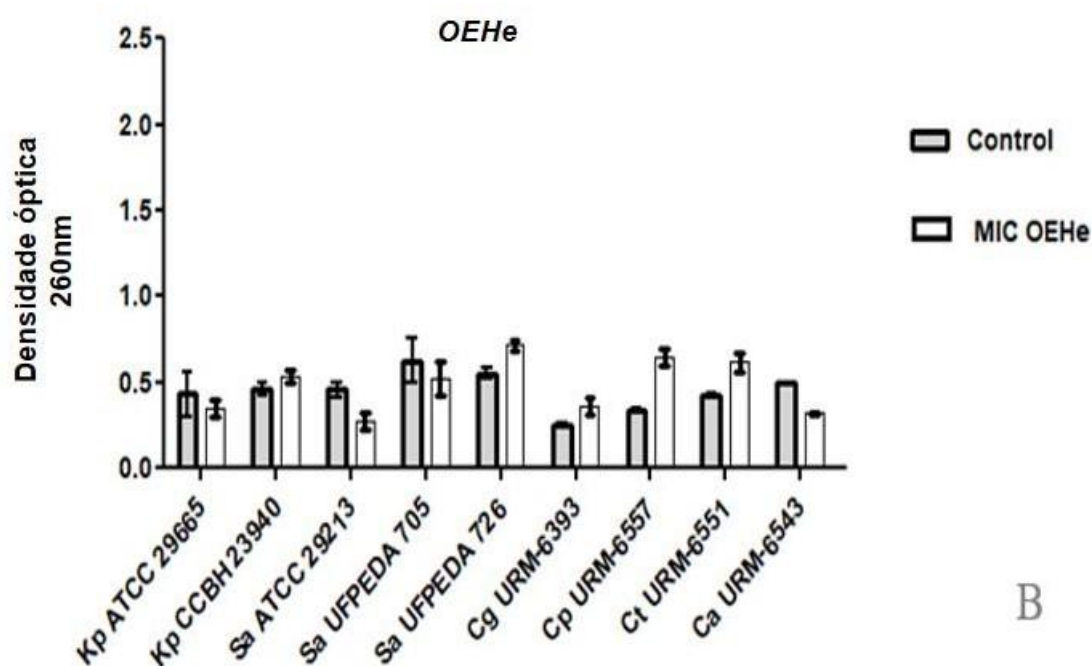
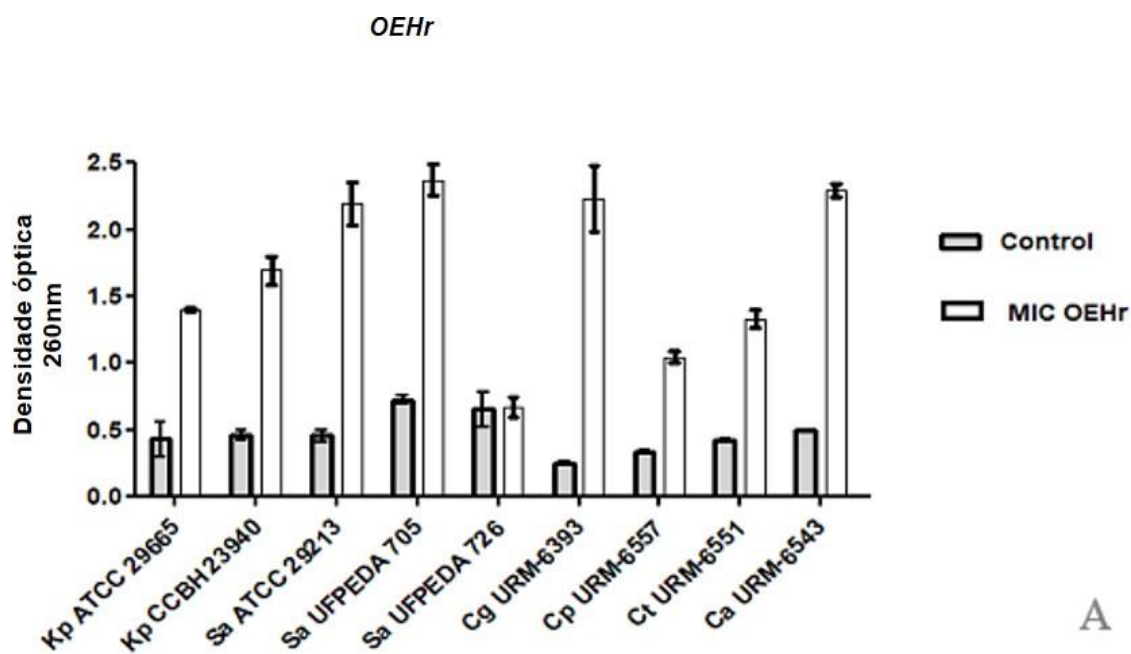


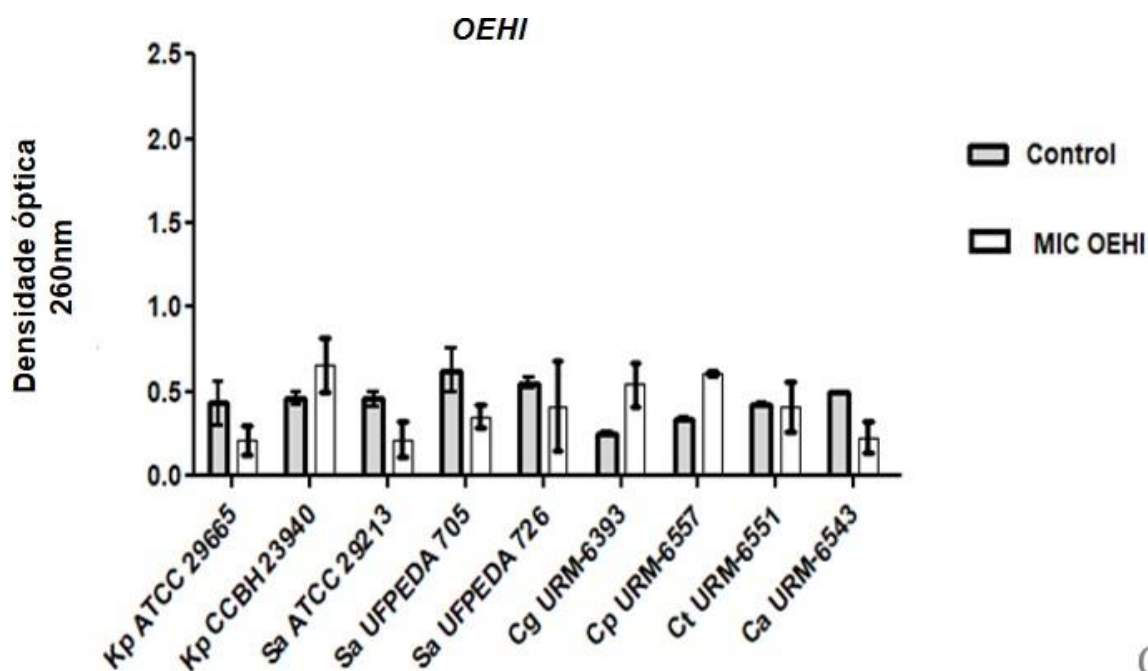
C

Determinação de perda de material absorvente de uv de 260nm

A perda de material absorvente de UV foi expressa em percentual, sendo observado na figura 3. Esses resultados sugerem que *OEHe* é capaz de danificar a membrana, causando o subsequente vazamento de material intracelular. Para Zhou et al. (2008), a identificação de perda de material absorvente de UV é um indicativo de lise celular, em que íons de potássio tendem a se lixiviar primeiro, seguido de moléculas maiores como DNA e RNA. Estes nucleotídeos são fortes absorvedores de UV e, portanto, os mais descritos como materiais absorventes a 260nm. A membrana plasmática das bactérias, por exemplo, pode ser comprometida devido a exposição de alguns agentes antimicrobiano, como os óleos essenciais (Ziae et al., 2018; Wang et al., 2017). O potencial de sesquiterpenos como promovedor de alterações na permeabilidade de membranas de fungos já foi relatado por Pereira et al (2013), com mensuração de material absorvente de UV a 260nm.

FIGURA 3 - Presença de material absorvente a 260nm nos tratados com oS OE. A – Amostras tratadas com óleo essencial de *Hymenaea rubriflora* DUCKE. B – Amostras tratadas com o óleo essencial de *Hymenaea eriogyne* BENTH. C – Amostras tratadas com o óleo essencial de *Hymenaea longifolia*.





Microscopia eletrônica

Nas análises em microscopia eletrônica de varredura das células *K. pneumoniae* CCBH e *S. aureus* UFPEDA 705 submetidas a $\frac{1}{2}$ do MIC do OEHI por 8h, foram observadas alterações na morfologia (Figura 4). As células (controle) não tratadas com óleo apresentaram formas regulares, sem alterações na morfologia e sem cicatrizes. Todavia, as células de *S. aureus* UFPEDA 705 tratadas com o óleo mostraram-se em formas irregulares, com depressões na superfície celular e consequente fissuras na membrana (Fig.4B). As células de *K. pneumoniae* CCBH 23940 apresentaram tamanho irregulares, divisões incompletas e alterações na superfície quando tratadas com o óleo (Fig. 4D). Alterações morfológicas na superfície celular podem resultar no extravasamento de conteúdo intracelular (Wang et al., 2015). Essas observações também têm sido verificadas em microscopia eletrônica de varredura (Sharma et al., 2013; Shen et al, 2015; Veras et al., 2015; Paul et al., 2011).

Não foram observadas alterações na morfologia da cepa de *Candida glabrata* submetidas ao tratamento com *OEHR* por 12h. São observadas estruturas em forma de brotamento (Fig. 5 B) porém em menor quantidades quando comparadas com o controle (Fig. 5 A- células não tratadas). A microscopia das células de *Candida albicans* mostraram (Fig. 5 D) células alongadas com cicatrizes e inibição da formação de hifas, o qual foram evidenciadas nas amostras controle (Fig. 5 C). Essas estruturas são um dos fatores de virulência que conferem a patogenicidade a *Candida albicans* (Cardoso, 2013). As mesmas alterações, como presença de cicatrizes, inibição de estruturas de hifas e número menor de células quando comparados com o controle, foram observadas na microscopia eletrônica das células de *Candida tropicalis* submetidas ao MIC do *OEHR*. (Fig. 5 H). Tais alterações tem sido observada no trabalho de Cavalcante et al. (2017). Esses resultados sugerem que o *OEHR* tem um potencial para aplicação na terapia antifúngica (Jacobsen et al., 2012).

Na análise das alterações intracelulares por meio de microscopia eletrônica de transmissão, foi selecionada a cepa *K. pneumoniae* multirresistente CCBH23940 por ter apresentado alterações de superfície drásticas, nas imagens de MEV. Na figura 6 A, são observadas células não tratadas com *OEHR* apresentando tamanhos normais (1,5 a 2 µm), sem alterações evidentes e com estruturas conservadas. Nas células de submetidas ao tratamento com o óleo apresentaram regiões eletrodensas, alterações no espaço periplasmático e evidencia de material eletróluscentes (Fig.6B). Para Veras et al. (2015) a presença de material eletróluscentes e eletrodensos é um indicativo do aumento de espaço periplasmático em decorrência da perda de material citoplasmático. Essas alterações também foram observadas por Shin e colaboradores (2014) em cepas de *Escherichia coli* submetidas a α -terpenol, e em *Bacillus subtilis* tratadas com óleo essencial de *Mentha longifolia* L. por Pajohi et al. (2011).

Alterações intracelulares em cepas de bactérias tratadas com metabolitos de *Hymenaea* spp. já tem sido relatada. Em um estudo realizado por Dimech et al. (2013) por meio do microscópio eletrônico de transmissão, observaram-se alterações citológicas em *Staphylococcus aureus* tratados com 1/2MIC de extrato hidroalcolico de *Hymenaea stigonocarpa*. Tais alterações incluíram fragmentos de parede celular, septos anormais, disfunções durante a divisão celular exposição de

retrações de membrana, ausência de parede celular, liberação de materiais celulares no citoplasma e alterações em componentes intracelulares.

FIGURA 4 (A-D) – Microscopia eletrônica de varredura de *S. aureus* (A, B) E *K. pneumoniae* (C, D). A E C: células de não tratadas com *OEHR*, apresentam morfologia conservada e comprimento celular normal. B E D: células tratadas com o óleo, são observadas alterações na morfologia, depressões e rupturas das estruturas celulares marcada nas setas.

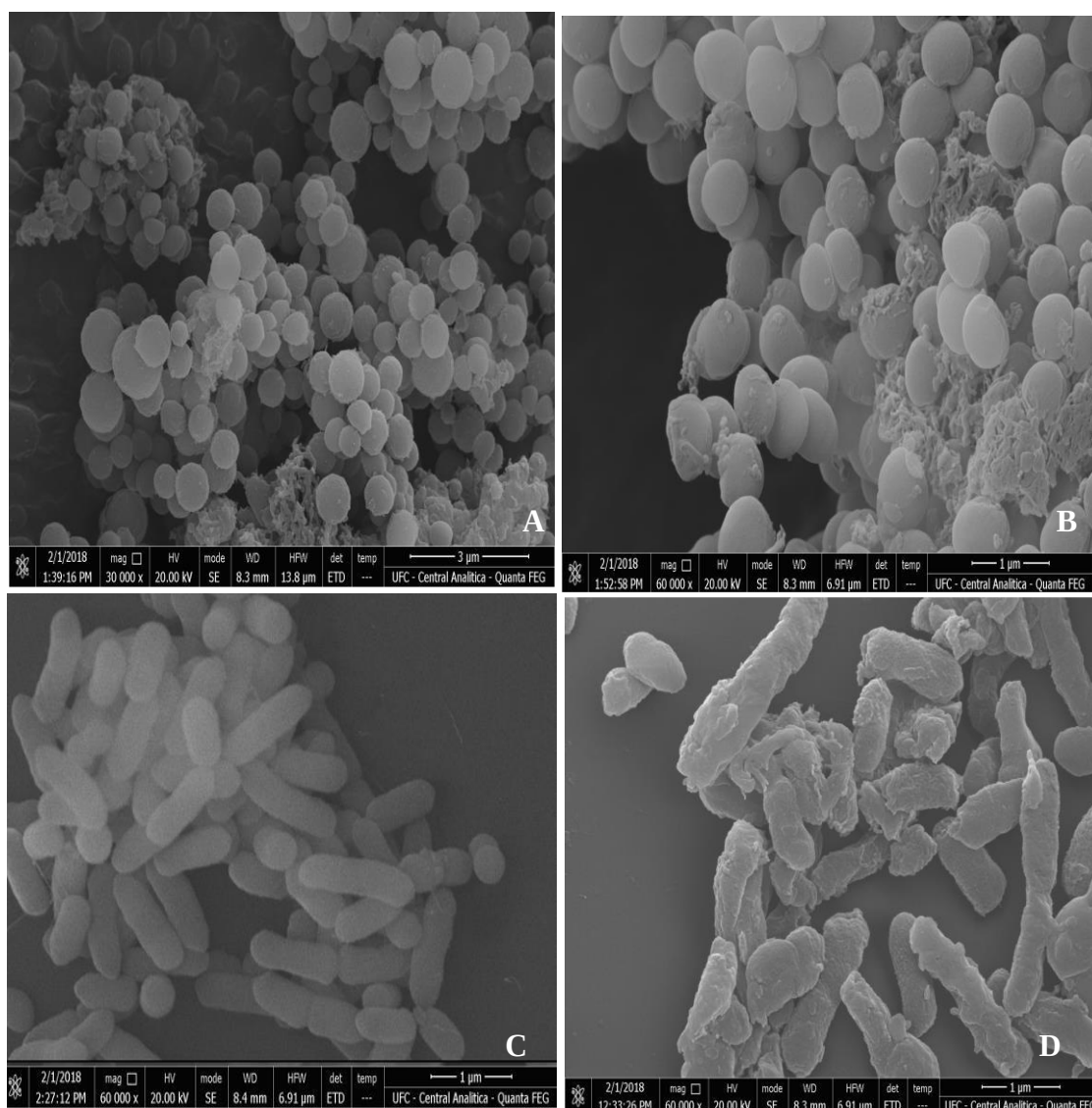
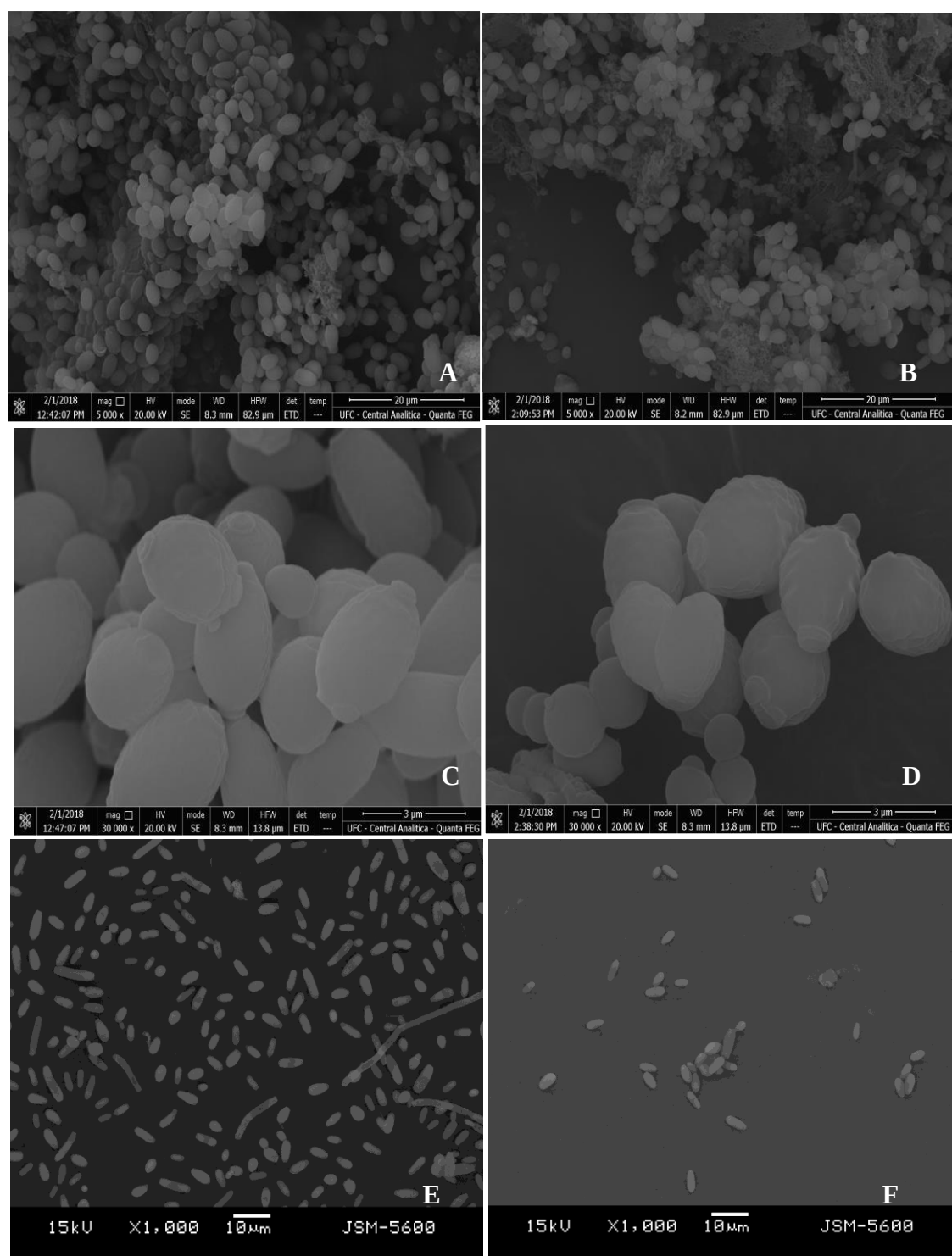


FIGURA 5 - Microscopia eletrônica de varredura. A-D: células de *Candida glabrata* (EM A E D - controles, células conservadas e em fase de brotamento), (EM B E C – tratadas, redução no volume células e sem alterações morfológicas aparentes). E-H: células de *Candida parapsilosis* (E E G – controle, células conservadas e em processo de divisão), (F E H – células tratadas, inibição de crescimento celular e células com cicatrizes). I- M CÉLULAS DE *Candida albicans* (I E L – células controle em processo de divisão celular, início de formação de hifas), (J E M – células tratadas sendo observado a inibição do crescimento e células com algumas cicatrizes).



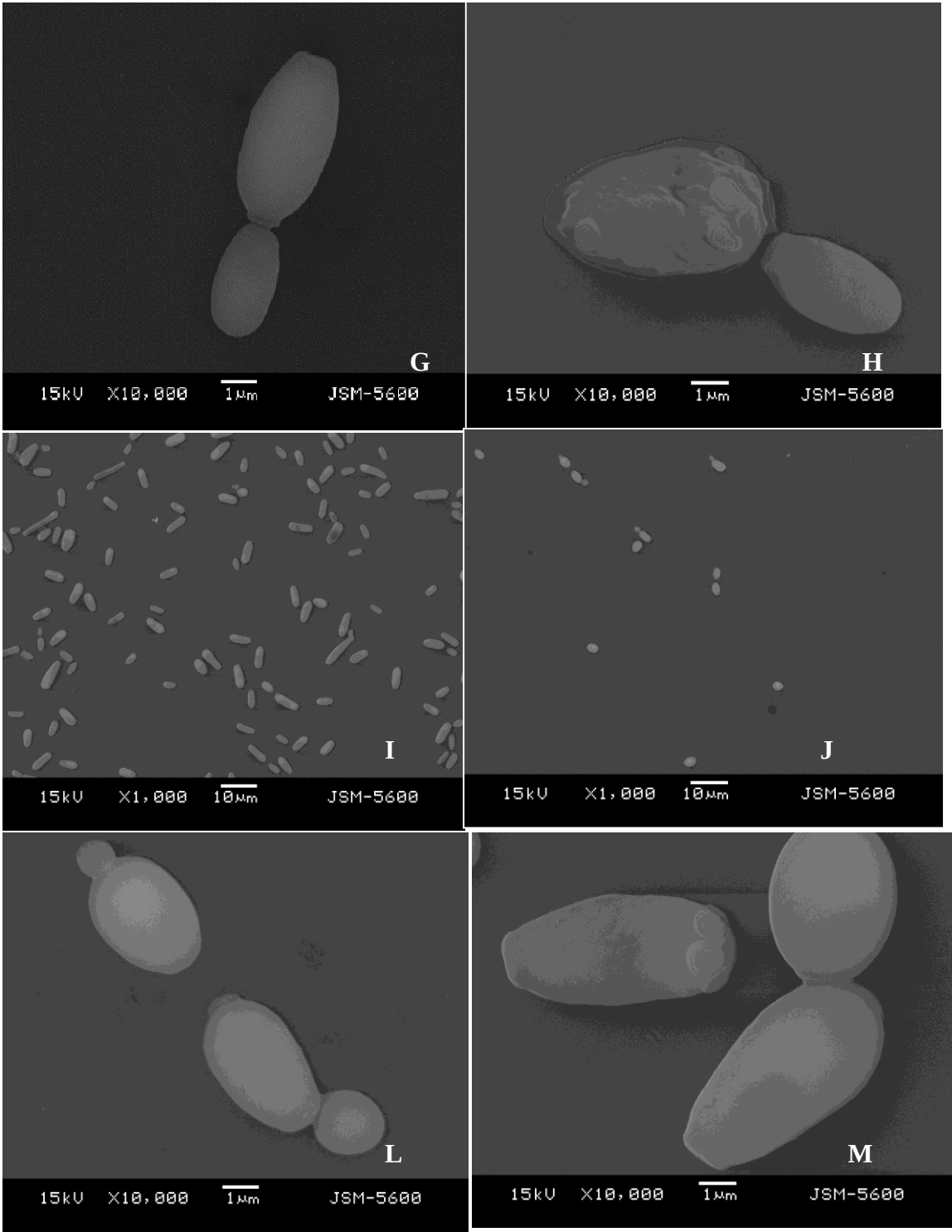
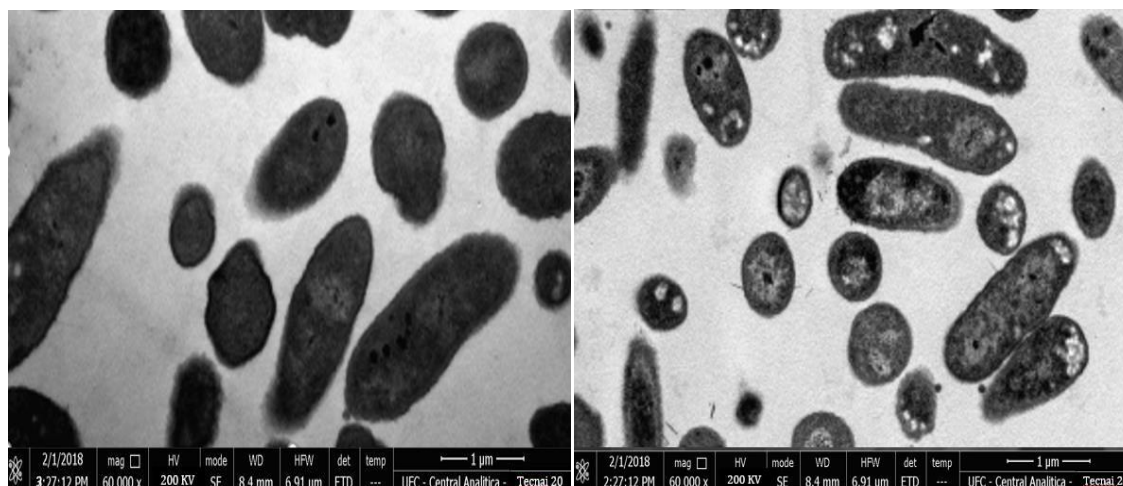


FIGURA 6 – Microscopia eletrônica de transmissão de *K. pneumoniae*. A- Células sem o tratamento (controle) com morfologias conservadas, membrana externa. B – Células tratadas com *OEHR* com estruturas eletroluscentes e eletrodensas em formas e tamanhos variados.



CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de óleos essenciais e atividades antimicrobianas da espécie de *Hymenaea rubriflora* Ducke. As caracterizações dos óleos de *Hymenaea* spp. possibilitaram a identificação de 40 compostos no *OEHI*, 32 compostos *OEHe* e 45 *OEHR*, sendo observada uma variação quantitativa e qualitativa entre as amostras. Os óleos demonstraram atividade antibacteriana para cepas de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, e atividade antifúngica para cepas de *Candida* spp. Além disso, foi observada a interação sinérgica com os fármacos gentamicina e fluconazol, sendo possível a redução dos MIC desses antibióticos. Os resultados mostram que o principal mecanismo de ação dos óleos pode estar relacionado com a ruptura da membrana e extravasamento de conteúdo intracelular, observadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTI); Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e à Coleção de Cultura de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) da Fundação Osvaldo Cruz, por permitir o acesso à coleção.

REFERÊNCIAS

- Adams, R. P. (2009). Quadrupole mass spectra of compounds listed in order of their retention time on DB-5. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Quadruple mass spectroscopy*. 4^a ed. Allured Publishing Co.; Carol Stream, IL, EUA.
- Aguiar, J. C., Santiago, G. M., Lavor, P. L., Veras, H. N., Ferreira, Y. S., Lima, M. A., ... & Alves, P. B. (2010). Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Natural product communications*, 5(12), 1977-1980. PMID:21299135
- Araújo, F. M., Dantas, M. C., e Silva, L. S., Aona, L. Y., Tavares, I. F., & de Souza-Neta, L. C. (2017). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. *Industrial Crops and Products*, 105, 203-206. DOI [10.1016/j.indcrop.2017.05.016](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.016)
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475. doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106
- Bessa, C. M. A., do Nascimento, R. S., Alves, R. C. C., Anselmo, J. E. M., da Silva, A. P. S. A., da Silva, A. G., ... & dos Santos Correia, M. T. (2016). Syagrus coronata seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(23), 310-317. DOI: 10.5897/JMPR2016.6098
- Boniface, P. K., Ferreira, S. B., & Kaiser, C. R. (2017). Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2017.05.024.

Carvalho, C. E. S., Sobrinho-Junior, E. P. C., Brito, L. M., Nicolau, L. A. D., Carvalho, T. P., Moura, A. K. S., ... & Carvalho, F. A. A. (2017). Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. *Experimental parasitology*, 175, 59-67. [doi:10.1016/j.exppara.2017.02.012](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.012)

Cavalcanti Filho, J. R. N., Silva, T. F., Nobre, W. Q., Oliveira de Souza, L. I., Silva e Silva Figueiredo, C. S., Figueiredo, R. C. B. Q. D., ... & Correia, M. T. D. S. (2017). Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1521-1527. [doi:10.1080/13880209.2017.1304427](https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1304427)

Costa, M. D. C. M. F. D., Silva, A. G. D., Silva, A. P. S. A. D., Lima, V. L. D. M., Bezerra-Silva, P. C., Rocha, S. K. L. D., ... & Paiva, P. M. G. (2017). Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against *Candida* Species. *Medicines*, 4(2), 27. [doi:10.3390/medicines4020027](https://doi.org/10.3390/medicines4020027)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (27st ed) Wayne: M100-S21", Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts (3st ed) Wayne: M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute.

Deng, J., He, B., He, D., & Chen, Z. (2016). A potential biopreservative: Chemical composition, antibacterial and hemolytic activities of leaves essential oil from *Alpinia guianensis*. *Industrial Crops and Products*, 94, 281-287. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.004

Dimech, G. S., Soares, L. A. L., Ferreira, M. A., de Oliveira, A. G. V., Carvalho, M. D. C., & Ximenes, E. A. (2013). Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *The Scientific World Journal*, 2013. doi.org/10.1155/2013/862763

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*, 130(1), 107-115. doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025

Dra, L. A., Brahim, M. A. S., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S., ... & Larhsini, M. (2017). Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 109, 746-752. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.028

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus*

broussonetii essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464-471.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.003>

Fossum, T. (2015). *Cirurgia de pequenos animais*. Elsevier Brasil.

Garcia, C. S., Ueda, S. M. Y., & Mimica, L. M. J. (2011). Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 70(4), 589-598 . ISSN 0073-9855

GIRARD, Eduardo Aguiar; KOEHLER, Henrique Soares; NETTO, Sylvio Péllico. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum). **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 5, n. 2, p. 147-165, 2007.

Guimarães, D. O., Momesso, L. D. S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679. <http://producao.usp.br/handle/BDPI/5805>

Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. A., & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine*, 17(12), 921-925.
doi.org/10.1016/j.phymed.2010.02.012

Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94. doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219

Maranhão, C. A., Pinheiro, I. O., Santana, A. L., Oliveira, L. S., Nascimento, M. S., & Bieber, L. W. (2013). Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79, 9-13. doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.005

Matias, E. F., Alves, E. F., Silva, M. K., Carvalho, V. R., Figueredo, F. G., Ferreira, J. V., ... & Costa, J. G. (2016). Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. *Industrial Crops and Products*, 87, 45-53.
doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.028

MERCÊS, P. F. F. D. (2015). Variação da composição química e da atividade antifitopatogênica dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (Fabaceae) coletadas em área de extrema importância biológica para a conservação.

Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Bakhrouf, A., Chaabouni, Y., ... & Chaieb, K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial pathogenesis*, 112, 156-163.
doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.057

Orsi, P. R., Seito, L. N., & Di Stasi, L. C. (2014). *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1), 380-385. doi: [10.1016/j.jep.2013.10.056](https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.056)

Paul, S., Dubey, R. C., Maheswari, D. K., & Kang, S. C. (2011). Trachyspermum ammi (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control*, 22(5), 725-731. doi: [10.1016/j.foodcont.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.003)

Pereira, F. O., Mendes, J. M., & de Oliveira Lima, E. (2013). Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical mycology*, 51(5), 507-513. doi: [10.3109/13693786.2012.742966](https://doi.org/10.3109/13693786.2012.742966)

Pereira, C. K., Rodrigues, F. F. G., Mota, M. L., Sousa, E. O., Leite, G. O., Barros, A. R. C., ... & Costa, J. G. M. (2014). Composição Química, Atividade Antimicrobiana e Toxicidade do Óleo Essencial de *Hymenaea courbaril* (Jatobá). *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. QUÍMICA, SBD Águas de Lindoia-SP*. https://www.researchgate.net/publication/242271542_Composicao_quimica_atividade_e_antimicrobiana_e_toxicidade_do_oleo_essencial_de_Hymenaea_courbaril_jatoba

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in microbiology*, 6, 76. doi: [10.3389/fmicb.2015.00076](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076)

Rosato A, Piarulli M, Corbo F, et al. (2010). In vitro synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Curr Med Chem* 17:3289–95. doi: [10.2174/092986710792231996](https://doi.org/10.2174/092986710792231996)

Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., & Mallamaci, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 15(8), 635-638. doi: [10.1016/j.phymed.2008.05.001](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.05.001)

Sales, G. W. P. (2014). *Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da Hymenaea courbail L* (Doctoral dissertation).

Sharma, A., Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2013). Determination of antibacterial mode of action of allium sativum essential oil against foodborne pathogens using membrane permeability and surface characteristic parameters. *Journal of Food Safety*, 33(2), 197-208. doi: [10.1111/jfs.12040](https://doi.org/10.1111/jfs.12040)

Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., Lin, S., Xu, J., & Ye, H. (2015). Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control*, 47, 196-202. doi: [10.1016/j.foodcont.2014.07.003](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.003)

Silva, L. C. N., Sandes, J. M., de Paiva, M. M., de Araújo, J. M., Figueiredo, R. C. B. Q. D., da Silva, M. V., & Correia, M. T. D. S. (2013). Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Natural product research*, 27(16), 1492-1496. doi: [10.1080/14786419.2012.722090](https://doi.org/10.1080/14786419.2012.722090)

Silva, G.C.; Amorim, L.C.; Silva, P.M.; Lima, S.E.S.; Correia, M.T.C. (2016). Potencial antimicrobiano de óleo essencial de *Algrizea minor* frente a estirpes de *Staphylococcus aureus*. In: I Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido, 2016.

Sobrinho, A. C. N., de Souza, E. B., Rocha, M. F. G., Albuquerque, M. R. J. R., Bandeira, P. N., dos Santos, H. S., ... & dos Santos Fontenelle, R. O. (2016). Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products*, 84, 108-115. doi:10.1016/j.indcrop.2016.01.051

Souza, I. M., Funch, L. S., & de Queiroz, L. P. (2014). Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *PhytoKeys*, (38), 101. doi: 10.3897/phytokeys.38.7408

Tribble, G. D., & Lamont, R. J. (2010). Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology 2000*, 52(1), 68-83. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00323.x

Vaara, M., & Vaara, T. (1981). Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and-resistant *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(4), 578-583. doi: 10.1128/AAC.19.4.578

Van den Dool H., Kratz DJ Uma generalização do sistema de índice de retenção, incluindo a cromatografia de partição gás-líquido programada por temperatura linear. *J. Chromatogr.* 1963; 11 : 463-467. doi: 10.1016 / S0021-9673 (01) 80947-X.

Veras, D. L., de Souza Lopes, A. C., Vaz da Silva, G., Gonçalves, A., Gazzoni, G., de Freitas, C. F., ... & Brayner, F. A. (2015). Ultrastructural Changes in Clinical and Microbiota Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Carriers of Genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, or blaKPC When Subject to β -Lactam Antibiotics. *The Scientific World Journal*, 2015. doi:10.1155/2015/572128

Yamaguchi, K. K., Veiga-Junior, V. F., do Nascimento Pedrosa, T., de Vasconcellos, M. C., & Lima, E. S. (2013). Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. *Quim. Nova*, 36(6), 826-830. .doi: 10.1590/S0100-40422013000600015

Ziaee, E., Razmjooei, M., Shad, E., & Eskandari, M. H. (2018). Antibacterial mechanisms of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against *Lactobacillus curvatus*. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 406-412. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.089

Zhou, K., Zhou, W., Li, P., Liu, G., Zhang, J., & Dai, Y. (2008). Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. *Food Control*, 19(8), 817-822. doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.008.

4 CONCLUSÕES

Hymenaea spp., indicada popularmente para o tratamento de várias enfermidades, apresentam atividade antimicrobiana comprovada.

Os rendimentos dos óleos essenciais de *Hymenaea rubriflora* Ducke, *Hymenaea eriogyne* e *Hymenaea longifolia* foram diretamente correlacionados para todas as espécies do mesmo gênero analisadas na literatura.

A partir da caracterização química, foi observada uma variabilidade quantitativa e qualitativa entre os óleos extraído das folhas das três espécies, sendo definidos como compostos majoritários dos óleos essenciais de *H. eriogyne* e *H. longifolia*: E-caryophyllene (27,45%; 26,56%), α -selinene (10,16%; 9,63%), γ -Murolene (7,88%) e germacrene-B (8,97%), respectivamente. E os compostos germacrene-D (16,13%), E-caryophyllene (36,72%), α -humulene (6,06%) e β -elemene (5,61%) estavam presentes no óleo de *H. rubriflora* Ducke.

Os óleos essenciais de *Hymenaea* spp. apresentaram uma expressiva atividade fungicida frente a cepas de espécies de *Candidas*, atividade bactericida apenas para algumas cepas de *Staphylococcus aureus* e uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Em sua maioria, bacteriostático para espécie de *Escherichia coli*.

O OE_{Hr} apresentou melhor resultado nos ensaios de CMI para os grupos de micro-organismos testados. Sua ação pode estar relacionada com alterações na permeabilidade da membrana, evidenciado a partir dos ensaios de absorção de cristal violeta e liberação de material absorvente de UV. O efeito sinérgico com gentamicina e fluconazol foi observado com a diminuição dos CMI desses fármacos.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.
- AGUIAR, J.C., SANTIAGO, G.M., LAVOR, P.L., VERAS, H.N., FERREIRA, Y.S., LIMA, M.A., ARRIAGA, A.M., LEMOS, T.L., LIMA, J.Q., DE JESUS, H.C., ALVES, P.B., BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Nat.Prod. Commun.** 5, 1977-1980, 2010.
- ALBUQUERQUE, U. P.; BARACHO, G. S.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE U.P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia** 27: 276-285, 2002
- AMARAL, J. F. D. Atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Cratogeomys muelleri*. Dissertação: Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil. 155p. 2004.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana- mecanismos e impactos clínicos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/res_antimicrobianos.htm. Acesso em: 08 ago. 2017.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1563-1589, 2000.
- ARAÚJO FILHO, J. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. IICA, Brasília (Brasil) Projeto Dom Helder Camara, Recife (Brasil) Projeto SEMEAR, Brasília (Brasil) Associação Brasileira de Agroecologia, Rio Grande do Sul (Brasil), 2013.
- ARAÚJO JR., R. F.; GUERRA, G. C. B.; MELO, M. C. N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.
- ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 18 ago. 2014.
- ASANTE, J. Emerging Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria and Fungi : Advances in the Era of Genomics Emerging mechanisms of antimicrobial

resistance in bacteria and fungi : advances in the era of genomics. n. July, 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BARBOSA, J. I. D. S.; DA SILVA, J. A.; GOMES, J. M.; DA SILVA, N. L.; MARANGON, L. C.; FELICIANO, A. L. Composição Florística de um fragmento de mata atlântica, como suporte a restauração ecológica, Igarassu-PE. 2014

BATISTA, J. S., OLINDA, R. G., MEDEIROS, V. B., RODRIGUES, C. M. F., OLIVEIRA, A. F., PAIVA, E. S., ... & DA CUNHA MEDEIROS, A. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, 42(1), 136-141. 2012.

BLANCO, J. *Escherichia coli* enteroagregativa O104: H4-ST678 productora de Stx2a. Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC!. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 2, p. 84-89, 2012.

BRASIL.MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. Caatinga 2017. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga> citei como 2017> . Acesso em 04 Jan.2018

BEGOSSI, A.; HANAZAKI, N.; TAMASHIRO, J.Y. Medicinal plants in the Atlantic Forest (Brazil): Knowledge, use, and conservation. **Human ecology** 30: 281-299. 2002.

BEZERRA, G.P., GÓIS, R.W., DE BRITO, T.S., DE LIMA, F.J., BANDEIRA, M.A., ROMERO, N.R., MAGALHÃES, P.J., SANTIAGO, G.M. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **J. Ethnopharmacol.** 149, 62-69, 2013.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

BONIFACE, P. K., FERREIRA, S. B., KAISER, C. R. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 193-223, 2017.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Rev. Clin. Microbiol.** v. 14, n. 4, p. 933-951, 2011.

CALDAS, GERMANA FREIRE ROCHA. Efeito Gastroprotetor e Segurança de Uso do Óleo Essencial das Folhas de *Hyptis Martiusii* Benth.(lamiaceae) e do Monoterpeno 1, 8-cineol. 2013.

CARSON C F et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 35, p. 421-424, 1995.

CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N., SILVA, T. F., NOBRE, W. Q., OLIVEIRA DE SOUZA, L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, 55(1), 1521-1527.2017.

CECÍLIO, A.B., DE FARIA, D.B., OLIVEIRA, P. DE C., CALDAS, S., DE OLIVEIRA, D.A., SOBRAL, M.E., DUARTE, M.G., MOREIRA, C.P., SILVA, C.G., DE ALMEIDA, V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J. Ethnopharmacol.** 141,975-981. 2012.

CHASE, M. W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.

COELHO, M. G., VELOZO, L. S., FERNANDES, D. C., ALVES, R. A., SIQUEIRA, H. A., SILVA, G. P; GAYER, C. R. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos Eletrônica**, 7(04), 245-251, 2013.

COOLS, Piet. The role of *Escherichia coli* in reproductive health: state of the art. **Research in Microbiology**, 2017.

COSTA, M. D. C. M. F. D., SILVA, A. G. D., SILVA, A. P. S. A. D., LIMA, V. L. D. M., BEZERRA-SILVA, P. C., ROCHA, S. K. L. D., ... & PAIVA, P. M. G. (2017). Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against *Candida* Species. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 27, 2017.

CROCCO, E. I. *et al.* Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíase superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, p. 689-697, 2004.

CUERVO SI, SÁNCHEZ R, GÓMEZ-RINCÓN JC, ALMENARES C, OSORIO JP, VARGAS MJ. Comportamiento de casos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en pacientes con cáncer de un hospital de tercer nivel de Bogotá, D.C. **Biomédica**. 34(Suppl1):170-180. 2014.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. And *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**, v.22,n1,p. 39-44, 2003.

DE CASTRO G.C.; FERREIRA, T. C.; DE OLIVEIRA, R. C. F., SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. A. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus*

aromaticus L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**, 15(2), 2017.

DE SOUZA, A.C., KATO, L., DA SILVA, C.C., CIDADE, A.F., DE OLIVEIRA, C.M., SILVA MDO, R. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. 53, 500-503, 2010.

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

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia** 73: 69-91. 2002

DIMECH, G. S., SOARES, L. A. L., FERREIRA, M. A., DE OLIVEIRA, A. G. V., CARVALHO, M. D. C., & XIMENES, E. A. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **The Scientific World Journal**, 2013.

DUSSAULT, D.; DANG VU, K.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**. v. 96, n. 1, p. 514-520, 2014.

DRUMOND, MARCOS ANTÔNIO. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa *et al.* (Org.) **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, cap.1, p. 1-18. 2013.

ESTIVILL, D., ARIAS, A., TORRES-LANA, A., CARRILLO-MUNOZ, A. J., & ARÉVALO, M. P. (2011). Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of microbiological methods*, 86(2), 238-242, 2011.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M.G. Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components . 65-94. 2013.

FELIPE, LORENA O.; BICAS, JULIANO L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e sociedade**, 2016.

FERNANDES, T.T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Rev. Patologia Tropical**, v. 34 (2) : 113-122, maio-ago. 2005.

FERREIRA MVC, PAES VR, LICHTENSTEIN A. Penicilina: oitenta anos; Penicillin: eighty years. **Rev med**(São Paulo). 87(4):272-276, 2008.

FRASSON, Amanda Piccoli *et al.* First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. **Parasitology Research** v. 110, n. 6, p. 2581–2587, 2012

GARCIA, C.S. Ação antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação da F.C.M.S.C.S.P., como requisito para conclusão do curso de Pós-Graduação Stricto Sensu e obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Brazil. pp. 99, 2011.

GAZZANEO, L.R.S.; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal Ethnobiology and Ethnomedicine** 1(9), 2005.

GELATTI LC, BONAMIGO RR, BECKER AP, D'AZEVEDO PA. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol.**;84(5):501-6, 2009.

GIACOMINI, R. A.; LIGIERO, C. P. B.; ANDRAO, P. S. S.; MIRANDA, P. C. M. L. Estudo fitoquímico do extrato hexânico do epicarpo de *Hymanaea stignocarpa* (jatoba-do-cerrado). Soc Bras Quimica, 29º reunião. Braz- 2000.

GONÇALVES AL, ALVES FILHO A, MENEZES H. Efeitos Antimicrobianos de Algumas Plantas Medicinais Brasileiras em Distúrbios Intestinais. **Rev Saúde Pesq.**;4(2):153-60. 2011.

GYLES, CARLTON; BOERLIN, PATRICK. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 328-340, 2014.

GROSSET, M., DESNOS-OLLIVIER, M., GODET, C., KAUFFMANN-LACROIX, C.;CAZENAVE-ROBLOT, F. Recurrent episodes of Candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance. **Medical mycology case reports**, 14, 20-23, 2016.

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

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; IQBAL, T.; BHATTI, I. A. Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. **Pak. J. Bot**, 43(2), 1315-1321. 2011.

IBF.Instituto Brasileiro de Florestas. Disponível em:<<https://www.ibflorestas.org.br/noticias/1003-sos-mata-atlantica-e-inpe-divulgam-dados-sobre-a-devastacao-da-mata-atlantica.html>>. Acesso em:22/08/2017.

IMAI, T., INOUE, S., OHDAIRA, N., MATSUSHITA, Y., SUZUKI, R., SAKURAI, M., HENRIQUES DE JESUS, J.M., OZAKI, S.K., FINGER, Z., FUKUSHIMA, K. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. **J. Wood Sci.** 54, 470-475, 2008

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Disponível em:<<http://www.inpe.br/biblioteca/>>. Acesso em 22/08/2017.

JELSBÄK, L., JOHANSEN, H.K., FROST, A.L., THØGERSEN, R., THOMSEN, L.E., CIOFU, O., YANG, L., HAAGENSEN, J.A.J., HOIBY, N.; MOLIN, S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2214-2224, 2007.

LACERDA, L.P., MALAQUIAS, G., PERON, A.P. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart.(Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1147-1150, 2014.

LEMES, R.; CAZAL, C., COSTA, G., MIRANDA, M., SILVA, D., BECCENERI, A.; DINIZ, V. Óleos essenciais dos frutos e folhas de *Kielmeyera coriacea*: atividade antitumoral e estudo químico. **Revista Virtual de Química**. 2017.

LI, L., SHI, C., YIN, Z., JIA, R., PENG, L., KANG, S., & LI, Z. Antibacterial activity of α -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(4), 1409-1413, 2014.

LIMA, H.C. et al. Fabaceae Lindl. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 10 fev. 2016

LIU, Y., YANG, Y., CHEN, Y., & XIA, Z. Antimicrobial resistance profiles and genotypes of extended-spectrum β -lactamase-and AmpC β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs in Beijing, China. **Journal of global antimicrobial resistance**, 10, 219-222. 2017.

LOCKHART, S. R., BERKOW, E. L., CHOW, N.; WELSH, R. M. *Candida auris* for the clinical microbiology laboratory: not your grandfather's *Candida* species. **Clinical Microbiology Newsletter**, 39(13), 99-103, 2017.

MACIEL, M. V. Monitoramento nutricional da dieta de pequenos ruminantes utilizando espectroscopia da reflectância do infravermelho próximo (NIRS) no sertão de Pernambuco. Tese de doutorado, p.47-48, Recife - PE 2016.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MANGUEIRA, D.F.B.; MANGUEIRA, L.F.B.; DINIZ, M.F.F.M. Candidose oral. **Revista brasileira de Ciências da Saúde**. 12, 69-79, 2010.

MARANHÃO, C.A., PINHEIRO, I.O., SANTANA, A.L.B.D., OLIVEIRA, L.S., NASCIMENTO, M.S., BIEBER, L.W. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Int. Biodeterior. **Biodegradation**. 79, 9-13, 2013.

MENEZES, Silvana Magalhães Siqueira; PINTO, Diego Muniz; CORDEIRO, Luciana Nunes. Atividades biológicas in vitro e in vivo de *Punica granatum* L.(romã). **Revista Brasileira de medicina. São Paulo**, v. 65, n. 11, p. 388-391, 2008.

MERCÊS, PAULA FERNANDA FIGUEIREDO DAS. Variação da composição química e da atividade antifitopatogênica dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* (Fabaceae) coletadas em área de extrema importância biológica para a conservação. 2015.

MIRANDA, A. S., DASGRAÇAS CARDOSO, M., BATISTA, L. R., RODRIGUES, L. M., & FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, 47(1), 213, 2016.

MONTEIRO, A.F. Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, para obtenção do título de Mestre em Química. Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Brazil, pp. 157, 2014.

MORENO, CLAUDIA; GONZÁLEZ, RUBÉN; BELTRÁN, CONSTANZA. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. **Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello**, v. 69, n. 2, p. 185-192, 2009.

MURRAY, PATRICK; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, MICHAEL A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858, 2000.

NEPAL, K., PANT, N. D., NEUPANE, B., BELBASE, A., BAIDHYA, R., SHRESTHA, R. K.; JHA, B. Extended spectrum beta-lactamase and metallo beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical samples in a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 16(1), 62, 2017.

NG, T. S., DESA, M. N. M., SANDAI, D., CHONG, P. P.; THAN, L. T. L. Growth, biofilm formation, antifungal susceptibility and oxidative stress resistance of *Candida glabrata* are affected by different glucose concentrations. **Infection, Genetics and Evolution**, 40, 331-338, 2016.

NOBRE, M. O. *et al.* Antifungal drugs for small and large animals. **Ciência Rural**, v. 32, p.175-184, 2002.

NOUÉR, S.A.; NUCCI, M.; DE-OLIVEIRA, M.P.; PELLEGRINO, F.L.P.C.; MOREIRA, B.M. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3663–3667, 2005

OLIVEIRA RDAGD, LIMA EDO, SOUZA ELD, VIEIRA WL, FREIRE KRL, TRAJANO VN, ET AL. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Rev Bras Farmacogn.** 17:186-90,2007.

ORSI, P.R., SEITO, L.N., DI STASI, L.C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **J. Ethnopharmacol.** 151, 380-385. 2014

OTAÍZA O'R F. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. **Rev Chilena Infectol.** 2002;19:219-21

PAJOHI, M. R. et al. Effects of *Mentha longifolia* L. Essential Oil and Nisin Alone and in Combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a Food Model and Bacterial Ultrastructural Changes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 2, p. 283–290, 2011

PEIRANO, G., SEKI, L. M., VAL PASSOS, V. L., PINTO, M. C. F., GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 63(2), 265-268. 2009.

PEREIRA CKB, RODRIGUES FFG, MOTA ML, SOUSA EO, LEITE GO, BARROS ARC, et al. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). In: Química SBd, editor. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Águas de Lindoia - SP-2007

PERIASAMY, S. et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 4, p. 1281-1286, 2012.

PINTO, R.B.; TOZZI, A.M.G.A.; MANSANO, V.F. *Hymenaea* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22971>>. Acesso em: 04 Jan. 2018.

RIBEIRO, T.G., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., VALADARES, D.G., FRANCA, J.R., LAGE, P.S., DUARTE, M.C., ANDRADE, P.H., MARTINS, V.T., COSTA, L.E., ARRUDA, A.L., FARACO, A.A., COELHO, E.A., CASTILHO, R.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Exp. Parasitol.** 143, 60-68, 2014.

SANTANA, G. M., DEUS, M. S. M., SOUSA, J. M. C., FERREIRA, P. M. P., FERNANDES, H. B., & PERON, A. P. Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. **Brazilian Journal of Biology**, 76(2), 520-525, 2016.

SANTANA, R. S. et al. The cost of excessive postoperative use of antimicrobials: the context of a public hospital. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgições**, v. 41, n. 3, p. 149–154, 2014.

SANTANA, R. S., Viana, A. C., Santiago, J. S., MENEZES, M. S., & FRAGA, I. M. Consequências do uso excessivo de antimicrobianos no pós-operatório: o contexto de um hospital público. **Cirurgiões**, 41(3), 149-154. 2014

SANTOS, RODOLFO CRISTIANO MARTINS; PÁGLIA, ADRIANO. Mata atlântica: características, biodiversidade e a história de um dos biomas de maior prioridade para conservação e preservação de seus ecossistemas. **Acervo da Iniciação Científica**, 2014.

SALES, Gleilton Weyne Passos. Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courba* L. 2014.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L. C.; FRASSON, A. P.; TASCA, T.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015.

SILVA, L. C. N., SANDES, J. M., DE PAIVA, M. M., DE ARAÚJO, J. M., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D., DA SILVA, M. V., & CORREIA, M. T. D. S. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural product research**, 27(16), 1492-1496. 2013.

SILVA, CLEIDEANA BEZERRA DA, OLIVEIRA ANTONIO FERNANDO MORAIS DE, ARAÚJO JANETE MAGALI, CORREIA MARIA TEREZA DOS SANTOS, LIMA VERA LÚCIA DE MENEZES. Organic extracts from Indigofera suffruticosa leaves have antimicrobial and synergic actions with erythromycin against Staphylococcus aureus. **Frontiers in Microbiology** v6.2015.

SILVA, M.S., LEITE, K.R.B., SABA, M.D. Anatomy of vegetative organs of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae-Caesalpinioideae): a species of medicinal use in Caetité-Bahia State, Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu. 14, 673-679, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRGS, 5.ed, p. 67-495, 2010.

SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. 2017. Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica: período 2015-2016. São Paulo: SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2017. 61p. (Relatório Técnico). Disponível em: < <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>>. Acesso em: 30 maio 2017.

SOUZA, I.M., FUNCH, L.S., DE QUEIROZ, L.P., Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **PhytoKeys**. 38,101-118. 2014

SPANU, T., et al. Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for

resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, n.1, p.196-202, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5ed. Artmed: Porto Alegre, 2013.

TIAN, J., HUANG, B., LUO, X., ZENG, H., BAN, X., HE, J., & WANG, Y.. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand-Mazz essential oil and its potential use as food preservative. **Food Chemistry**, Barking, v.130, p520-527, 2012.

TEXEIRA AB. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown [Dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2016.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

TREVIÑO-RANGEL, R. D. J., BODDEN-MENDOZA, B. A., MONTOYA, A. M., VILLANUEVA-LOZANO, H., ELIZONDO-ZERTUCHE, M., ROBLEDÓ-LEAL, E., & GONZÁLEZ, G. M. (2017). Phenotypical characterization and molecular identification of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Revista iberoamericana de micología**, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. p.155-209 e 762-810.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. 10^a.ed. São Paulo: Atheneu, 2015. p.175-338.

TORLAK, E.; KORKUT, E.; UNCU, A. T.; ŞENER, Y. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from a dental clinic in Konya, Turkey. **Journal of Infection and Public Health**., 2017.

TYLER, S.D.; STRATHDEE, C.A.; ROZEE, K.R.; JOHNSON, W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 4, p. 448-453, 1995.

UECHI, K., TADA, T., SHIMADA, K., NAKASONE, I., SONOZAKI, T., KIRIKAE, T.; FUJITA, J.. Emergence of ArmA, a 16S rRNA methylase in highly aminoglycoside-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Okinawa, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 24(1), 68-70. 2018.

VAL, I. C. C. ALMEIDA FILHO, G. L. Abordagem atual de candidíase vulvovaginal. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v 13, p 3-5, 2001.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

VIEIRA, A.J.H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. Disponível em: <http://www.sgponline.com.br/rbac/sgp/doi/article.asp?cod_fluxo=407&cod_versao=440&ObjSubmissao=1>. Acesso em: 05 dez 2016.

VILLA, J.; MARCO, F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gram negativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*, v. 20, n. 6, p. 304-312, 2002.

WOHLMEISTER, D., VIANNA, D. R. B., HELFER, V. E., CALIL, L. N., BUFFON, A., FUENTEFRÍA, A. M.; PILGER, D. A.. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ *Candida*. **Journal of microbiological methods**, 141, 121-125. 2017.

ZURITA, J.; ALCOCER, I.; PAREDES, D.O.; BARBA, P.; YAURI, F.; IÑIGUEZ, D.; MORA, M. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. **Journal of global antimicrobial resistance**, 4, p.229-230, 2013.

APÊNDICE A - DADOS NÃO APRESENTADOS NO ARTIGO

Perfil de resistências das bactérias a antibióticos

	Cepas bacterianas	Eri	Ctx	Oxa	Pen G	Amp	Van	Clor	Gen	Cli	Nor
1	<i>S. aureus</i> ATCC29213	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	<i>S. aureus</i> UFPEDA700	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
3	<i>S. aureus</i> UFPEDA 705	S	I	R	R	R	S	S	S	S	R
4	<i>S. aureus</i> UFPEDA 726	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCBH23764	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC29665	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCBH23940	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R
9	<i>Escherichia coli</i> ATCC94863	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	<i>Escherichia coli</i> CCBH23916	S	I	R	R	R	R	S	S	R	S

Perfil de resistência das cepas de Candidas a fármacos convencionais

Cepas	Anfotericina B	Cetoconazol	Fluconazol	Itraconazol
<i>Candida albicans</i> URM-6543	S	S	S	S
<i>Candida glabrata</i> URM-6393	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i> URM-6557	S	S	S	I
<i>Candida tropicalis</i> URM-6741	S	S	S	I

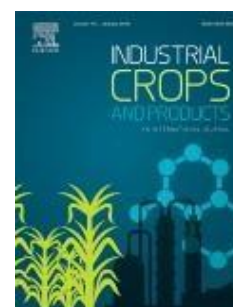
ANEXOS A – NORMAS DA REVISTA

**INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS**

An International Journal

**AUTHOR INFORMATION
PACK****CONTENTS**

- Description p.1
- Audience p.2
- Impact Factor p.2
- Abstracting and Indexing p.2
- Editorial Board p.2 • Guide for Authors p.5

TABLE OF

ISSN: 0926-6690

DESCRIPTION

Industrial Crops and Products is an International Journal publishing academic and industrial research on industrial (**defined as non-food/non-feed**) crops and products. Papers concern both crop-oriented and bio-based materials from crop-oriented research, and should be of interest to an international audience, hypothesis driven, and where comparisons are made statistics performed. The following are examples of research that fit within the scope of the journal.

The emphasis must be on plants. Non-plant research, for instance animal, algae, microorganisms, and medical oriented research are not within the scope of the journal. 2. Non-food/non-feed products (bio-based materials) from specific crops. Food/feed uses can be mentioned, but the majority of data and emphasis in the Discussion must be on non-food/non-feed uses of plants and plant products. Cultural practices to improve production of industrial crops and products. Experiments should be run at least twice, whether performed in the field, greenhouse, growth chamber, and in tissue culture or micropropagation, to account for environmental variation and/or genotype x environment interactions. Germplasm development and breeding of industrial crops. New or alternative crops with potential industrial uses. a. The manuscript should include an evaluation of the real potential to make a plant an industrial crop, not just information on plants gathered in natural habitats (many plants make products, but they will not become a crop). An economic analysis may be included as appropriate.

b. Industrial Crops and Products is a crop oriented journal; these can be field crops, horticultural crops, or forest crops, but they must be managed, not just collected

natural stands. The focus should be on agricultural production as an end result. Plant products, tied to specific crops/plants, and their modification to meet new industrial uses. For instance, for nanoparticles, a direct link is required with an industrial crop or with the respective value-chain. Testing industrial uses of specific plant products. Processing research to improve recovery of specific plant products.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Scientists in the areas of agronomy, crop protection, post-harvest and processing research, product testing and evaluation, distribution, marketing and economics.

IMPACT FACTOR

2016: 3.181 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Engineering Village - GEOBASE
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 CAB Abstracts
 EMBiology
 Elsevier BIOBASE
 AGRICOLA
 Chemical Abstracts
 EMBASE
 Environmental
 Abstracts Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

N. Belgacem, INPG, St Martin d'Heres, France

M.T. Berti, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA

E. Frollini, Macromolecular Materials and Lignocellulosic Fibers Group, Institute of Chemistry of Sao Carlos University of Sao Paulo Carlos, Sao Paulo, Brazil

M.J. Pascual-Villalobos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, La Alberca, Murcia, Spain

R.C. Sun, Beijing Forestry University, Beijing, China

Managing Editors:**D.S. Bajwa**, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA**M. Blohm**, Loyola University Maryland, Baltimore, Maryland, USA**L. S. Severino**, EMBRAPA Brazil, Campina Grande, PB, Brazil**W. Thielemans**, KU Leuven, Kortrijk, Belgium**Associate Editors****J. Bras**, Grenoble INP - Pagora, St. Martin d'Hères Cedex, France**J. González-Álvarez**, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain**O. Koul**, Insect Biopesticide Research Centre, Jalandhar, India**J. Labidi**, Universidad del Pais Vasco (Basque Country), San Sebastian, Spain**Z. Liu**, ARS USDA, Peoria, Illinois, USA**Editorial Advisory Board****H. Abdel-Haleem**, US Arid-Land Agricultural Research Center, Maricopa, Arizona, USA

Agronomics; biodiesel; biofuel; new industrial crops; oil seed crops; plant breeding; plant genetics; plant genomics; plant genetic resources; plant physiology (abiotic stress); natural rubber; natural rubber plants.

M. Acaroğlu, Selçuk University, Konya, Turkey

Energy Engineering; Mechanical Engineering; Automotive Engineering

E. Alexopoulou, Center for Renewable Energy Sources and Saving-CRES, Athens, Greece

Non-Food Crops

E.R. Amante, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Green chemistry; Cleaner production; Food chemistry; Food processing; Wastes minimization; Food biochemistry

M. Arslan, Erciyes University, Kayseri, Turkey

Genetics; Plant breeding; Oil crops; Medicinal plants; Essential oil

A. Ashori, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Non-wood fibers; pulp and paper technology; wood-plastic composite; wood cement bonded composite; fibres

R. Balti, University of Jendouba, Beja, Tunisia

Biological Function Engineering; Enzyme engineering; Biorefinery; Bioactive compounds from natural resources; Functional polymers from renewable resources; Natural antioxidants; Phytochemicals and phytopharmaceuticals; Nutraceuticals and functional foods, Protein preparations and biopeptides; Seafood processing and utilization of processing by-products; Biopolymers; Membrane technology for separation of biomolecules; Biodegradable packaging films; Innovations in Food Packaging; Food processing; Preparation of value-added products

A Biswas, USDA/ARS/NCAUR, Peoria, Illinois, USA**J-F. Bloch**, Grenoble INP - Pagora, St. Martin d'Hères Cedex, France

Mechanics of fibres and fibermats; structure; simulation; heat and mass transfer; optics

S. Boufi, University of Sfax, Sfax, Tunisia

Natural fibres based composites; nanocomposite based on nanosized cellulose filler; surface modification of cellulose fibres

A.A. Carbonell-Barrachina, Universidad Miguel Hernández (UMH), Orihuela, Alicante, Spain

Farming practices; Herbs and essential oils; Medicinal plants; Antioxidant activity; Antifungal activity; Isolation of natural plant compounds with industrial interest

A.J.F. Carvalho, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos -SP-, Brazil

Starch; thermoplastic starch; polymers and monomers from renewable resources; cellulose fibers and nanofibers

S.C. Cermak, U.S. Department of Agriculture (USDA), Peoria, Illinois, USA

Chemistry; Organic; New Crops; Lubricants; Distillation

R. Chhabra, Indian Institute of Technology (I.I.T.) Kanpur, Kanpur, India

Non-Newtonian behaviour; rheology; viscoelasticity; yield stress; shear-thinning; shear-thickening; thixotropy; food processing; baking characteristics.

M.J. Cocero Alonso, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain
K. Cornish, The Ohio State University, Wooster, Ohio, USA
 rubber; plant physiology; biomass; biofuels; resins.

V.M.V. Cruz, Bridgestone Americas, Inc., Eloy, Arizona, USA

Crop breeding and genetics; Plant genetic resources conservation and management; Oilseed crops; New industrial crops

A. Cruz-Hernandéz, Universidad De La Salle Bajío, León, Mexico

Genomics; Molecular biology; Plant biotechnology; Proteomics; Secondary Metabolites; Tissue culture

M.D. Curt, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain

Crops for biomass and biofuels; agronomy; improvement and processing

D.A. Dierig, Bridgestone Americas, Inc., Eloy, Arizona, USA

Oilseeds, plant genetic resources, new industrial crop breeding.

R.L. Evangelista, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois, USA

Postharvest handling of crops; crop processing; oilseed processing; vegetable oil refining; plant oil characterization; seed protein characterization

M. Faisal, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

in vitro morphogenesis, tissue culture and genetic transformation in plants of economic and medicinal importance; characterization of regenerated plants using molecular markers and flow cytometry and also the estimation of genetic diversity using DNA-based markers.

I.C.F.R. Ferreira, Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Bragança, Portugal

Food Chemistry; Natural Products; Nutraceuticals; Functional Foods; Natural ingredients/additives

A. Gandini, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

Chemistry of vegetal biomass; furan and furanics

R. Gesch, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Morris, Minnesota, USA

Agronomy of oilseed crops (e.g. influence of agronomic practices and environment on crop growth and yield, including seed oil content and composition); crop water use; photosynthesis; plant carbohydrate metabolism and usage

X. He, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Albany, California, USA

Molecular biology; Protein detection methods; Food safety; Food contaminants and Protein toxins

M.A. Jackson, U.S. Department of Agriculture (USDA), Peoria, Illinois, USA

Catalytic conversion of fats and oils

D. Jasso de Rodriguez, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Mexico

medicinal and nutraceuticals; antioxidants; waxes; resins; latices; guayule and phytochemicals of the plants of the semiarid lands

S. Korkut, Duzce University, Duzce, Turkey

Fibres and fibre compounds; natural fibres-based composites; waxes; resins; gums; rubber and other polymers; composites and reconstituted products; energy and chemicals from forest biomass; nonwood forest products; adhesives for wood; bonding strength; contact angles; adhesion by chemical bonding; mechanical properties of adhesives; surface roughness/morphology; wood-based composite materials and their applications.

M-P. Laborie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Germany

particle boards; wood; wood adhesive; nanocellulose; cellulosic composites; adhesion; interface properties; bio-based adhesives

D. Lachenal, Grenoble INP - Pagora, St. Martin d'Hères Cedex, France

pulping; lignin; bleaching; biorefinery from lignocellulosics

M.D. López Belchí, Universidad de Concepción-Chile, Campus Chillán, Chile

Natural Products from Plants; Analytical Techniques; Antioxidants; Enzymatic Assays; Encapsulation and Ingredients

D. Pasquini, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia MG, Brazil

vegetal macromolecules; cellulosic fibers; composites; nanocellulose; nanocomposites; polymers from renewable sources

R. Pavela, Crop Research Institute, Prague, Czech Republic

botanical insecticides

M.P. Arriaza, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain

Aromatic plants; Medicinal plants; Essential oils; Natural products; Antioxidant activity; Bioactivity

W.B. Phippen, Western Illinois University, Macomb, Illinois, USA

oil seed crops; plant breeding; genetics; agronomy; GC oil analysis

A. Pizzi, Université Henri Poincaré (Nancy I), Epinal Cedex 9, France

particle boards; wood; wood adhesive

Y. Popineau, Institute National de la Recherche Agronomique, Nantes, France

D.T. Ray, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA

C. Regnault-Roger, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau Cedex, France

natural Insecticides; essential oils; plant chemistry

R. Roseberg, Oregon State University, Klamath Falls, Oregon, USA

soil science; agronomic aspects of crop production

H. Ruiz, Autonomous University of Coahuila, Saltillo-Coahuila, Mexico

renewable energy, specifically in biorefinery process and bioethanol production of second generation using lignocellulosic materials (agricultural residuos), hydrothermal process (autohydrolysis), simultaneous saccharification and bioethanol fermentation and modeling of enzymatic hydrolysis.

A.J.D. Silvestre, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

extractives; GC-MS

D. Turley, National Non-Food Crops Centre, York, England, UK

non food crops in general; economic aspects; processing; rural strategies; agronomy of non-food crops; biofuels and bioenergy applications; bio-based materials

E.A. Turumtay, Recep Tayyip Erdoğan University, Rize, Turkey

Modern Liquid Chromatography Techniques; Chromatographic Analysis of Plant Based Natural Products; Phenolic Profiling; Spectroscopic Assays for Antioxidant Properties of Plant Extracts;

Traditional and Modern Extraction Techniques for Bio-active compounds from Medicinal Plants; Determination of Anticancer Activities of The Natural Compounds on some Cancer Cell lines and animal models

P. Velmurugan, Chonbuk National University, Jeonbuk, The Republic of Korea

G. Wang, University of Arizona, Maricopa, Arizona, USA crop production, nutrient management, crop rotation, and tillage management.

J. Xiao, Macau University of Science and Technology, Taipa, Macau, China

Medicinal plants, polyphenols, flavonoids, natural products, bioactivity, antioxidants Food Nutrition Food Chemistry

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

Types of paper

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

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

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

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

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

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

Changes to authorship

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

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

Article transfer service

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

Copyright

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

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

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

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

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

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups throughout [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

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

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

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

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not

represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

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

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

The open access publication fee for this journal is **USD 3200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

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

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

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

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Submit your article

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

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of wordprocessing software

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

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

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

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

Abstract

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

Graphical abstract

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

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

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a

university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

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

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

Nomenclature and Units

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

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

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

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

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

Math formulae

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

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

Subscripts and superscripts should be clear.

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

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

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

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

*

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: P <0.05,

**

P <0.01 and P <0.001.

2+

++

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca, not as Ca. Isotope numbers

1

8 should precede the symbols,
e.g., O.

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork General points

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

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

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

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

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in

color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

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

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

Web references

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

Data references

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

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/industrial-crops-and-products>

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

Reference formatting

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).

Kramer et al. (2010) have recently shown'

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

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

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For

more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

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

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown

next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

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

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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

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

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

Offprints

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

AUTHOR INQUIRIES

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

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