

Rosa, PVS, Everton, GO, Pereira, APM, Fonseca, D, Cunha, JCR, Mendonça, IP, Lima, ECS, Souza, LS, Souza, LS, Dias, AAS, Mouchrek Filho, VE & Arruda, MO. (2020). Bactericidal activity of essential oil and hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* leaves. *Research, Society and Development*, 9(7): 1-22, e804974843.

Atividade bactericida do óleo essencial e extrato hidroalcoólico das folhas de *Eucalyptus globulus*

Bactericidal activity of essential oil and hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* leaves

Actividad bactericida de aceite esencial y extracto hidroalcohólico de hojas de eucalipto *globulus*

Recebido: 23/05/2020 | Revisado: 28/05/2020 | Aceito: 29/05/2020 | Publicado: 15/06/2020

Paulo Victor Serra Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1782-5896>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: paullovictorserra@gmail.com

Gustavo Oliveira Everton

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0457-914X>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: gustavooliveiraevertton@gmail.com

Ana Patrícia Matos Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4478-4209>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: ap.matos11@hotmail.com

Danielly Fonseca

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8500-4777>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: danyfonseca2002@gmail.com

Jean Carlos Rodrigues da Cunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0741-3583>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: je.carl@outlook.com.br

Iago Pereira Mendonça

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3983-7767>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: iago.biomedico@hotmail.com

Ericka Cristina Silva Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0736-9973>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: ericka-lima1@outlook.com

Lauriane dos Santos Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2261-8034>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: sslanes77@gmail.com

Laurilene dos Santos Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0947-9973>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: sslaurilene380@gmail.com

Andressa Almeida Santana Dias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1671-8338>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: andressasantana@gmail.com

Victor Elias Mouchrek Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-7292>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: victor.mouchrek@ufma.br

Mariana Oliveira Arruda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7097-7843>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: mariana_o.arruda@yahoo.com.br

Resumo

O estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade, fenólicos totais e atividade antimicrobiana usando óleo essencial (OE) e extrato hidroalcolico (EH) das folhas do *Eucalyptus globulus* frente a microrganismos patogênicos de importância clínica. O EH foi preparado usando o método de maceração a frio e o OE foi extraído por hidrodestilação a 100°C por 3h. O ensaio

de toxicidade foi realizado através do bioensaio *Artemia salina* Leach. Para atividade antimicrobiana utilizou-se a técnica de Difusão de Disco frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os ensaios foram realizados em triplicata. A CL₅₀ de toxicidade obtida para o OE foi de 595,2 mg L⁻¹ e para o EH foi de 574,18 mg L⁻¹ ambos classificados como atóxicos. Em relação a atividade antimicrobiana, o OE apresentou halos de inibição para *S. aureus* e *E. coli* de 15 mm, enquanto o EH apresentou halos de 22 mm para *S. aureus* e *E. coli* de 17 mm. O OE e o EH apresentaram atividade antimicrobiana e atoxicidade, sendo parâmetros importantes para apontar os produtos como uma alternativa terapêutica, incentivando seu potencial de aplicação.

Palavras-chave: Óleo essencial; Extrato hidroalcolóico; Toxicidade; Antimicrobiano; *Eucalyptus globulus*.

Abstract

The study aimed to evaluate the toxicity, total phenolics and antimicrobial activity using essential oil (OE) and hydroalcoholic extract (EH) of *Eucalyptus globulus* leaves against pathogenic microorganisms of clinical importance. The HE was prepared using the cold maceration method and the EO was extracted by hydrodistillation at 100°C for 3h. The toxicity assay was performed using the *Artemia salina* Leach bioassay. For antimicrobial activity, the Disc Diffusion technique was used against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The toxicity LC₅₀ obtained for EO was 595.2 mg L⁻¹ and for HE it was 574.18 mg L⁻¹ both classified as nontoxic. Regarding antimicrobial activity, EO presented inhibition halos for *S. aureus* and *E. coli* of 15 mm, while HE presented halos of 22 mm for *S. aureus* and *E. coli* of 17 mm. EO and HE showed antimicrobial activity and atoxicity, being important parameters to point out the products as a therapeutic alternative, encouraging their potential for application.

Keywords: Essential oil; Hydroalcoholic extract; Toxicity; Antimicrobial; *Eucalyptus globulus*.

Resumen

El estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad, el total de fenólicos y la actividad antimicrobiana utilizando aceite esencial (AE) y extracto hidroalcohólico (EH) de hojas de *Eucalyptus globulus* contra microorganismos patógenos de importancia clínica. El EH se preparó utilizando el método de maceración en frío y el AE fue extraído por hidrodestilación a 100 °C durante 3h. El ensayo de toxicidad se realizó utilizando el bioensayo de *Artemia*

salina. Para la actividad antimicrobiana, la técnica de difusión de discos se utilizó contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La toxicidad LC₅₀ obtenida para AE fue de 595,2 mg de L⁻¹ y para EH fue de 574,18 mg L⁻¹ ambos clasificados como no tóxicos. En cuanto a la actividad antimicrobiana, AE presentó halos de inhibición para *S. aureus* y 15 mm *E. coli*, mientras que EH presentó halos de 22 mm para *S. aureus* y *E. coli* de 17 mm. AE y EH mostraron actividad antimicrobiana y atoxicidad, siendo parámetros importantes para señalar los productos como una alternativa terapéutica, fomentando su potencial de aplicación.

Palabras clave: Aceite esencial; Extracto hidroalcohólico; Toxicidad; Antimicrobiano; *Eucalyptus globulus*.

1. Introdução

As plantas medicinais são definidas como aquelas capazes de produzir princípios ativos que possam alterar o funcionamento de órgãos e sistemas restabelecendo o equilíbrio orgânico ou homeostasia nos casos de enfermidades e que possam servir como precursores de fármacos semissintéticos, o que tem chamado a atenção de pesquisadores, por ser uma fonte promissora de substâncias que podem ser utilizadas no controle de microrganismos (Furtado et al., 2015).

A utilização desses vegetais para o tratamento de enfermidades é conhecida desde a pré-história. No Brasil, a introdução dessas plantas em rituais de cura vem desde a cultura indígena, permanecendo esse conhecimento empírico até os dias de hoje. Aproximadamente 66% da população brasileira sem acesso à medicina moderna faz uso de medicamentos populares, representando muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (Mazzari & Prieto, 2014).

Diante deste cenário, a população vem buscando tratamentos mais saudáveis e de baixo custo para tratar suas enfermidades. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parcela da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária (Brasil, 2006).

Estima-se que 10.000 a 53.000 plantas sejam utilizadas para fins medicinais, mas apenas uma pequena parte delas foi investigada, representando quase 1% da flora (Mazzari & Prieto, 2014). Portanto, é de suma importância que seja comprovada a eficácia dessas plantas na medicina popular, pois grande parte deste produto natural não tem seu potencial

terapêutico e farmacológico realmente comprovado, mesmo com todos os avanços tecnológicos da atualidade (Gonçalves et al., 2005).

O conhecimento adquirido pela cultura popular sobre plantas medicinais está sendo incentivado para pesquisas experimentais com a finalidade de identificar o possível potencial bioativo destas plantas, para que as mesmas possam ser empregadas como princípio ativo pela indústria farmacêutica (Pinto et al., 2005). Segundo dados da última notificação dos Centros Americanos de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), mais de dois milhões de novos casos e mais de 23.000 mortes tenham sido causados por microrganismos resistentes a antimicrobianos nos Estados Unidos (EUA) no ano de 2013. Portanto, pode-se estimar que o impacto da resistência antimicrobiana em 2050 causará 10 milhões de mortes por ano se não forem encontradas estratégias para reduzir este problema da resistência antimicrobiana (Kifer et al., 2016).

Devido essa problematização da resistência de patógenos aos antimicrobianos, faz-se necessária a pesquisa de novos agentes para o combate de infecções. As drogas constituídas por extratos vegetais brutos (Al-Fatimi et al., 2007) ou os óleos essenciais (OE's), os metabólitos secundários das plantas aromáticas, são usados para prevenir infecções bacterianas devido à sua atividade antibacteriana proeminente e inibição da detecção de quorum (QS). Eles também são compostos seguros e não tóxicos, atendendo aos requisitos para agentes antibacterianos verdes (Yu et al., 2005). Adicionalmente, estas substâncias também podem agir sinergicamente com outras, melhorando o potencial antibiótico (Coutinho et al., 2004).

Portanto, sabendo que atualmente a busca por novos agentes antimicrobianos tornou-se o principal objetivo de muitos pesquisadores voltados para a química medicinal e farmacologia, este estudo teve por objetivo investigar a ação antimicrobiana, quantificação de fenólicos totais e toxicidade do óleo essencial e extrato hidroalcoólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), sendo um dos principais óleos essenciais (>50 kg) produzidos em Portugal, em 2010 (Barata et al., 2011), a fim de apontar o potencial antimicrobiano da espécie, buscando encontrar substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra patógenos.

2. Metodologia

Esta pesquisa foi baseada em um estudo de laboratório. Os potenciais biológicos das folhas de *Eucalyptus globulus* foram estudadas. Os resultados obtidos foram quantitativos com análise estatística.

2.1. *Obtenção e preparo das amostras*

As folhas de *Eucalyptus globulus* (Figura 1) foram coletadas no período matutino em um sítio localizado na Av. Conselheiro Hílton Rodrigues, 2750 - Turu, sitio Remi 30 (-2.481097, -44.214983), Maranhão, Brasil e identificadas pelo Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão com registro nº 1506.

Figura 1: *Eucalyptus globulus*.



Fonte: Autores.

Na Figura 1 é possível observar o local de onde as folhas foram obtidas e o material encaminhado para as análises de identificação da espécie botânica. As folhas da espécie vegetal foram secas em estufa com circulação de ar convectiva a 45 °C por 24h, sendo posteriormente trituradas e armazenadas para obtenção do extrato hidroalcoólico (EH) e óleo essencial (OE).

2.2. *Preparo do extrato hidroalcoólico*

Para o preparo do EH utilizou-se 100g do material vegetal, empregou-se o processo de maceração com solvente extrato etanol P.A 70% (v/v) seguindo a proporção 1:10. A solução obtida após 14 dias foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, após o processo o extrato foi liofilizado para posteriores análises (Harborne, 1998). O resumo do esquema experimental é apresentado na Figura 2.

Figura 2: Representação do processo de preparo do extrato hidroalcolico.



(a) Material vegetal triturado após secagem das folhas in natura

(b) Pesagem do material em pó das folhas secas

(c) Filtração após maceração

(d) Concentração em rotaevaporador

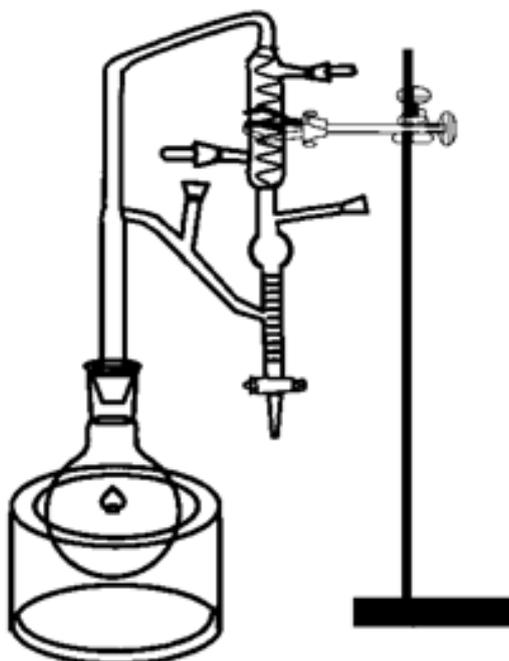
Fonte: Autores.

Na Figura 2 observa-se o material em granulometria fina (a) obtido após a trituração em moinho de facas elétrico, sendo devidamente mensurada a massa (b) para realização do processo de maceração e filtração (c). Sendo posteriormente o líquido obtido concentrado em rotaevaporador (d) para assim obtermos o líquido concentrado e em seguida realizarmos a remoção total do solvente.

2.3. Obtenção do óleo essencial (OE)

Para extração do OE, utilizou-se a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor. Foram utilizadas 100g das folhas secas do *Eucalyptus globulus*, adicionando-se água destilada (1:10). A hidrodestilação foi conduzida a 100 °C por 3h recolhendo-se o OE extraído. O OE foi seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4). O sistema extrator apresentado pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3: Esquema experimental da extração do OE.



Fonte: Autores.

Na Figura 3 é possível observar o aparato experimental sendo composto pelo balão de fundo redondo acoplado a uma manta elétrica. O aparelho de vidro de Clevenger deve estar devidamente resfriado pelo sistema de passagem de fluido de resfriamento, no caso do experimento etanol 70% (v/v) a 5°C. Foram determinados os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais: densidade, solubilidade, cor e aparência de acordo com a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). O rendimento do óleo essencial foi expresso em porcentagem na relação volume/massa pela medida de densidade.

2.4. Ensaio de toxicidade

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, foi preparada uma solução salina estoque do OE e do EH na concentração de 10.000 mg/L e 0,02 mg de Tween 80 (tenso ativo). Alíquotas de 5, 50 e 500 µL desta foram transferidas para tubos de ensaio e completados com solução salina já preparadas anteriormente até 5 mL, obtendo-se no final concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, onde dez larvas na fase náuplio foram transferidas para cada um dos tubos de ensaio.

Para a leitura do branco utilizou-se 5 mL da solução salina, para o controle positivo

$K_2Cr_2O_7$ e para o controle negativo 5 mL de uma solução 4 mg/L de Tween 80. Após 24 horas de exposição, realizou-se a contagem das larvas vivas, considerando-se mortas aquelas que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco. Adotou-se o critério estabelecido por Dolabela (1997), para classificação da toxicidade dos óleos essenciais, sendo considerado produto altamente tóxico quando $CL_{50} \leq 80$ mg/L, moderadamente tóxico para $80 \text{ mg/L} \leq CL_{50} \leq 250$ mg/L e levemente tóxico ou atóxico quando $CL_{50} \geq 250$ mg/L.

A análise estatística dos dados é realizada de acordo com o método de Reed & Muench (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela.

A partir da tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada log da concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL_{50}), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (Colegate et al.,1993). O intervalo de confiança é calculado segundo o método de Pizzi (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos versus logaritmo (log) da dose.

2.5. *Atividade antimicrobiana*

Foram utilizadas duas cepas de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estas foram previamente identificadas e confirmadas pelas provas bioquímicas.

Culturas microbianas puras mantidas em ágar TSA foram repicadas para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6 h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI,2020).

A atividade antimicrobiana foi realizada segundo a técnica de difusão de disco do CLSI (2020) que padroniza os testes de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão, utilizando-se suspensões padronizadas de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) distribuídas em placas contendo meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH) acrescidas de discos contendo 20 µL do OE e EH. Como controle positivo utilizou-se Gentamicina (30 µg). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C/24 h. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Esses ensaios foram feitos em triplicata.

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizou-se a técnica de diluição em caldo. Com diluições seriadas do OE e EH em Caldo Mueller Hinton (MH), resultando nas concentrações de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 e 5 µg/mL, realizando-se os controles de esterilidade e com incubação a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi verificada a concentração inibitória mínima do óleo e extrato, sendo definida como a menor concentração que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (ausência de turvação visível). Ensaios realizados em triplicata. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi mensurada a partir da inoculação de 10 µL dos tubos resultantes da diluição em Caldo Mueller Hinton, realizou uma contagem das placas após 24 h, onde as placas que não cresceram colônias foram classificadas como concentrações bactericidas para a ação do OE ou EH.

3. Resultados e Discussão

3.1. Propriedades físico-químicas

A Tabela 1 traz o resultado dos parâmetros físico-químicos do óleo essencial *do Eucalyptus globulus*, sendo de extrema importância não apenas para determinação da qualidade, como também para o controle da sua pureza.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do OE.

Parâmetro físico-químicos	<i>E. globulus</i>
Densidade (g/mL)	0,9073
Índice de refração (nD 25°)	1,460
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:2
Cor	Amarelo
Aparência	Límpido
Rendimento (%)	2,26

Fonte: Autores.

Com os resultados obtidos comparamos o rendimento do OE de *Eucalyptus globulus* ao resultado obtido por Bachir & Benali (2012) que extraiu os OE das folhas frescas e tiveram seu rendimento de 1,2%, sendo que este estudo obteve um rendimento de +1,06% acima do rendimento máximo obtido pelos autores, e superior também a estudos de Vitti & Brito (2003) que relatam o rendimento de várias espécies do eucalipto em que o *E. globulus*, sendo eles, varia de 0,7-2,4. Observando também que a densidade de várias espécies ricas cineol do eucalipto no estudo de Vitti & Brito (2003) variam entre 0,918 a 0,928, densidade essa que está semelhante este trabalho.

Comparando os resultados para o OE estudado com os da literatura, pode-se observar que houve uma semelhança entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições de secagem e tempo de armazenamento das folhas (Costa et al., 2012).

3.2. Atividade antimicrobiana

Os resultados referentes aos ensaios para determinação da atividade antimicrobiana são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Halos de inibição (HI), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) ($\mu\text{g/mL}$) para ação do OE e EH.

	OE				EH (80.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	GEN 30 μg (mm)	HI (mm)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	HI (mm)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. coli</i>	12	15	100	200	17	4000	10000
<i>S. aureus</i>	17	15	50	100	22	2000	8000

Fonte: Autores.

Analisando a Tabela 2 observamos que o OE de *Eucalyptus globulus* foi mais eficiente ao inibir a bactéria *E. coli* pelo Método de Difusão de Disco, com um halo de 15 mm e o EH foi mais eficiente ao inibir *S. aureus*. Os halos de inibição obtidos permitem classificar as

bactérias como sensíveis pelo critério estabelecido por Moreira et al., (2005).

Em estudo feito por Junio et al., (2017) com o extrato hidroalcoólico das folhas do *E. globulus* frente à *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos com mastite, os autores obtiveram halos de inibição de 15 mm nas amostras isolada do animal com mastite clínica e 14 mm para as amostras com mastite subclínica, ambos resultados inferiores ao presente ao presente estudo frente a *S. aureus*. Em outra pesquisa feita por Enciso-Díaz et al., (2015) utilizando o extrato bruto da espécie em estudo, observou que os halos de inibição foram semelhantes, sendo 22,5 mm para *S. aureus* e 8 mm para *E. coli*. E com o extrato aquoso da espécie Gomes & Bittencourt (2019) já não houve inibição para a *E. coli*, tendo somente inibição no crescimento de *S. aureus* com um halo de inibição de inferior de 15 mm.

O potencial observado é justificado por Carvalho (2012) que explica que o potencial da planta se deve a presença de flavonoides, que têm a capacidade de complexar as proteínas e parede celular bacteriana, causando sua lise.

O teste de Concentração Inibitória Mínima apresentou o resultado de inibição ao crescimento microbiano de *E. coli* a partir de 100 µg/mL e de *S. aureus* a partir de 50 µg/mL para o OE. Sendo observado através dos resultados que o OE obteve CIM's menores que do EH. Na análise feita por Tohidpour et al., (2010), os autores relatam atividade semelhante do mesmo OE para *E. coli* e *S. aureus*, visto que o OE dos autores conseguiu inibir a presença dos microrganismos utilizados neste estudo.

O ensaio para Concentração Bactericida Mínima apresentado mostrou melhores resultados para o OE frente a *S. aureus*, observando-se ação bactericida a partir de 100 µg/mL já o EH somente se pode notar ação a partir de 8000 µg/mL também frente a *S. aureus*. Em pesquisa feita por Brasil (2015) onde foram feitos CBM's frente a 56 isolados de *Staphylococcus aureus* observaram uma variação entre 64 e 512 mg/ L, o que deixa o presente estudo dentro dos parâmetros segundo a literatura.

3.3. Toxicidade

Na Tabela 3 os percentuais de mortalidade obtidos frente ao OE e EH no bioensaio com *Artemia salina* Leach.

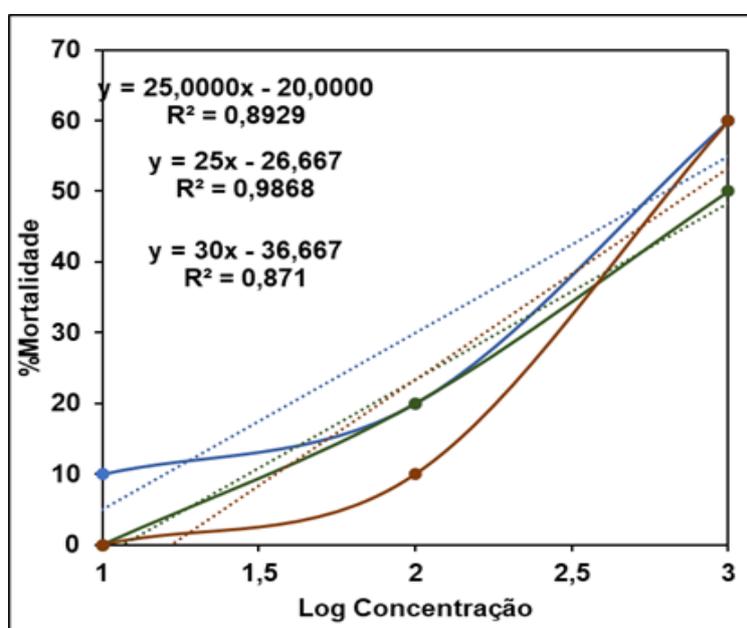
Tabela 3: Mortalidade das espécies de *Artemia salina* frente a ação do OE e EH.

Concentração (C)		Log (C)	Mortas	Vivas	Acumulados		% Mortalidade
					Vivos	Mortos	
1000 mg/L	OE	3	5	4	4	7	56
	EH	3	5	5	5	7	50
100 mg/L	OE	2	1	8	12	2	16
	EH	2	2	7	12	2	23
10 mg/L	OE	2	1	9	22	1	3
	EH	1	0	10	22	0	0

Fonte: Autores.

A Figura 4 apresenta o gráfico de percentual mortos versus logaritmo para o OE seguindo o método de Pizzi (1950).

Figura 4: Gráfico do percentual de mortos versus logaritmo (log) da dose do OE.

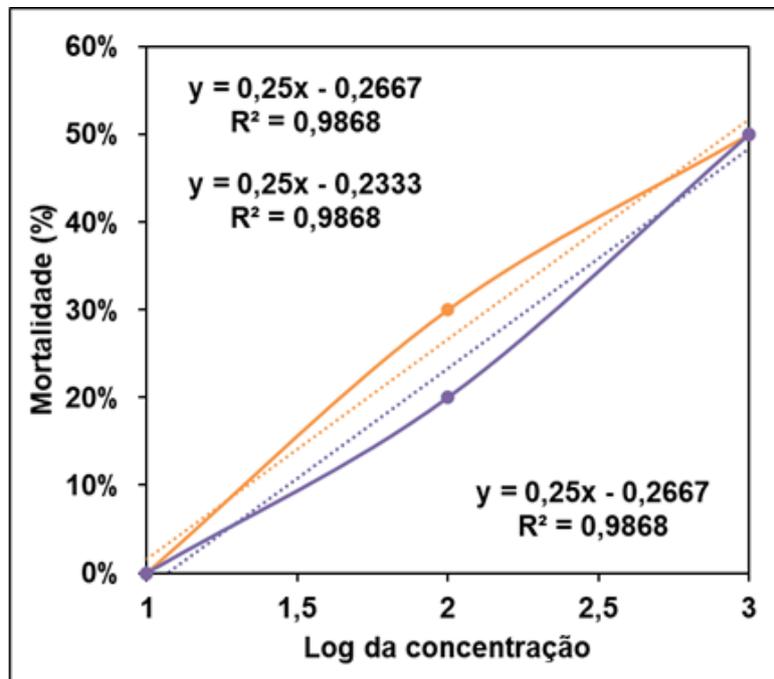


Fonte: Autores.

Na Figura 4 é possível observar as replicatas para o log da concentração do OE e o percentual de mortalidade obtidos para o bioensaio de *Artemia salina*, com base nas equações obtidas calculou-se os intervalos de confiança. A Figura 5 apresenta o gráfico de percentual

mortos versus logaritmo para o EH seguindo o método de Pizzi (1950).

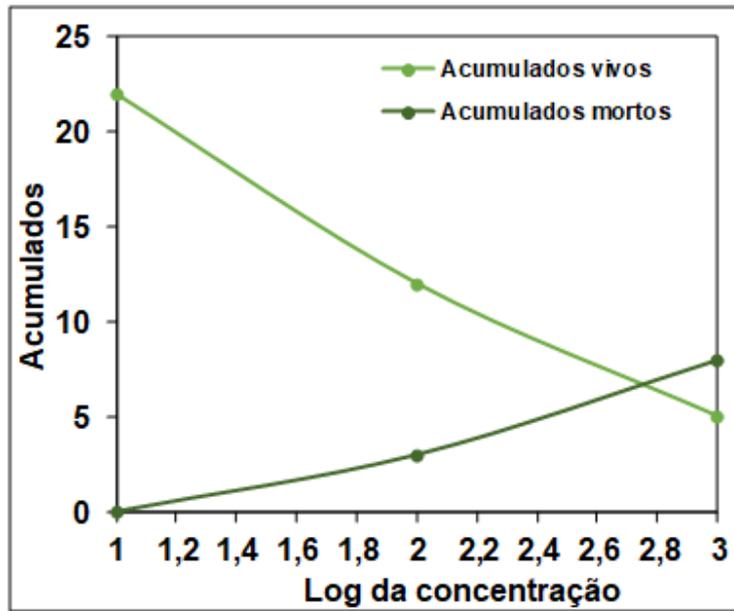
Figura 5: Gráfico do percentual de mortos versus logaritmo (log) da dose do EH.



Fonte: Autores.

Na Figura 5 é possível observar as replicatas para o log da concentração do EH e o percentual de mortalidade obtidos para o bioensaio de *Artemia salina*, com base nas equações obtidas calculou-se os intervalos de confiança. A Figura 6 apresenta o gráfico de acumulados versus logaritmo para o OE seguindo o método de Reed&Muench (1938).

Figura 6: Gráfico log da concentração do OE versus os acumulados de mortos e vivos.

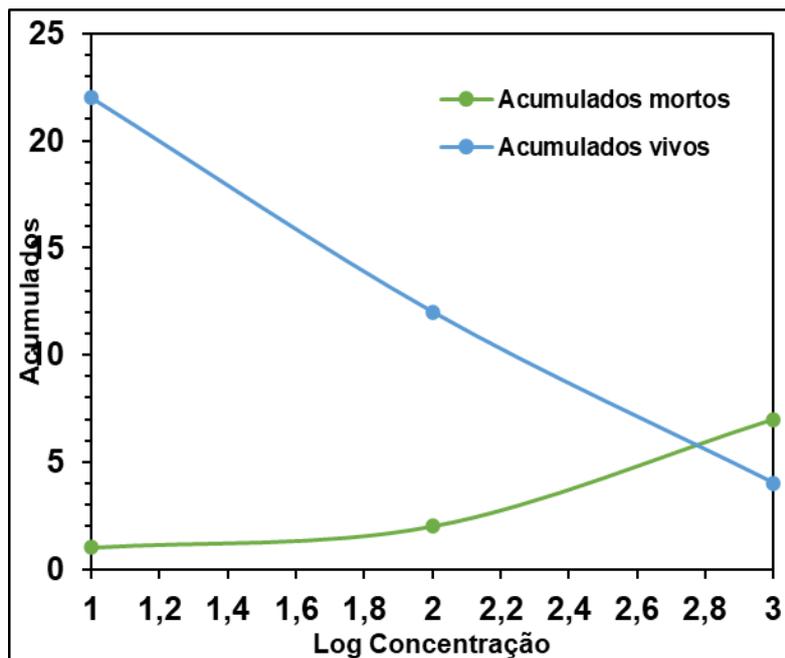


Fonte: Autores.

Na Figura 6 é importante enfatizar que a intersecção das curvas corresponde ao log da concentração do OE responsável pela mortalidade de 50% dos organismos.

A Figura 7 apresenta o gráfico de acumulados versus logaritmo para o EH seguindo o método de Reed&Muench (1938).

Figura 7: Gráfico log da concentração do EH versus os acumulados de mortos e vivos.



Fonte: Autores.

Na Figura 7 é importante enfatizar que a intersecção das curvas corresponde ao log da concentração do EH responsável pela mortalidade de 50% dos organismos.

Na Tabela 4 são apresentadas as Concentrações Letais 50% referentes a ação do OE frente a *Artemia salina* L. e sua posterior classificação segundo o critério de Dolabela (1997).

Tabela 4: CL₅₀ para ação do OE e EH frente a *Artemia salina* L.

	Concentração CL ₅₀) mg/L	Classificação
OE	595,2 ± 2,12	Atóxico
EH	574,18 ± 6,1612	Atóxico

Fonte: Autores.

Na Tabela 4 podemos observar que o OE e o EH não foram classificados como tóxico, logo, suas aplicações podem ser consideradas aceitáveis, já que o OE e o EH de *Eucalyptus globulus* extraído das folhas apresentou até agora um rendimento significativo. E neste ensaio de toxicidade apresenta a CL₅₀ de 595,2 mg/L para o OE e CL₅₀ de 574,18 mg/L, bastante acima do critério que é de apenas 250 mg/L para ser classificado como atóxico.

Portanto, este OE e EH tem seus potenciais de aplicação incentivados. A Concentração Letal 50% (CL₅₀) refere-se ao ponto em que o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos, e seguindo o critério de Dolabela (1997) é possível determinar a toxicidade de produtos naturais visando uma aplicação específica do agente no organismo alvo, visto que óleos com toxicidade elevada não são recomendados para aplicações biológicas.

O estudo da toxicidade é extremamente importante, pois fornece informações sobre a qualidade do ambiente ou parte dele, possibilitando assim mensurar qual a concentração letal de um determinado produto (Botelho et al., 2010). O bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (Siqueira et al., 1998). McLaughlin et al., (1998) afirmam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos. Os mesmos autores observaram que os valores de ED50 encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de CL₅₀ encontrados nos testes realizados com *Artemia salina*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

De acordo com literatura, sabemos que os resultados dos testes de toxicidade variam consideravelmente. Em trabalho desenvolvido com *Lytechinus variegatos* foi encontrado um coeficiente de variação de 40,3% entre testes de toxicidade realizados com embriões (Nipper et al., 1993). Outros autores relatam índices de variação em torno de 30%. Portanto, os índices de variação obtidos nesse trabalho são considerados aceitáveis, indicando que a metodologia utilizada forneceu dados que podem ser considerados reprodutíveis.

Os resultados do teor total de fenólicos totais do OE e EH de *E. globulus* são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Quantificação de fenólicos totais (mg EAT g⁻¹).

Fenólicos totais (mg EAT g ⁻¹)	OE <i>E. globulus</i>	EH <i>E. globulus</i>
	234,753	665,077

Fonte: Autores.

Na Tabela 5, o conteúdo fenólico total (CPT) foi expresso como equivalentes de ácido tânico (mg EAT / g de material vegetal) a equação da reta obtida foi $y = 0,0586x + 0,06$ ($R^2 = 0,9999$), onde y representa a absorvância e x a concentração equivalente de ácido tânico.

As folhas de *E. globulus* utilizadas no presente estudo apresentam uma quantidade importante de compostos fenólicos (234,735 mg EAT g⁻¹ OE/ 665,077 mg EAT g⁻¹ EH) o que se torna de grande relevância já que os fenólicos são frequentemente associados a vários efeitos positivos à saúde, incluindo efeitos antioxidantes, diminuição do risco de doenças cardiovasculares, mecanismos anticâncer e propriedades anti-inflamatórias (Singh et al., 2012).

Em comparação ao teor total de fenólicos do extrato das folhas de *E. globulus* ao estudo feito por Dezsi et al. (2015) usando outra metodologia para obtenção, relataram uma quantidade muito próxima do presente resultado de compostos fenólicos em estudo. Sousa (2018) em teste com o extrato aquoso do *E. globulus* para fenólicos usando a mesma metodologia, obtiveram resultados levemente parecidos, chegando a um total de 465,82 mg EAT g⁻¹, o que torna ainda mais fiel o presente resultado.

4. Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos observou-se a CL₅₀ de toxicidade obtida para o OE foi

de 595,2 mg L⁻¹ e para o EH foi de 574,18 mg L⁻¹ ambos classificados como atóxicos. Em relação a atividade antimicrobiana, o OE apresentou halos de inibição para *S. aureus* e *E. coli* de 15 mm, enquanto o EH apresentou halos de 22 mm para *S. aureus* e *E. coli* de 17 mm. O OE e o EH apresentaram atividade antimicrobiana e atoxicidade, sendo parâmetros importantes para apontar os produtos como uma alternativa terapêutica, incentivando seu potencial de aplicação. Como sugestão a estudos futuros sugere-se a identificação dos compostos químicos presentes nos produtos naturais estudados por técnicas espectroscópicas e cromatográficas.

Referências

Al-Fatimi M, Wurster M, Schröder G & Lindequist U (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 657-66.

Bachir R. G & Benali M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(9), 739.

Barata A. M, Rocha F, Lopes V, Bettencourt E & Figueiredo A. C. (2011). Medicinal and aromatic plants–Portugal. *Medicinal and aromatic plants of The World, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford.

Botelho R. G, Inafuku M. M, Maranhão L. A, Neto L. M, de Olinda R. A, Dias C. T & Tornisielo V. L. (2010). Toxicidade aguda e crônica do extrato de nim (*Azadirachta indica*) para *Ceriodaphnia dubia*. *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, 20.

Brasil M. S. (2006). Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil M. S. (2015). *Monografia da Espécie Eucalyptus globulus Labill (eucalipto)* (Tese de graduação, Ministério da Saúde, Brasília).

Carvalho C. A. (2012). *Caracterização botânica, fitoquímica e avaliação da atividade biológica de extrato de Piptadeniagonoacantha (Mart.) J. F. Macbr (FABACEAE)* (Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa).

Colegate S. M & Molyneux R. J. (Eds.). (2007). *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. CRC Press.

Costa L. M, Resende O, Gonçalves D. N & Sousa K. A. (2012). Qualidade dos frutos de crambe durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(2), 293-301.

Coutinho H. D. M, Bezerra D. A. C, Lôbo K & Barbosa I. J. F. (2004). Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Revista Conceitos*, 77, 77-85.

CLSI (2020). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Approved Standard 30 Edition, 32.

Dezsi Ş, Bădărău A. S, Bischin C, Vodnar D. C, Silaghi-Dumitrescu R, Gheldiu A. M & Vlase L. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic profile of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Corymbia ficifolia* (F. Muell.) KD Hill & LAS Johnson leaves. *Molecules*, 20(3), 4720-4734.

Dolabella M. F. (1997). *Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T. cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos* (Doctoral dissertation, tese de mestrado, Belo Horizonte Universidade Federal de Minas Gerais).

Enciso-Díaz O. J, Méndez-Gutiérrez A, De Jesús L. H, Sharma A, Villarreal M. L & Taketa A. C. (2012). Antibacterial activity of *Bougainvillea glabra*, *Eucalyptus globulus*, *Gnaphalium attenuatum*, and propolis collected in Mexico. *Pharmacology & Pharmacy*, 3(04), 433.

FARMACOPEIA BRASILEIRA (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 6 ed., p.92.

Furtado J. M, da Silva Amorim Á, de Macedo Fernandes M. V & Oliveira M. A. S. (2015). Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. *Journal of Health Sciences*, 17(4), 233-237.

Gomes S. S. S & Bittencourt A. H. C. (2019). Estudo e avaliação da ação antibacteriana de *Eucalyptus globulus* L. E *Allium sativum* L. sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *SAPIENS-Revista de divulgação Científica*, 1(2).

Gonçalves A. L, Alves Filho A & Menezes H. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72(3), 353-358.

Harborne A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business media.

Junio C. S, da Cunha A. F, Alves R. G, Fontes T. O. M, Cardoso V. A. F. X & Nunes M. F. (2017). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de plantas frente à *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos com mastite. *ANAIS SIMPAC*, 8(1).

Kifer D, Mužinić V & Klarić M. Š. (2016). Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1, 8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *The Journal of antibiotics*, 69(9), 689-696.

Mazzari A & Prieto J. M. (2014). Monitoramento de interações farmacocinéticas entre plantas medicinais e fitoterápicos e os medicamentos convencionais pelo sistema de farmacovigilância brasileiro. *Infarma*, 26, 193-198.

Moreira M. R, Ponce A. G, Del Valle C. E & Roura S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.

Mclaughlin J. L, Rogers L. L & Anderson J. E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, 32(2), 513-524.

Nipper M. G, Prosperi V. A & Zamboni A. J. (1993). Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 50(5), 646-652.

Pinto E. D. P. P, Amorozo M. C. D. M & Furlan A. (2006). Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. *Acta botanica brasílica*, 20(4), 751-762.

Pizzi M. (1950). Sampling variation of the fifty per cent end-point, determined by the ReedMuench (Behrens) method. *Human biology*, 22(3), 151-190.

Reed L. J & Muench H. (1938) A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.

Singh H. P, Kaur S, Negi K, Kumari S, Saini V, Batish D. R & Kohli R. K. (2012). Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT-Food science and Technology*, 48(2), 237-241.

Siqueira J. M. D, Bomm M. D, Pereira N. F. G, Garcez W. S & Boaventura M. A. D. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Química Nova*, 21(5), 557-559.

Sousa V. B. R. (2018). *Efeito antimicrobiano e fenólicos totais de extratos aquosos de erva cidreira (Lippia alba), capim limão (Cymbopogon citratus) e eucalipto (Eucalyptus globulus)* (Trabalho de Conclusão de Curso, São Luís, Universidade Federal do Maranhão).

Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A & Nazemi J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), 142-145.

Vitti A. M. S & Brito J. O. (2003). Óleo essencial de eucalipto. *Documentos florestais*, 17, 1-35.

Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J & Zhang J. (2005). The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS biology*, 3(2).

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Paulo Victor Serra Rosa - 10%
Gustavo Oliveira Everton - 10%
Ana Patrícia Matos Pereira - 10%
Danielly Fonseca – 7,14%
Jean Carlos Rodrigues da Cunha – 7,14%
Iago Pereira Mendonça – 7,14%
Ericka Cristina Silva Lima – 7,14%
Lauriane dos Santos Souza – 7,14%
Laurilene dos Santos Souza – 7,14%
Andressa Almeida Santana Dias – 7,14%
Victor Elias Mouchrek Filho - 10%
Mariana Oliveira Arruda - 10%